

CARACTERÍSTICAS DA BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 E SEU EFEITO SOBRE *Listeria monocytogenes* EM CARNE BOVINA¹

Renata BROMBERG^{2,*}, Izildinha MORENO², Roberta R. DELBONI², Helen C. CINTRA²

RESUMO

O isolamento de linhagens de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em carnes e seus produtos derivados resultou na detecção de *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484, proveniente de frango. A bacteriocina inibiu não apenas uma outra bactéria láctica (*Lactobacillus helveticus*), mas também microorganismos patogênicos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*). Ela foi inativada por causa de enzimas como: α -quimotripsina, tripsina, pronase E, ficina, pepsina, papaína e lipase. Além disso, a bacteriocina mostrou-se termoestável, mesmo a temperaturas de autoclavagem (121°C/10 min) e foi produzida em condições de armazenamento sob refrigeração. A bacteriocina mostrou-se ativa dentro de uma ampla faixa de valores de pH (2-10), porém a maior atividade ocorreu em valores menores de pH. A eficiência da linhagem CTC 484, assim como a de sua bacteriocina na redução e inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em carne bovina estéril, foram avaliadas. Os resultados indicaram que o tratamento da carne por meio da inoculação desta bactéria contribuiu para o aumento da segurança e extensão da vida útil deste alimento.

Palavras-chave: bactéria láctica, biopreservação, caracterização, alimentos, bactéria patogênica.

SUMMARY

CHARACTERISATION OF THE BACTERIOCIN PRODUCED BY *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 AND THE EFFECT OF THIS COMPOUND ON *Listeria monocytogenes* IN BEEF. Screening for the bacteriocin production of strains of lactic acid bacteria from various meat and meat products resulted in the detection of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484, isolated from chicken. The bacteriocin inhibited not only closely related lactic acid bacterium (*Lactobacillus helveticus*), but also pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Enterococcus faecalis*). This compound was inactivated by α -chymotrypsin, trypsin, pronase E, ficin, pepsin, papain, and also by lipase. It was heat stable even at autoclaving temperature (121°C/10 min) and was produced under refrigerated storage. It was also active over a wide range of pH values (2-10), although the highest activity was observed in the lower pH range. The effectiveness of strain CTC 484 as well as that of its bacteriocin in reducing population levels and growth of *Listeria monocytogenes* in sterile beef were studied. The results indicated that the inoculation of this bacteria into the meat contributed to the safety improvement and the shelf life extension of this food.

Keywords: lactic acid bacteria, biopreservation, characterisation, food, pathogenic bacteria.

1 - INTRODUÇÃO

Bactérias lácticas constituem um grupo de microorganismos amplamente distribuídos nos alimentos, produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocina. Todos esses compostos podem antagonizar o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas presentes nos alimentos [16, 41, 47], sendo que as bacteriocinas têm atraído grande interesse na indústria de alimentos, em decorrência ao seu uso potencial como conservante "natural" [6, 8, 49].

Tradicionalmente, as bacteriocinas têm sido definidas como compostos proteínicos, produzidos por bactérias que inibem (efeito bacteriostático) ou destroem (efeito bactericida) espécies relacionadas [50]. A inclusão de compostos similares, com ação sobre uma diversidade maior de espécies, e cuja estrutura é formada por outros grupos funcionais (carboidratos, lipídeos), possibilitou a uma definição mais ampla das bacteriocinas [21].

De acordo com SHILLINGER & LÜCKE [47], bactérias lácticas originalmente isoladas de carnes e produtos cárneos são os microorganismos mais indicados para serem utilizados na intensificação da segurança microbiológica destes alimentos. Segundo os autores, estas bactérias são adaptadas às condições das carnes e devem, desta forma, ser mais competitivas comparativamente às bactérias lácticas provenientes de outras fontes. A nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, apresenta uma baixa eficácia na biopreservação de carnes devido à sua baixa solubilidade, distribuição desuniforme e baixa estabilidade. Além disso, a dose requerida é considerada antieconômica, excedendo a ingestão diária aceitável para um consumo de 100 g de carne por dia para uma pessoa de 60 kg.

¹Recebido para publicação em 7/3/2005. Aceito para publicação em 23/1/2006 (001482)

²Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Avenida Brasil, 2.880 CEP 13070-178 – Caixa Postal 139 – Campinas/SP – Brasil

E-mail: renatab@ital.sp.gov.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

Partindo-se de um extenso trabalho de isolamento foram selecionadas aproximadamente 800 bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas de diversas carnes e produtos derivados [4]. A atividade dos agentes antimicrobianos produzidos por estas espécies foi testada sob condições que possibilitaram a eliminação da ação de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e de bacteriófagos. Dentre as colônias isoladas, uma delas, denominada CTC 484, promoveu a secreção de um composto antimicrobiano de interesse para estudo.

Neste trabalho, algumas características da cultura CTC 484 e de sua bacteriocina, tais como: atividade antimicrobiana, sensibilidade enzimática, estabilidade em diferentes valores de pH e temperaturas, características de crescimento e da produção de bacteriocina, foram determinadas. Também foi avaliado o efeito da presença desta cultura na inibição de *Listeria monocytogenes* em carne bovina.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Origem e conservação dos microorganismos utilizados

A bactéria CTC 484, produtora de bacteriocina, foi obtida na Coleção de Culturas do Centro de Tecnologia

TABELA 1 – Origem e condições de cultivo dos microorganismos utilizados nos testes de avaliação da bactéria láctica produtora de substância tipo bacteriocina

| Microorganismos | Condições de crescimento (meio de cultura/tempo/temperatura) |
|--|--|
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC ^a 14579 | TSB ^g 24 h /30°C |
| <i>B. cereus</i> CTC ^b 001 | TSB 24 h /30°C |
| <i>Clostridium perfringens</i> CTC 042 | TSB 24 h /37°C |
| <i>Cl. sporogenes</i> CTC 006 | TSB 24-48 h /37°C |
| <i>Cl. sulfito redutor</i> CTC 005 | TSB 24 h /37°C |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 | TSB 24 h /30°C |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25422 | TSB 24 h /37°C |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> (Wiesby ^c) | MRS ^h 24-48 h /45°C |
| <i>Lb. plantarum</i> TECNOLAT ^d 434 | MRS 24 h /30°C |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 10830 | MRS 24 h /30°C |
| <i>Listeria innocua</i> Lin 11 (INRA ^e) | TSB 24 h /37°C |
| <i>L. monocytogenes</i> CTC 021 | TSB 24 h /37°C |
| <i>Micrococcus</i> sp. ATCC 4698 | TSB 24 h /30°C |
| <i>Pseudomonas</i> sp. CTC 032 | TSB 24 h /37°C |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 | TSB 24 h /37°C |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CTC 033 | TSB 24 h /37°C |
| <i>Streptococcus</i> sp. ATCC 25175 | TSB 24 h /30°C |
| <i>Weissella viridescens</i> CCT ^f 0849 | MRS 24 h /30°C |

^aATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, Estados Unidos. ^bCTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas (SP), Brasil. ^cWiesby GmbH & Co. KG, Alemanha; ^dTecnolat – Centro de Tecnologia de Laticínios, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas (SP), Brasil. ^eINRA – Institute National de Recherches Agronomiques, Jouy-en-Josas, França. ^fCCT – Fundação Tropical André Tosello, Campinas (SP), Brasil. ^gTSB – Caldo Trypticase de Soja. ^hMRS – Caldo de Man Rogosa Sharpe

de Carnes (CTC), Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), Campinas (SP), Brasil. Esta linhagem foi isolada de fígado de frango *in natura*. As linhagens das bactérias indicadoras estão listadas na *Tabela 1*. As culturas estoque da bactéria láctica ou dos demais microorganismos foram mantidas a -80°C em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) ou caldo Trypticase de Soja (TSB, Oxoid), suplementados com glicerol a 15%. Estas culturas foram conservadas sob refrigeração (4°C), em tubos contendo, respectivamente, os ágaros MRS ou Trypticase de Soja (TSA, Oxoid) inclinados. Antes da utilização, as mesmas foram reativadas, respectivamente, em caldo MRS ou TSB, seguido por incubação nas condições descritas na *Tabela 1*.

2.2 - Caracterização taxonômica da cultura produtora de bacteriocina

A classificação taxonômica da cultura produtora de bacteriocina, selecionada para este estudo, foi efetuada por meio de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Para tanto, realizaram-se: coloração de Gram, reação de catalase, redução de nitrato em nitrito, tolerância a teores de sais e habilidade de crescimento em diferentes temperaturas e valores de pH, de acordo com HARRIGAN & McCANCE [15], e metabolismo da glicose [10]. Além dos testes de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos, a habilidade da cultura em fermentar carboidratos foi avaliada por meio do Sistema de Identificação BBL CRYSTALTM IDENTIFICATION, Gram-Positive ID kit (Becton & Dickinson Microbiology Systems, Maryland, Estados Unidos).

2.3 - Extração da bacteriocina e avaliação da atividade antimicrobiana

Para exclusão da possibilidade da atividade inibitória da cultura 484 ter sido ocasionada por meio da produção de ácidos orgânicos e conseqüente redução do pH, o microorganismo foi inoculado em caldo MRS suplementado com β-glicerofosfato de sódio a 2% (Ecibra, Brasil), para posterior incubação a 30°C/24 h. Após o período de incubação, este cultivo foi submetido à centrifugação (7.500 rpm, a 4°C/10 min). O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,5 (pHmetro Toledo Mettler, MP125, Zurich, Suíça) com solução de NaOH 10 N. Em seguida, efetuou-se o tratamento térmico do sobrenadante em banho-maria a 95°C, durante 5 min.

Para avaliação da atividade da bacteriocina, foi utilizado o método de diluição crítica de MAYR-HARTING *et al.* [39]. O sobrenadante foi diluído sucessivamente na razão de 1:2 (v/v) em placas de microtitulação (Microcrowel Plate 96F), utilizando-se solução-tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7. Em seguida, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram depositadas em placas de Petri contendo MRSA ou TSA, previamente inoculados com as culturas indicadoras. Após 24 a 48 h de incubação, em condições adequadas para cada espécie, os meios foram analisados quanto à formação de halos de inibição. O

título da bacteriocina, expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/mL), foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicada por 100, para a obtenção da preparação original.

As placas de Petri, contendo culturas indicadoras, foram preparadas a partir de cultivos ativos em fase estacionária de crescimento. Esses cultivos foram inoculados a 2% em MRSA ou TSA e, após suave homogeneização, foram vertidos em placas de Petri estéreis. Após solidificação e secagem dos ágar em câmara de fluxo horizontal, as placas foram utilizadas para os testes.

2.4 - Sensibilidade da substância tipo bacteriocina a diferentes enzimas

A natureza da bacteriocina, produzida pela bactéria láctica em estudo, foi determinada por meio da verificação de sua sensibilidade às enzimas proteolíticas e lipolítica, pelo método de diluição crítica de MAYR-HARTING *et al.* [39]. As soluções de enzimas (0,2 mg/mL) esterilizadas por filtração (Millex GV, 0,22 µm) foram misturadas com as bacteriocinas (Item 2.3) na proporção de 1:1 (v/v). A mistura obtida foi incubada a 37°C/1 h. Em seguida, foi realizada a inativação enzimática, por meio de um tratamento térmico com água em ebulição, durante 5 min. Na determinação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas, utilizou-se a cultura de *B. cereus* CTC 001 como indicadora. Os controles consistiram de bacteriocina em tampão fosfato de sódio 0,1 M e soluções de enzimas não adicionadas de bacteriocina. Soluções-teste de enzimas e os controles foram depositados em cada placa. Após a secagem dos inóculos, as placas foram incubadas a 30°C durante 24 a 48 h, para posterior avaliação da presença de zonas de inibição.

As enzimas testadas foram: ficina (Sigma Chemical Co., Dorset, Inglaterra) em solução-tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7; tripsina (Sigma) em solução-tampão Tris-HCl 40 mM, pH 8,2; α -quimotripsina (Sigma) em solução-tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8; pronase E (Sigma) em solução-tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,8; pepsina (Merck, Darmstadt, Alemanha) em solução-tampão HCl 0,02 N; lipase (Merck) em solução-tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6; e papaína (Sigma) em solução-tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7.

2.5 - Efeito do pH, tratamento térmico e refrigeração na ação da bacteriocina

Para avaliação da estabilidade térmica em diferentes valores de pH (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, e 12), o sobrenadante da cultura produtora de bacteriocina foi submetido a alguns tratamentos térmicos (65°C/30 min, 100°C/10 min, 121°C/10 min) e refrigeração (4°C/24 h). Os pHs foram ajustados a seus respectivos valores com soluções de NaOH e HCl 10 N. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de diluição crítica [39], utilizando-se como indicadora, a cultura de *B. cereus* CTC 001. Os controles consistiram de uma amostra da bacteriocina sem tratamento térmico.

2.6 - Produção da bacteriocina em diferentes temperaturas

Na avaliação do efeito da temperatura de incubação no crescimento e produção da bacteriocina produzida pela cultura CTC 484, cultivos ativos (em fase estacionária de crescimento) foram inoculados a 1% (v/v, 10⁵-10⁶ UFC/mL) em caldo MRS tamponado. Estes foram incubados nas seguintes condições: temperatura de crescimento desta cepa (37°C), temperatura abusiva para armazenamento de carnes (25°C), temperatura de refrigeração (4°C) e congelamento (-20°C). Em intervalos regulares, amostras foram retiradas para a determinação da absorbância a 600 nm, pH e atividade antimicrobiana da bacteriocina obtida pelo método de diluição crítica [39], utilizando-se como indicadora, a cultura de *B. cereus* CTC 001.

2.7 - Efeito da cultura de bactéria láctica CTC 484 para controle de *L. monocytogenes* em carne tratada termicamente

Porções de carne bovina moída crua, submetidas a tratamento térmico a 121°C durante 15 min, foram inoculadas com 2% do cultivo ativo (24 h a 30°C) da bactéria produtora de bacteriocina e com 1% do cultivo ativo (24 h a 30°C) da bactéria sensível (*L. monocytogenes* CTC 021). As amostras de carnes foram armazenadas a 4 e 25°C durante 16 e 13 dias, respectivamente. Em intervalos de tempo predeterminados, determinaram-se as contagens de células viáveis do microorganismo sensível e da cultura produtora (média das triplicatas), assim como a verificação do valor de pH. Amostras inoculadas somente com a cultura produtora foram utilizadas como controle positivo e outras inoculadas apenas com a cultura sensível foram utilizadas como controle negativo.

A amostragem foi realizada a partir de porções de 25 g da carne moída inoculada, homogeneizada com 225 mL de solução de água peptonada a 0,1%, em *stomacher* (Seward 400, Londres, Reino Unido) durante 1 min. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas, a partir de 1,0 mL do homogeneizado.

Para a enumeração de bactérias lácticas nas amostras-teste e no controle positivo, diluições (1,0 mL) apropriadas de cada amostra foram plaqueadas (*pour plate*) em ágar MRS suplementado com β -glicerofosfato de sódio a 2%. Em seguida, cada placa contendo os meios inoculados recebeu uma sobrecamada de ágar MRS. As placas foram incubadas a 30°C/48 h.

A enumeração de *L. monocytogenes* foi realizada nas amostras-teste e no controle negativo. Para tanto, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em superfície em placas de ágar Seletivo Diferencial para *Listeria* (Oxoid), adicionado do Suplemento Seletivo SR 140 (Oxoid), e, posteriormente, incubadas a 37°C/48 h.

A variação do pH foi determinada nas amostras inoculadas apenas com a cultura produtora, a partir da amostra de carne do controle positivo.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Caracterização taxonômica da cultura produtora de substância do tipo bacteriocina

A cultura CTC 484 foi identificada como coco Gram-positivo, não móvel, catalase-negativo, homofermentadora. A linhagem reduz nitrato a nitrito, cresce a 10°C, em pH 4,4 e em meio contendo NaCl a 6,5%, porém, não se desenvolve em temperatura de 45°C, em pH 9,6 ou em presença de NaCl a 18%. Baseando-se nestas características, na análise do padrão de fermentação de carboidratos e em outras reações utilizando-se o Sistema BBL CRYSTAL™ IDENTIFICATION (Tabela 2), a linhagem foi identificada como *Lactococcus lactis subsp. hordniae* (94,74%).

Linhagens de *Lc. lactis ssp.* têm sido utilizadas como culturas *starters* em diversos produtos cárneos [14, 45]. Estes microorganismos, tradicionalmente associados com produtos lácteos e vegetais, têm sido isolados de

TABELA 2 – Reações bioquímicas apresentadas pela cultura de bactéria láctica CTC 484

| Testes | Reação |
|--|--------|
| Hidrólise enzimática: | |
| 4MU-β-D-glicosídeo | + |
| L-valina | - |
| L- fenilalanina | + |
| 4MU-α-D-glicosídeo | - |
| L-ácido piroglutâmico-AMC | |
| L-triptofano-AMC | + |
| L-arginina-AMC | - |
| 4MU-N-acetil-β-D-glicosaminida | - |
| 4MU-fosfato | - |
| 4MU-β-D-glicoronida | - |
| L-isoleucina | - |
| Utilização de carboidratos: | |
| Trealose | - |
| Lactose | - |
| Metil-α e β-glicosídeo | - |
| Sacarose | - |
| Manitol | - |
| Maltotriose | - |
| Arabinose | - |
| Glicerol | - |
| Frutose | + |
| Hidrólise enzimática de glicosídeo: | |
| p-nitrofenil-β-D-glicosídeo | + |
| p-nitrofenil-β-celobiosídeo | - |
| p-nitrofenil-fosfato | - |
| p-nitrofenil-α-D-maltosídeo | - |
| o-nitrofenil-β-D-galactosídeo (ONPG) e p-nitrofenil-α-D-galactosídeo | - |
| Hidrólise enzimática de substrato amídico: | |
| Leucina-p-nitroanilida | - |
| Uréia e amônio | - |
| Esculina | - |
| Utilização de arginina | + |

alguns produtos cárneos tais como: carne suína *in natura* [13], frutos do mar [38], salame espanhol [44], carne de frango cozida [2] e salame tailandês “nham” [42]. O isolamento de *Lc. lactis subsp. hordniae* CTC 484 e das demais linhagens de *Lc. lactis* produtoras de compostos antimicrobianos sugere uma ampla distribuição dessa em carnes e produtos derivados.

3.2 - Atividade antimicrobiana

O espectro da atividade do composto antimicrobiano, produzido por *Lc. lactis subsp. hordniae* CTC 484, está apresentado na Tabela 3. Este composto teve atividade inibitória contra outra bactéria láctica (*Lb. helveticus*) e linhagens patogênicas como *S. aureus* CTC 033, *L. monocytogenes* CTC 021, *Cl. perfringens* CTC 042, *Ent. faecalis* ATCC 19433, *B. cereus* CTC 001 e ATCC 14578. Assim como outras bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas [25, 43], esta substância não foi efetiva contra bactérias Gram-negativas.

No entanto, sabe-se que o uso de agentes quelantes como o EDTA, ácidos graxos ou a aplicação de estresse subletal, como calor ou congelamento, pode romper a camada de lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias Gram-negativas, aumentando sua sensibilidade em relação às bacteriocinas [12]. Foi observada uma variação em relação ao nível de inibição entre as linhagens indicadoras testadas. *Lb. helveticus* (Wiesby) apresentou sensibilidade a 800 UA/mL em relação a este composto; *B. cereus* ATCC 14578 apre-

TABELA 3 – Espectro de atividade da cultura láctica CTC 484 obtido pelo método de diluição crítica de MAYR-HARTING *et al.* [39]

| Indicadores | Atividade de bacteriocina (UA/mL) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>B. cereus</i> CTC 001 | 200 |
| <i>B. cereus</i> ATCC 14578 | 400 |
| <i>Cl. perfringens</i> CTC 042 | 200 |
| <i>Cl. sporogenes</i> CTC 006 | 0 |
| Cl. sulfito redutor CTC 005 | 0 |
| <i>Ent. faecalis</i> ATCC 19433 | 200 |
| <i>E. coli</i> ATCC 25422 | 0 |
| <i>Lb. helveticus</i> (Wiesby) | 800 |
| <i>Lb. plantarum</i> TECNOLAT 434 | 0 |
| <i>Leuc. mesenteroides</i> ATCC 10830 | 0 |
| <i>L. innocua</i> Lin. 11 (INRA) | 0 |
| <i>L. monocytogenes</i> CTC 021 | 200 |
| <i>Micrococcus sp.</i> ATCC 4698 | 0 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> CTC 032 | 0 |
| <i>Salm. typhimurium</i> ATCC 14028 | 0 |
| <i>S. aureus</i> CTC 033 | 200 |
| <i>Streptococcus sp.</i> ATCC 25175 | 0 |
| <i>W. viridescens</i> CCT 0849 | 0 |

sentou valor de sensibilidade de 400 UA/mL, enquanto *B. cereus* CTC 001, *Cl. perfringens* CTC 042, *Ent. faecalis* ATCC 19433, *L. monocytogenes* CTC 021 e *S. aureus* CTC 033 apresentaram sensibilidade máxima de 200 UA/mL. As demais linhagens testadas foram resistentes ao composto antimicrobiano produzido por esta cultura.

É importante salientar que a substância com propriedades antimicrobianas produzida por esta bactéria apresenta características de interesse, uma vez que esta é ativa contra *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*, bactérias patogênicas pouco afetadas por outras bacteriocinas [36]. Além disso, a propriedade antimicrobiana, apresentada por este composto sobre *L. monocytogenes*, ressalta seu potencial para aplicação em carnes e produtos derivados, dada a importância deste patógeno nos alimentos citados.

3.3 - Sensibilidade a enzimas proteolíticas e lipolíticas

As bacteriocinas são compostos protéicos responsáveis pela inibição dos microorganismos-alvo. A perda da atividade antimicrobiana após um tratamento enzimático indica a sensibilidade dos compostos ativos secretados pela linhagem de bactéria láctica. De acordo com os testes realizados com a substância inibidora produzida pela bactéria *Lc. lactis subsp. hordniae* CTC 484, os resultados indicaram que esta foi inativada por todas as enzimas proteolíticas avaliadas, assim como pela enzima lipolítica (Tabela 4). Desta forma, após o tratamento com α -quimotripsina, tripsina, pronase E, ficina, pepsina, papaína e lipase, a atividade da substância antimicrobiana foi completamente destruída, reduzindo-se de 800 a 0 UA/mL.

É interessante destacar a inativação e destruição do composto antimicrobiano produzido pela linhagem CTC

TABELA 4 – Sensibilidade enzimática da bacteriocina produzida pela cultura CTC 484 avaliada pelo método de diluição crítica de MAYR-HARTING *et al.* [39]

| Tratamento ^a | Atividade de bacteriocina (UA/mL) |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Controle ^b | 200 |
| α -Quimotripsina | 0 |
| Tripsina | 0 |
| Pronase E | 0 |
| Ficina | 0 |
| Pepsina | 0 |
| Papaína | 0 |
| Lipase | 0 |

^a*B. cereus* CTC 001 foi utilizado como microorganismo indicador. ^bSobrenadante livre de células em tampão fosfato 0,1 M

484, por meio da ação de enzimas digestivas (pepsina, tripsina e α -quimotripsina). A sensibilidade do composto antimicrobiano a proteases indica que aquele deve ser um peptídeo. A enzima lipolítica testada neste estudo também causou inativação do composto. Este fato pode ser explicado pela presença de uma molécula de lipídeo nesta bacteriocina, conforme verificado para as bacteriocinas da classe IV da classificação de KLAENHAMMER

[26]. O agente inibitório produzido pela linhagem CTC 484 pode ser caracterizado como bacteriocina, uma vez que foi excluída a possibilidade de sua ação antimicrobiana ser decorrente da presença de ácidos, peróxido de hidrogênio ou bacteriófago [4]. Além disso, sua natureza foi confirmada por sua sensibilidade a proteases.

3.4 - Efeito do pH, tratamento térmico e refrigeração na ação da bacteriocina

A tecnologia dos obstáculos combina diversos métodos de preservação inibitórios ao crescimento microbiano. As bacteriocinas podem atuar em sinergia com outros tratamentos, contribuindo para a melhoria da segurança do alimento [8]. As bacteriocinas apresentam diferentes sensibilidades a variações de temperatura e pH [7, 18, 37, 53]. Neste teste, avaliaram-se os efeitos de diversos valores de pH (de 2 a 12) e de temperaturas de refrigeração (4°C/24 h), pasteurização (65°C/30 min, 100°C/10 min) e esterilização (121°C/10 min) sobre a atividade da bacteriocina produzida por *Lc. lactis subsp. hordniae* CTC 484 (Tabela 5).

TABELA 5 – Efeito do pH e tratamento térmico na ação da bacteriocina produzida pela linhagem CTC 484

| pH | Atividade antimicrobiana (UA/mL) ^a | | | | |
|----|---|----------|-------------|--------------|--------------|
| | controle | 4°C/24 h | 65°C/30 min | 100°C/10 min | 121°C/10 min |
| 2 | 1.600 | 1.600 | 1.600 | 1.600 | 800 |
| 4 | 1.600 | 1.600 | 1.600 | 1.600 | 800 |
| 6 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| 7 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| 8 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| 9 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| 10 | 800 | 400 | 800 | 800 | 200 |
| 12 | 200 | 0 | 200 | 200 | 0 |

^a*B. cereus* CTC 001 foi utilizado como microorganismo indicador

Os efeitos do tratamento a 4°C/24 h, em diferentes valores de pH na atividade da bacteriocina, mostrou um nível máximo de 1.600 UA/mL em valores de pH entre 2 e 4. Esta sofreu perda de 50% de sua atividade entre os valores de pH 6 a 9 e de 75% no pH 10. Em pH 12 houve uma completa inativação da atividade da bacteriocina.

Comparativamente à temperatura de refrigeração, tratamentos térmicos a 65°C/30 min e 100°C/10 min não reduziram valores de atividades antimicrobianas na faixa de pH entre 2 e 9. Em valores de pH 10 e 12, as atividades foram superiores às obtidas durante a refrigeração: 800 e 200 UA/mL, respectivamente.

Após o tratamento de esterilização (121°C/10 min), o composto antimicrobiano, produzido pela linhagem CTC 484, mostrou que mesmo sob elevadas temperaturas, mantém-se ainda ativo entre os valores de pH de 2 a 10, apresentando atividade de 800 AU/mL até pH 9. O composto sofreu uma perda de 75% de sua atividade a pH 10 e destruição completa a pH 12.

A atividade da bacteriocina CTC 484 foi detectada durante os tratamentos térmicos e temperatura de refrigeração, sob condições ácidas e alcalinas. Esta característica reflete a capacidade deste composto em se adaptar às condições dos alimentos, nas quais a bactéria produtora poderá vir a se desenvolver. Outras bacteriocinas, como nisina e lactoestrepina, apresentam atividades antimicrobianas dependentes das condições de pH. Nisina tem um efeito bactericida, que se intensifica à medida que ocorre o decréscimo do valor de pH [3]. Esta resposta pode ser atribuída não apenas à desnaturação deste composto sob condições de valores maiores de pHs, mas também, aos efeitos danosos das condições ácidas sobre as células-alvo, aliadas à alta estabilidade e solubilidade da nisina [34]; assim como pelo aumento de sua carga líquida positiva [19]. As lactoestrepcinas, por sua vez, são estáveis e ativas em valores de pH entre 4,2 e 5 e reversivelmente inativadas nos valores de pH 7 e 8 [28]. Contudo, algumas bacteriocinas têm se mostrado resistentes a condições extremas de pH: acidocina B, produzida por *Lb. acidophilus* M46 [51], bavaricina A, produzida por *Lb. bavaricus* MI401 [29] e a bacteriocina produzida por *Lc. lactis subsp. diacetylactis* [27].

3.5 - Efeito da temperatura no desenvolvimento e produção de bacteriocina cultura CTC 484

Alguns critérios importantes na avaliação de um composto antimicrobiano referem-se: ao crescimento celular da bactéria produtora, atividade da substância inibidora e variação do pH em diferentes temperaturas testadas. Nos resultados apresentados na Tabela 6, verificou-se que em temperatura favorável ao cultivo de bactéria láctica (37°C), o desenvolvimento celular da cultura CTC 484 foi maior comparativamente às demais temperaturas, atingindo uma densidade elevada após 18 h de incubação ($DO_{600}=0,654$), mantendo-se praticamente constante até o final da incubação. A produção de bacteriocina foi máxima (400 UA/mL) a partir de 16 h de incubação, mantendo-se neste nível, por 24 h, ao passo que, em 48 h houve uma redução da atividade em 50%, cessando após 114 h.

Em temperatura considerada abusiva para o armazenamento de carnes e derivados (25°C), o desenvolvimento da cultura CTC 484 foi inferior àquele observado a 37°C. A 25°C, a densidade aumentou 57,3% após 20 h de incubação ($DO_{600}=0,626$), sendo que, a partir daí, houve uma queda constante de densidade, indicando uma possível autólise celular desta bacteriocina [40]. A produção apresentou rendimento máximo de 800 UA/mL entre 16 e 18 h de incubação, quando então observou-se uma redução de 50% desta atividade no período compreendido entre 20 e 48 h e de 75% entre 114 e 162 h.

Em temperatura de refrigeração, esta linhagem apresentou um crescimento mais lento, quando comparado às temperaturas superiores testadas. Neste caso, a densidade celular máxima foi atingida após 162 h de incubação ($DO_{600}=0,666$), representando um aumento de 62,2% na taxa de crescimento desta linhagem. A máxima produção de bacteriocina ocorreu após 18 h de incubação, seguida de redução de 50% entre 20 e 48 h e de 75% entre 114 e 162 h.

A temperatura de congelamento não permitiu o desenvolvimento e subsequente produção de bacteriocina pela linhagem testada. A densidade inicial foi reduzida em 12,3% ($DO_{600}=0,322$) após as 24 h iniciais, apresentando queda gradual até o término do período de observações. Sob esta condição de temperatura, os alimentos congelados poderiam ser preservados pela adição direta da bacteriocina produzida por esta linhagem.

Ao longo do desenvolvimento celular, houve uma concomitante queda dos valores de pH nas condições de incubação a 37°C, 25°C e 4°C. A variação do valor de pH não foi significativa devido à ausência de crescimento a 0°C.

Interessante destacar que, embora a cultura CTC 484 tenha alcançado menor densidade celular em condições de refrigeração que em temperatura usual de crescimento, a produção de bacteriocina foi inicialmente detectada no mesmo período (16 h) para ambas as temperaturas, tendo alcançado maior valor de atividade a 4°C (800 UA/mL), enquanto estabilidade mais elevada foi apresentada a 4 e 25°C do que a 37°C. Portanto, a temperatura considerada ótima para o crescimento celular, muitas vezes é diferente daquela necessária para a síntese mais intensa da bacteriocina.

TABELA 6 – Efeito da temperatura sobre o crescimento e produção de bacteriocina da cultura CTC 484

| Tempo (h) | 37°C | | | 25°C | | | 4°C | | | 0°C | | |
|-----------|------------------|------------------|------|-------|-----|------|-------|-----|------|-------|-----|------|
| | Abs ^a | Atv ^b | pH | Abs | Atv | pH | Abs | Atv | pH | Abs | Atv | pH |
| 0 | 0,228 | 0 | 6,5 | 0,267 | 0 | 6,47 | 0,252 | 0 | 6,45 | 0,367 | 0 | 6,28 |
| 16 | 0,638 | 400 | 4,62 | 0,608 | 800 | 5,65 | 0,334 | 400 | 6,25 | - | - | - |
| 18 | 0,654 | 400 | 4,60 | 0,613 | 800 | 5,04 | 0,356 | 800 | 6,24 | - | - | - |
| 20 | 0,654 | 400 | 4,54 | 0,626 | 400 | 5,48 | 0,402 | 400 | 6,14 | - | - | - |
| 22 | 0,650 | 400 | 4,53 | 0,618 | 400 | 4,89 | 0,430 | 400 | 6,12 | - | - | - |
| 24 | 0,634 | 400 | 4,5 | 0,604 | 400 | 4,84 | 0,431 | 400 | 6,08 | 0,322 | 0 | 6,28 |
| 48 | 0,700 | 200 | 4,5 | 0,584 | 400 | 4,72 | 0,560 | 400 | 5,82 | 0,316 | 0 | 6,28 |
| 114 | 0,666 | 0 | 4,5 | 0,546 | 200 | 4,54 | 0,631 | 200 | 5,30 | 0,288 | 0 | 6,3 |
| 162 | 0,648 | 0 | 4,48 | 0,538 | 200 | 4,46 | 0,666 | 200 | 5,18 | 0,282 | 0 | 6,3 |

^aAbs – Absorbância (600 nm). ^bAtv – Atividade da bacteriocina (UA/mL). -- não realizado

O efeito combinado de temperatura e pH ótimos para produção da bacteriocina podem ser diferentes daqueles necessários para a estabilidade da mesma, conforme observado neste estudo, no qual a bacteriocina CTC 484 apresentou maior estabilidade em faixa de pH mais elevado a 4°C e a 25°C que a 37°C. De acordo com MATARAGAS *et al.* [37], o controle das condições ambientais parece desempenhar uma importante função na produção de bacteriocina. Resultados de seus estudos com as bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* L124 e *Lactobacillus curvatus* L442 mostraram que a produção destas bacteriocinas foi afetada pela manipulação dos valores de pH e da temperatura. As condições ótimas de produção das bacteriocinas não coincidiram com as do crescimento bacteriano. Os valores de pH e temperatura para o crescimento foram de 6 a 6,5 a 30°C e, para a produção de bacteriocina, pH 5,5 a 25°C.

De acordo com HUGAS *et al.* [17], a produção máxima de sakacina K por *Lactobacillus sake* CTC 494 foi detectada após 7 dias a 4°C, enquanto a 25°C, esta substância foi detectada após 9 h. A taxa de crescimento celular aumentou de acordo com a temperatura, atingindo um máximo a 30°C, porém a produção de bacteriocina foi mais elevada em temperaturas mais baixas. Contudo, YANG & RAY [55] relataram que a quantidade de bacteriocina produzida pela bactéria láctica isolada de produtos cárneos embalados a vácuo era de duas a três vezes maior em temperaturas abusivas (25°C) do que de refrigeração (4°C). Estudos demonstraram que a nisina apresenta baixa atividade com a diminuição das temperaturas (inferiores a 7°C) [1]. Nestas condições, a alteração da disposição das moléculas, constituídas por cadeias de lipídeos e carboidratos na membrana citoplasmática de alguns microorganismos, ocasionam diminuição da fluidez da mesma podendo inibir a inserção deste composto.

Estudos atuais sobre compostos antimicrobianos têm sido direcionados aos determinantes genéticos e modo de ação de várias bacteriocinas [24, 52, 54]. Porém, um dos pré-requisitos para a caracterização destes compostos se baseia no fato de que os níveis de bacteriocinas produzidos devem ser elevados para a obtenção de teores suficientes de proteína para sua purificação. Os níveis de bacteriocina nos sobrenadantes raramente excedem 5.000 UA/mL, sendo que, em geral, na ausência de condições controladas de pH estes se encontram abaixo de 1.000 UA/mL.

A produção de bacteriocina por bactérias lácticas é um processo associado ao crescimento do microorganismo [31, 32]. Como consequência, as condições ambientais que estimulam o crescimento celular frequentemente permitem uma produção satisfatória de bacteriocina [33]. Os níveis de bavaricina MN, bacteriocina produzida por *Lactobacillus bavaricus* MN, obtida em condições controladas de pH, aumentou aproximadamente 12 vezes nos valores de pH de 6,5 a 6 [23]. Neste trabalho, também foi evidenciada a influência do meio de cultura sobre a produção de bacteriocina: a adição de extrato de carne (3,0 g/L) ao caldo APT resultou na elevação da taxa de crescimento da cultura e aumento de sua produção.

3.6 - Verificação da ação da bacteriocina em carne bovina

O efeito da ação de *Lc. lactis subsp. hordniae* CTC 484, sobre o crescimento da população de *L. monocytogenes* CTC 021 em amostras de carne bovina moída e esterilizada, armazenadas a 4°C e 25°C foi examinado. Esta linhagem foi utilizada como indicadora devido à sua sensibilidade à bacteriocina produzida pela bactéria láctica.

A contaminação de alimentos por *L. monocytogenes* representa um sério problema para a saúde pública, devido à capacidade deste patógeno se multiplicar em temperaturas de refrigeração, se desenvolver em uma extensa faixa de pH, em valores de atividade de água menores que 0,93 e em concentrações elevadas de cloreto de sódio [20]. A ampla distribuição deste microorganismo na natureza e sua associação com animais domésticos fazem com que sua presença ocasional seja inevitável em carnes e produtos cárneos [22]

Na amostras de carne bovina esterilizada, armazenadas a 4°C (Figura 1), o número de células de *L. monocytogenes* na amostra-teste (inoculada com a cultura CTC 484), assim como na amostra-controle (não inoculada com a cultura CTC 484), apresentou pequena variação até o 3º dia de armazenamento. A partir do 6º dia de armazenamento, observou-se que a população de *L. monocytogenes* apresentou um aumento de contagens nas amostras-controle em relação às amostras-teste com diferenças de 0,6; 1,6; e 0,8 ciclos log no 9º, 13º e 16º dias, respectivamente. Nas amostras armazenadas a 25°C (Figura 2), observou-se que as contagens de *L. monocytogenes* no início do armazenamento eram de cerca de 7 log₁₀ UFC/g para as amostras-teste e controle. No 3º dia de armazenamento, a população de *L. monocytogenes* nas amostras-teste foi inferior em 1 ciclo log, comparativamente à amostra-controle.

Com exceção do 6º dia, quando não se observaram diferenças nas contagens do microorganismo entre as amostras, verificou-se que as amostras-teste apresentaram contagens inferiores ao controle, com diferenças de 0,7 e 1 ciclo log no 9º e 13º dias de armazenamento, respectivamente. As mudanças dos valores de pH das amostras não

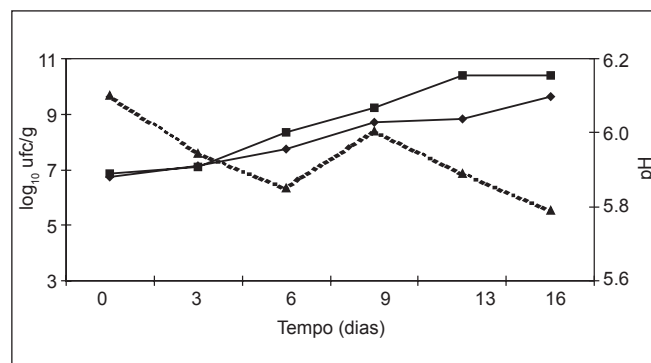


FIGURA 1 – Crescimento de *L. monocytogenes* em amostras de carne bovina moída tratadas termicamente, armazenadas sob refrigeração (4°C)

(◆) em ausência da cultura CTC 484; (■) em presença da cultura CTC 484; (▲) valor de pH

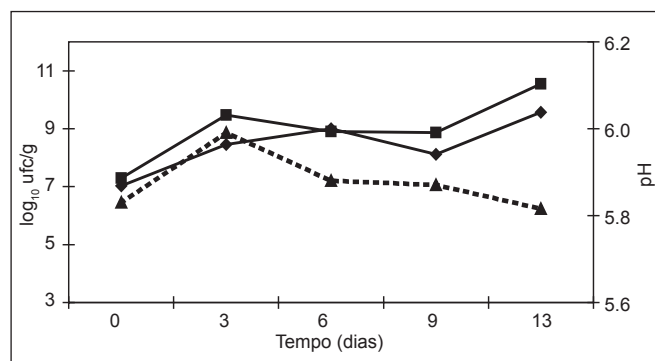


FIGURA 2 – Crescimento de *L. monocytogenes* em amostras de carne bovina moída tratadas termicamente, armazenadas sob temperatura abusiva (25°C)

(◆) em ausência da cultura CTC 484; (■) em presença da cultura CTC 484; (▲) valor de pH

foram significativas para explicar as inibições detectadas no crescimento dos microorganismos em ambas as temperaturas testadas.

Alguns fatores podem influenciar a ação de bacteriocinas em carnes. Como as contagens foram realizadas em amostras individuais, pode ter ocorrido uma maior interação da bacteriocina com os componentes da carne, principalmente a gordura, podendo promover uma redução da atividade do composto em questão [46]. Outros fatores de relevância como inativação por proteases, distribuição desigual do composto no alimento, limitação da difusão da bacteriocina [30, 46], ligação com as partículas da carne [48] e proporção adequada entre bacteriocinas e células-alvo [41], são considerados de importância.

Reduções da população de *L. monocytogenes*, observadas neste estudo, são comparáveis com as descritas na literatura. SCHILLINGER *et al.* [46] relataram que *L. monocytogenes* foi inibida por até uma semana em carne picada, na presença de *Lactobacillus sake* Lb 706 produtor de sakacina A. A inibição de cerca de um ciclo logarítmico, apresentada pela cepa de *Lb. sake* Lb 706, não foi detectada na presença de uma linhagem similar não produtora de bacteriocina. FOEGEDING *et al.* [11] utilizaram *Pediococcus acidilactici* PAC 1 para a produção de pediocina *in situ* durante o preparo de um tipo de salsicha fermentada. Esses autores observaram que o *Pediococcus*, produtor de bacteriocinas, foi capaz de reduzir a viabilidade de *L. monocytogenes* em mais de dez vezes, quando comparado à redução ocasionada pela produção de ácido de uma cultura não bacteriocinogênica. CAMPOS *et al.* [5] verificaram que, sob estocagem a 8°C, houve redução de 2 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* em carne de frango, ocasionada pela ação de uma linhagem da bactéria *Carnobacterium pscicola* não produtora de bacteriocina.

No entanto, foi observada uma redução de 2 ciclos logarítmicos adicionais, devido à ação de uma cepa de mesma espécie produtora de bacteriocina. STILES & HASTINGS [49] relataram que a presença de uma cepa de *Lb. sake* produtora de sakacina A inibiu o crescimento de *L. mo-*

nocytogenes durante estocagem das amostras de carne a 8°C durante 6 dias, enquanto em amostras sem bactérias lácticas, a contagem de *L. monocytogenes* apresentou um aumento de 3 ciclos logarítmicos.

Conforme os resultados obtidos neste estudo, a temperatura não contribuiu diretamente para um aumento da inibição do crescimento da *L. monocytogenes*. Porém, foi possível se manter as amostras armazenadas a 4°C por um período de tempo mais prolongado (16 dias) do que as amostras estocadas a 25°C (13 dias), sem a ocorrência de contaminação secundária.

DEGNAN *et al.* [9] avaliaram a capacidade de *Pediococcus acidilactici* JBL 1095 produzir bacteriocina e inibir *L. monocytogenes* em amostras de salsichas formuladas com carne bovina e embaladas a vácuo, mantidas a 4°C ou a 25°C. Conforme observado, a 4°C não houve produção de bacteriocina, enquanto a 25°C, em presença de *P. acidilactici* JBL 1095, houve uma redução de 2,7 ciclos logarítmicos no número de células de *L. monocytogenes*. Por outro lado, outros autores observaram a ocorrência de um efeito sinérgico entre temperaturas de refrigeração e a ação antimicrobiana de bacteriocinas. De acordo com LUCKANSKI *et al.* [35], a inibição de *L. monocytogenes* por células de *P. acidilactici* inoculadas em salsichas não foi verificada após estocagem a 25°C, porém ocorreu sob refrigeração a 4°C.

4 - CONCLUSÕES

A bacteriocina produzida por *Lc. lactis ssp. hordinae* CTC 484 apresenta potencial de aplicação para preservação de carnes, atuando como cultura bioprotetora desse alimento. Esta apresenta amplo espectro de atividade inclusive frente a bactérias patogênicas, como *Cl. perfringens*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*; estabilidade em temperaturas de refrigeração, pasteurização e esterilização e, em uma ampla faixa de valores de pH.

O microorganismo produtor apresenta desenvolvimento em diversas temperaturas, principalmente nas de refrigeração, além de capacidade de produzir quantidade suficiente de bacteriocina para suprimir o crescimento de *L. monocytogenes* em carne bovina, propriedade esta que adiciona ao produto um fator de segurança. Estudos para se otimizar a produção deste composto, assim como para se obter o mesmo em sua forma purificada, se encontram em fase de desenvolvimento.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T.; ROMBOUTS, F.M.; HUGENHOLTZ, J.; GUIHARD, G.; LETELLIER, L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 6, p. 1962-1968, 1994.
- BARAKAT, R.K.; GRIFFITHS, M.W.; HARRIS, L.J. Isolation and characterization of *Carnobacterium, Lactococcus*, and *Enterococcus spp.* from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, p. 83-94, 2000.

- [3] BOUTTEFROY, A.; MANSOUR, A.; LINDER, M.; MILLIERE, J.B. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 54, n. 1-2, p. 109-115, 2000.
- [4] BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, p. 1-8, 2004.
- [5] CAMPOS, C.A.; MAZZOTTA, A.S.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* in chicken at refrigeration temperatures. In: **Annual Meeting of the Institute of Food Technologists**. Orlando, Book of Abstracts, n. 79B-2, Orlando, IFT, ref. 230-231, 1997.
- [6] CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, p. 131-149, 1999.
- [7] CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf.**, v. 2, p. 82-100, 2003.
- [8] CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 71, p. 1-20, 2001.
- [9] DEGNAN, A.J.; YOUSEF, A.E.; LUCHANSKY, J.B. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. **J. Food Prot.**, v. 55, n. 2, p. 98-103, 1992.
- [10] ELORTONDO, F.J.P.; ALBISU, M.; BARCINA, Y. Changes in the microflora of Idiazábel cheese with the commercial lactic starters. **Aust. J. Dairy Technol.**, v. 48, p. 10-13, 1999.
- [11] 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.**, v. 58, p. 884-890, 1992.
- [12] GÄNZLE, M.G.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 48, p. 37-50, 1999.
- [13] GARVER, K.I.; MURIANA, P.M. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 19, p. 241-258, 1993.
- [14] HAMMES, W.P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. In: **International Congress of Meat Science and Technology. Meat Consumption and Culture**. 44th, Barcelona, Proceedings of ..., Madrid, Estrategias Alimentarias S.L. – EUROCARNES, p. 182-191, ISBN 84-930010-0-7, 1998.
- [15] HARRIGAN, W.F.; McCANCE, M.E. **Basic methods. In: HARRIGAN, W.F.; McCANCE, M.E. (ed.) Laboratory methods in food and dairy microbiology. London, Academic Press, p. 1-115, ISBN 0-12-326040-X., 1976.**
- [16] HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Sci.**, v. 49, Supplement 1, S139-S150, 1998.
- [17] HUGAS, M.; PAGÉS, F.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.M. **Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres.** **Food Microbiol.**, v. 15, p. 639-650, 1998.
- [18] IVANOVA, I.; MITEVA, V.; STEFANOVA, Ts.; PANTEV, A.; BUDAKOV, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; NIKOLOVA, I.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 42, p. 147-158, 1998.
- [19] JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 171-200, 1995.
- [20] JAY, J.M. Foodborne Listeriosis. In: JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6th ed., Gaithersburg: NA Aspen Publication, Chap. 25, p. 485-510, 2000.
- [21] JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RIOS-SÁNCHEZ, R.M.; DESMAZEAUD, M.; RUIZ-BARBA, J.L.; PIARD, J.C. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 1.416-1.424, 1993.
- [22] JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in meat and meat products a review. **J. Food Prot.**, v. 53, n. 1, p. 81-91, 1990.
- [23] 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. Bacteriol.**, v. 75, p. 536-540, 1993.
- [24] KEMPERMAN, R.; KUIPERS, A.; KARSENS, H.; NAUTA, A.; KOK, J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 3, p. 1.589-1.597, 2003.
- [25] KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie.**, v. 70, p. 337-349, 1988.
- [26] KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 39-86, 1993.
- [27] KOJIC, M.; SVIRCEVIC, J.; BANINA, A.; TOPISIROVIC, L. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1.835-1.837, 1991.
- [28] KOZAK, W.; BARDOWSKI, J.; DOBRZANSKI, W.T. Lactostreptocins acid bacteriocins produced by lactic streptococci. **J. Dairy Res.**, v. 45, n. 2, p. 247-257, 1978.
- [29] LARSEN, A.G.; VOGENSEN, F.K.; JOSEPHSEN, J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolate from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, p. 113-122, 1993.
- [30] LAUKOVÁ, A.; CZIKKOVÁ, S.; LACZKOVÁ, S.; TUREK, P. Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented hornar salami. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 52, n. 1/2, p. 115-119, 1999.
- [31] LEROY, F.; DE VUYST, L. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin k. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 3, p. 974-981, 1999a.

- [32] LEROY, F.; DE VUYST, L. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC494, a potential starter culture for sausage fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 12, p. 5350-5356, 1999b.
- [33] LEROY, F.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 72, p. 155-164, 2002.
- [34] LIU, W.; HANSEN, N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 8, p. 2.551-2.558, 1990.
- [35] LUCHANSKY, J.B.; GLASS, K.A.; HARSONO, K.D.; DEGNAN, A.J.; FAITH, N.G.; CAUVIN, G.; BACCUS-TAYLOR, G.; ARIHARA, K.; BATER, B.; MAURER, A.J.; CASSENS, R.G. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in Turkey summer sausage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3.053-3.059, 1992.
- [36] LÜCKE, F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Sci.**, v. 56, p. 105-115, 2000.
- [37] MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M.; DROSINOS, E.H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Sci.**, v. 64, p. 265-271, 2003.
- [38] MAUGUIN, S.; NOVEL, G. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 76, p. 616-625, 1994.
- [39] MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (ed.) **Methods in Microbiology**. New York, Academic Press Inc., v. 7A, p. 315-422, ISBN 0-12-521546-0, 1972.
- [40] MORENO, I. **Efeito da autólise na proteólise de queijo prato**. São Paulo, 1995, 180p. Dissertação (doutor em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo (USP).
- [41] MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. **J. Food Prot.**, Supplement, p. 54-63, 1996.
- [42] NOONPAKDEE, W.; SANTIVARANGKNA, C.; JUMRIANGRIT, P.; SONOMOTO, K.; PANYIM, S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 81, p. 137-145, 2003.
- [43] PIARD, J.C.; DELORME, F.; GIRAFFA, G. COMMISSAIRE, J.; DESMAZEAUD, M. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 44, p. 143-158, 1990.
- [44] RODRIGUEZ, J.M.; CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HORN, N.; DODD, H.M.; HERNANDEZ, P.E.; GASSON, M.J. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 109-115, 1995.
- [45] SCANNELL, A.G.M.; SCHWARZ, G.; HILL, C.; ROSS, R.P.; ARENDT, E.K. Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 64, p. 151-159, 2001.
- [46] SCHILLINGER, U.; KAYA, M.; LÜCKE, F.K. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sakei*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 70, p. 473-478, 1991.
- [47] SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F-K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1.901-1.906, 1989.
- [48] SCOTT, V.N.; TAYLOR, S.L. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 117-120, 1981.
- [49] STILES, M.E.; HASTINGS, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria. **Trends Food Sci. Technol.**, p. 247-251, oct., 1991.
- [50] TAGG, J.R.; DAJANI A.S.; WANNAMAKER L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 40, p. 722-756, 1976.
- [51] TEN BRINK, B.; MINEKUS, M.; VAN DER VOSSEM, 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.**, v. 77, p. 140-148, 1994.
- [52] VAN REENEM; CHICKINDAS, M.L.; VAN ZYL, W.H.; DICKS, L.M.T. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 81, p. 29-40, 2002.
- [53] VAUGHAN, E.E.; FITZGERALD, G.F. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, p. 299-308, 1992.
- [54] VENEMA, K.; VENEMA, G.; KOK, J. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. **Trends Microbiol.**, v. 3, n. 8, p. 299-304, 1995.
- [55] YANG, R.; RAY, R. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. **J. Food Prot.**, v. 57, p. 209-217, 1994.

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) - processo 99/12314-0 -, pelo apoio financeiro concedido.