

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR SEIS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE PRODUTOS CÂRNEOS EMBALADOS A VÁCUO¹

Elaine C. P. DE MARTINIS^{2,*}, Priscila R. SANTAROSA², Flávia Z. FREITAS²

RESUMO

No presente trabalho, foram estudadas as bacteriocinas produzidas por seis linhagens bacterianas: duas culturas *Lactobacillus sake*, duas de *Lactobacillus curvatus*, uma de *Leuconostoc mesenteroides*, uma de *Leuconostoc* sp 12. As atividades inibitórias foram quantificadas pelo método da diluição crítica, utilizando-se os indicadores *Lactobacillus sake* ATCC 15521 e *Listeria monocytogenes*. As bacteriocinas produzidas foram caracterizadas também quanto à sensibilidade a enzimas, faixa de temperatura na produção, termoestabilidade, estabilidade em diferentes pHs e modo de ação (bactericida ou bacteriostático) frente a *Listeria monocytogenes*. Nenhuma bacteriocina foi destruída pela pepsina, mas todas foram sensíveis à proteinase K, tripsina e α -amilase (exceto a bacteriocina produzida por *Leuconostoc* sp 12, que foi insensível a α -amilase). *Lactobacillus sake* 1, *Leuconostoc mesenteroides* 11 e *Lactobacillus sake* 16 apresentaram atividade antilisterial, sendo a maior inibição observada para *Lactobacillus sake* 1 e *Leuconostoc mesenteroides* 11 (12.800UA/mL). *Lactobacillus sake* 1 e *Lactobacillus curvatus* 5 produziram as bacteriocinas mais termoestáveis. *Lactobacillus sake* 1 produziu a bacteriocina com maior estabilidade a variações de pH. Todas as bactérias lácticas produziram bacteriocina entre 4°C e 30°C, sendo esta propriedade muito interessante para futuras aplicações em produtos cárneos refrigerados.

Palavras-chave: bacteriocinas; bactérias lácticas; caracterização; *Listeria monocytogenes*.

SUMMARY

PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF BACTERIOCINS PRODUCED BY SIX LACTIC ACID BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM VACUUM-PACKAGED MEAT PRODUCTS. In this work, the bacteriocins produced by six bacterial strains were studied (*Lactobacillus sake* 1, *Lactobacillus curvatus* 5, *Leuconostoc mesenteroides* 11, *Leuconostoc* sp 12, *Lactobacillus curvatus* 14 and *Lactobacillus sake* 16). Title of inhibitory activity was determined by critical dilution assay, using *Lactobacillus sake* ATCC 15521 and *Listeria monocytogenes* as indicator microorganisms. The inhibitory compounds were also characterized with respect to stability to the action of enzymes, thermostability, stability in several pHs and mode of action (bactericide or bacteriostatic) towards *Listeria monocytogenes*. No bacteriocin was destroyed by pepsin, but all of them were destroyed by proteinase K, trypsin and α -amylase (except that α -amylase did not inactivate the bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp 12). *Lactobacillus sake* 1, *Leuconostoc mesenteroides* 11 and *Lactobacillus sake* 16 exerted antilisterial activity. The more active strains against *Listeria monocytogenes* were *Lactobacillus sake* 1 and *Leuconostoc mesenteroides* 11 (12.800 AU/ml). Bacteriocins produced by *Lactobacillus sake* 1 and *Lactobacillus curvatus* 5 presented the highest thermal stability. The bacteriocin of *Lactobacillus sake* 1 was the most stable to pH variations. All LAB produced bacteriocin in the range of temperature from 4°C to 30°C and this property is of great interest for future applications in refrigerated meat products.

Keywords: bacteriocins; lactic acid bacteria; characterization; *Listeria monocytogenes*.

1 – INTRODUÇÃO

As bactérias lácticas (LAB) despertam interesse devido ao seu potencial de utilização no biocontrole em alimentos. Elas podem exercer atividade inibitória frente a outras bactérias devido à competição direta por nutrientes e pela produção de compostos antagonísticos como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas [3, 4, 10, 21].

Até o momento, a nisina é a única bacteriocina permitida para uso em cerca de 50 países [5], incluindo o Brasil onde ela é aprovada para uso em todos os tipos de queijos, e também aplicada na superfície externa de salsichas de diferentes tipos [1, 2, 16].

Entretanto, seu uso em carnes pode ser limitado por interações com esse tipo de alimento [8, 25], e até inativação pela enzima glutatona S-transferase de músculo bovino [23].

¹ Recebido para publicação em 22/08/2001. Aceito para publicação em 27/09/2002 (000727).

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Av. do Café s/n, CEP 14040-90, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Fone: 55166024267. Fax: 5516 6331936. E-mail: edemart@fcrp.usp.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

Neste trabalho, foram caracterizadas algumas propriedades de bacteriocinas de bactérias lácticas.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Linhagens bacterianas

Foram estudadas seis linhagens de bactérias lácticas isoladas a partir de produtos cárneos brasileiros [7]. A origem e a identificação das referidas cepas estão mostradas na Tabela 1.

TABELA 1. Linhagens bacteriocinogênicas estudadas neste trabalho.

Linhagem	Cultura	Fonte de isolamento
<i>Lactobacillus sake</i>	1	lingüiça de pernil
<i>Lactobacillus curvatus</i>	5	salsicha
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	11	peito de frango
<i>Leuconostoc</i> sp.	12	lingüiça de frango
<i>Lactobacillus curvatus</i>	14	salsicha
<i>Lactobacillus sake</i>	16	bacon

As culturas de bactérias lácticas bacteriocinogênicas foram mantidas como culturas-estoque a -70°C em caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS) adicionado de 20% de glicerol.

Foi utilizada uma linhagem de *Listeria monocytogenes* isolada de peito de frango.

2.2 – Perfil de sensibilidade a enzimas

Para esta determinação, as bactérias lácticas foram cultivadas em caldo MRS a 25°C por 24 horas e avaliadas conforme LEWUS, KAISER, MONTVILLE [17], empregando-se soluções enzimáticas esterilizadas numa concentração de 10mg/mL. Foram utilizadas as enzimas pepsina A (Sigma, de mucosa de estômago suíno), proteinase K (Sigma, de *Tritirachium album*), tripsina (Sigma, de pâncreas bovino) e α -amilase (Sigma, tipo XII-A de *Bacillus licheniformis*).

2.3 – Quantificação da atividade bacteriocinogênica

A quantificação da atividade bacteriocinogênica foi realizada pelo ensaio da diluição crítica, conforme preconizado por MAYR-HARTING, HEDGES, BERKELEY [20]. Foi utilizado o sobrenadante das bactérias após desenvolvimento em caldo MRS (0,5 e 2,0% de glicose) a 25°C por 24 horas, utilizando como microrganismos indicadores *Lactobacillus sake* ATCC 15521 e *Listeria monocytogenes*.

2.4 – Determinação do efeito da temperatura de incubação na produção de bacteriocinas

A avaliação da temperatura de produção de bacteriocinas foi realizada com modificações da técnica “spot-on-the-lawn” descrita por LEWUS, KAISER, MONTVILLE [17]. As culturas estoques das bactérias lácticas foram inoculadas em caldo MRS a 30°C por 24 horas. Dois microlitros das culturas foram depositados na superfície de placas de Ágar Soja Trypticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Oxoid) e as placas foram mantidas a 4, 10, 15 e 30°C por quatro dias sob anaerobiose. Decorrido o período de incubação, as placas foram recobertas com 8mL de caldo BHI (infusão de cérebro-coração, Oxoid) contendo 1% de ágar bacteriológico (Oxoid), inoculado com 10^5 - 10^6 células de *Lactobacillus sake* ATCC 15521. As placas foram reincubadas a 30°C por 18 a 24 horas, em anaerobiose. O raio de cada halo de inibição foi medido (em mm) a partir da borda da cultura produtora até a borda do halo.

2.5 – Estabilidade térmica

As culturas foram reativadas em caldo MRS a 30°C e foram centrifugadas a 7.500rpm por 15 minutos, a 4°C , em centrífuga refrigerada (marca Beckman, modelo Avanti J-25). O sobrenadante de cada cultura foi neutralizado com NaOH 10 N e esterilizado por filtração em membrana com poros de $0,22\mu\text{m}$ com baixa capacidade de ligação de proteínas (GVWP Durapore, Millipore). Os tubos de ensaio foram aquecidos a 60°C por 0, 10, 15, 30 e 60 minutos e a 100°C por 0, 5, 10, 15 e 20 minutos. Decorridos os tempos selecionados, os tubos foram imediatamente mergulhados em banho de gelo. A quantificação da atividade bacteriocinogênica nos sobrenadantes assim preparados foi realizada pelo ensaio da diluição

crítica, conforme preconizado por MAYR-HARTING, HEDGES, BERKELEY [20], utilizando *Lactobacillus sake* ATCC 15521 como microrganismo indicador.

2.6 – Estabilidade em diferentes pHs

O pH de sobrenadantes obtidos a partir das bactérias lácticas cultivadas em caldo MRS a 25°C por 24 horas foram ajustados para pH 2,0, 4,0, 8,0 e 10,0 utilizando-se HCl 10 N ou NaOH 10 N e esterilizados por filtração em membrana com poros de $0,22\mu\text{m}$ com baixa capacidade de ligação de proteínas (GVWP Durapore, Millipore). Os sobrenadantes esterilizados foram mantidos a 10°C por 24 horas e foi determinado o título da preparação em Unidades Arbitrárias por mL, segundo MAYR-HARTING, HEDGES, BERKELEY [20], empregando-se *Lactobacillus sake* ATCC 15521 como indicador.

2.7 – Determinação da atividade bactericida ou bacteriostática frente a *L. monocytogenes*

Neste ensaio, foram utilizadas apenas as bactérias lácticas com atividade antilisterial reconhecida de acordo com trabalho anterior [7]: *Lactobacillus sake* 1 e 16; *Leuconostoc mesenteroides* 11. Foi utilizada a técnica de difusão em poços, de acordo com HARRIS *et al* [9], com modificações. As culturas foram reativadas em caldo MRS a 25°C por 24 horas. Este caldo foi centrifugado, neutralizado e esterilizado por filtração em membrana ($0,22\mu\text{m}$, GVWP Durapore, Millipore) para quantificação da atividade bactericida ou bacteriostática segundo LEWUS, KAISER, MONTVILLE [17]. A observação de halos inalterados após a destruição das bacteriocinas pela α -quimiotripsina, seria indicativa de ação bactericida. A reversão da inibição devido à ação da enzima indicaria modo de ação bacteriostático.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as LABs 5 e 14, a adição de glicose a 2% influenciou positivamente a produção de bacteriocinas quando comparada ao caldo MRS contendo 0,5% de glicose. No entanto, as demais cepas demonstraram a mesma atividade para ambos os níveis de glicose testados (Figura 1). RIËTTE *et al* [22], postularam que a influência positiva do teor de glicose na produção de bacteriocinas pode ser devido à ocorrência de um maior aumento da massa celular e a produção de bacteriocinas ocorrer na fase logarítmica do crescimento das culturas.

Quando *Lactobacillus sake* ATCC 15521 foi utilizado como indicador, a maior atividade foi observada para *Lactobacillus curvatus* 5 e 14, com atividade da ordem de 3.200UA/mL (Figura 1).

Os resultados dos ensaios de diluição crítica mostrados na Figura 1 também revelaram que a atividade de *L. sake* 1, *Leuconostoc mesenteroides* 11 e *L. sake* 16 era maior frente a *L. monocytogenes* do que frente a *L. sake* ATCC 15521. As cepas *Lactobacillus sake* 1 e *Leuconostoc mesenteroides* 11 apresentaram um título de 12.800 UA/mL (Figura 1). Essa diferença de sensibilidade para algumas bactérias lácticas e *L. monocytogenes* também foi

observada por MATHIEU *et al* [19], quando analisaram o espectro de inibição de *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides* FR 52.

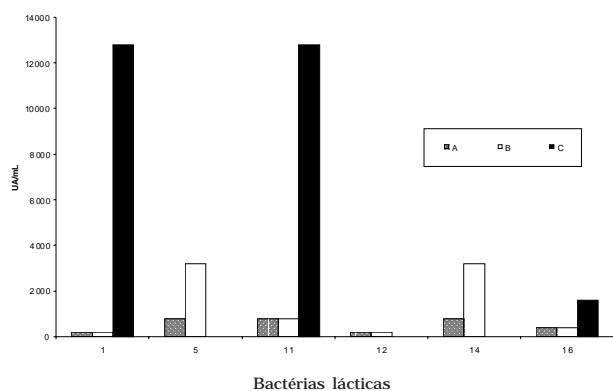


FIGURA 1. Quantificação da produção de bacteriocinas pelo método da diluição crítica (UA/mL). **A**, caldo MRS 0,5% glicose e *Lactobacillus sake* ATCC 15521 como microrganismo indicador; **B**, caldo MRS 2,0% *Lactobacillus sake* ATCC 15521 como microrganismo indicador; **C**, caldo MRS 2,0% e *Listeria monocytogenes* como microrganismo indicador.

Os resultados da Tabela 2 referem-se à sensibilidade dos inibidores produzidos frente a enzimas. Segundo LEWUS, SUN, MONTVILLE [18], o estudo da sensibilidade a enzimas, pode fornecer noções sobre a estrutura da molécula de bacteriocina. Em nosso trabalho, verificamos que os inibidores produzidos pelas seis cepas de bactérias lácticas foram sensíveis a proteinase K, a tripsina e a α -amilase, com exceção do inibidor produzido por *Leuconostoc* sp 12, que foi insensível a α -amilase. Para nenhum dos inibidores, entretanto, foi observada sensibilidade frente à pepsina.

Segundo KEPPLER, GEISEN, HOLZAPFEL [14] a sensibilidade à α -amilase, indica a presença de molécula(s) de carboidrato(s) na estrutura da bacteriocina e, esses autores sugeriram que a fração glicídica seria importante para a atividade da mesma.

No trabalho de RIËTTE *et al* [22] sobre a cepa *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52, foi sugerida uma possível contaminação da α -amilase por proteases, pois foram testadas preparações enzimáticas de dois fornecedores diferentes (Fluka e Sigma), fornecendo resultados discordantes. Estes autores [22] relataram que a amilase da Fluka estava contaminada por proteases. Porém KEPPLER, GEISEN, HOLZAPFEL [14] fizeram ensaios com a bacteriocina de *Leuconostoc carnosum* LA54A que comprovaram que a degradação da mesma não foi devido à presença de proteases contaminantes, e sim, devido à sensibilidade frente a α -amilase. Em nosso trabalho, não achamos provável a hipótese de contaminação da amilase por proteases, uma vez que a enzima que utilizamos é de alta qualidade (Sigma), e também pelo fato de um dos inibidores produzidos (*Leuconostoc* sp. 12) ter se mostrado insensível à amilase utilizada. Entretanto, a purificação e determinação da estrutura primária das bacteriocinas serão necessárias para confirmar esta hipótese.

TABELA 2. Sensibilidade das bacteriocinas produzidas frente a enzimas.

Culturas	Enzimas			
	Pepsina	Proteinase K	Tripsina	α -amilase
LAB 1	-	+	+	+
LAB 5	-	+	+	+
LAB 11	-	+	+	+
LAB 12	-	+	+	-
LAB 14	-	+	+	+
LAB 16	-	+	+	+

- halo de inibição íntegro, a bacteriocina produzida não foi degradada; +, bacteriocina degradada pela enzima.

SCHILLINGER, BECKER, HOLZAPFEL [24], afirmaram que a carnosina 54, estudada por eles, era diferente das bacteriocinas produzidas pela maioria das cepas de *Leuconostoc* devido à sensibilidade à amilase. LEWUS, SUN, MONTVILLE [18], também observaram a sensibilidade frente à α -amilase da bacteriocina de uma cepa de *Leuconostoc paramesenteroides* OX, e concluíram que era de natureza glicoprotéica, sendo ambas estruturas importantes para a atividade bacteriocinogênica.

JIMENEZ-DIAZ *et al* [13] observaram também a sensibilidade da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* LPCO10 a enzimas glicolíticas, sugerindo tratar-se de uma bacteriocina glicoprotéica.

Todas as bacteriocinas das LABs avaliadas em nosso trabalho foram insensíveis à pepsina. Esta propriedade foi também relatada para mesentericina Y105 [11] e para a bacteriocina produzida por *Leuconostoc carnosum* LA44A [22]. Entretanto, em pH 3, MATHIEU *et al* [19] relataram que a mesentericina 52 foi destruída pela pepsina.

Os resultados do ensaio da diluição crítica para a avaliação da estabilidade térmica das bacteriocinas a 60°C e 100°C, estão apresentados na Tabela 3.

As bacteriocinas produzidas por *L. sake* 1 e *L. curvatus* 5 permaneceram estáveis em todos os tempos e temperaturas estudados (60°C por até 60 minutos e a 100°C por até 20 minutos). A bacteriocina produzida pela cepa 11, teve sua atividade reduzida à metade após 10 minutos a 60°C, e manteve esta atividade por até 15 minutos a 60°C. Após 30 minutos a 60°C, sua atividade foi totalmente perdida. A 100°C, a atividade foi reduzida em 50% após 5 minutos, mas manteve o mesmo título por até 20 minutos. A 60°C, a bacteriocina produzida pela cepa 12 foi estável apenas até 15 minutos. A 100°C, esse composto foi estável por 15 minutos, sendo estável apenas parcialmente quando aquecido por 20 minutos nesta mesma temperatura (retenção de 50% da atividade). A cepa 14 teve sua bacteriocina estável por 10 minutos a 60°C e a 100°C. Após 15 minutos (60°C e 100°C), sua atividade foi reduzida em 50%, mantendo o mesmo título por 60 minutos a 60°C e por 20 minutos a 100°C. A bacteriocina produzida pela cepa 16, manteve sua estabilidade por 60 minutos a 60°C e por 15 minutos a 100°C. Após 20 minu-

tos a 100°C, diminuiu pela metade sua atividade.

TABELA 3. Estabilidade térmica (a 60°C e a 100°C) das bacteriocinas das bactérias lácticas (% de atividade em relação ao controle sem tratamento térmico).

Temperatura de tratamento	Tempo	Culturas de bactérias lácticas					
		1	5	11	12	14	16
60°C	0 min.	100	100	100	100	100	100
	10 min.	100	100	50	100	100	100
	15 min.	100	100	50	100	50	100
	30 min.	100	100	0	0	50	100
	60 min.	100	100	0	0	50	100
	100°C	0 min.	100	100	100	100	100
5 min.	100	100	50	100	100	100	
10 min.	100	100	50	100	100	100	
15 min.	100	100	50	100	50	100	
20 min.	100	100	50	50	50	50	

Confrontando os resultados da estabilidade térmica obtidos neste estudo com a proposta de classificação apresentada no trabalho de KLAENHAMMER [15], as bacteriocinas produzidas pelas cepas *L. sake* 1 e *L. curvatus* 5 devem pertencer à classe II (peptídeos termoestáveis). As bacteriocinas de *L. mesenteroides* 11 e *Leuconostoc* sp. 12 são proteínas termolábeis, pertencendo provavelmente às classes III ou IV (proteínas complexas). As bacteriocinas das cepas *L. curvatus* 14 e *L. sake* 16 apresentaram estabilidade térmica moderada, mantendo 50% de suas atividades mesmo após aquecimento a 100°C por 20 minutos, podendo também pertencer à classe II de KLAENHAMMER [15].

O modo de ação das substâncias antagonísticas produzidas por *L. sake* 1, *Leuconostoc mesenteroides* 11 e *L. sake* 16, analisado pela técnica de difusão em poços, permitiu verificar que a inibição de *L. monocytogenes* não foi revertida após a destruição do inibidor pela ação α -quimiotripsina. Isso evidenciou que as bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas destruíram as células do microrganismo alvo e não apenas inibiram sua multiplicação. Sendo assim, de acordo com DE MARTINIS e FRANCO [6], podemos afirmar que as bacteriocinas produzidas pelas cepas 1, 11 e 16 tiveram ação bactericida.

De acordo com a Tabela 4, em pH 4, todas as bacteriocinas foram estáveis a 10°C por 24 horas, sendo que *Lactobacillus sake* 1 produziu a bacteriocina com maior estabilidade a variações de pH, não perdendo atividade quando armazenada a 10°C na faixa de pH de 2 a 10 por 24 horas.

O efeito da temperatura de incubação na produção de bacteriocinas estão representados na Tabela 5.

TABELA 4. Estabilidade das bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas em diferentes pHs, após armazenamento a 10°C por 24 horas (% de atividade em relação ao controle, pH 7).

pH	culturas de bactérias lácticas					
	1	5	11	12	14	16
controle	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	25	50	25
4	100	100	100	100	100	100
8	100	50	100	100	100	100
10	100	50	50	100	100	100

TABELA 5. Efeito da temperatura de incubação na produção de bacteriocinas pelas culturas lácticas, utilizando o ensaio "spot-on-the-lawn" [17], com *Lactobacillus sake* como microrganismo indicador.

culturas	temperaturas experimentadas			
	4°C	10°C	15°C	30°C
1	5,5	4,5	4,0	4,0
5	5,5	8,0	9,5	7,0
11	3,0	3,0	4,0	4,5
12	3,0	3,0	4,0	4,0
14	6,0	7,5	8,0	7,0
16	4,0	2,5	4,0	1,0

(*) raio dos halos medidos em milímetros, a partir da borda da cultura produtora.

A maior produção de bacteriocina para a cepa 1 (*L. sake*) ocorreu em baixas temperaturas, sendo o maior halo observado a 4°C (5,5mm). Para as cepas 5 e 14 (ambas, *L. curvatus*), as temperaturas intermediárias favoreceram a produção de bacteriocinas, sendo os maiores halos observados a 15°C (9,5mm e 8,0mm, respectivamente). Com as cepas 11 (*L. mesenteroides*) e 12 (*Leuconostoc* sp.), foi observada uma tendência de aumento da atividade bacteriocinogênica com o aumento da temperatura. Para a cepa 16 (*L. sake*), a produção de bacteriocina foi maior em temperaturas mais baixas e em temperatura intermediária (4°C e 15°C).

Segundo HUGAS [12] para a utilização de bactérias lácticas bacteriocinogênicas em processos de bioconservação, por meio da adição da cultura produtora viável, é essencial que elas sejam capazes de competir com a microbiota natural. Em nosso trabalho, observamos que todas as cepas bacteriocinogênicas, apresentaram atividade na faixa de temperatura de 4°C a 30°C, conferindo-lhes vantagem competitiva de grande relevância para fu-

turas aplicações em alimentos refrigerados.

4 – CONCLUSÕES

- A presença de glicose a 2% influenciou positivamente a produção de bacteriocina por *Lactobacillus curvatus* 5 e 14.
- *Lactobacillus sake* 1 e *Leuconostoc mesenteroides* 11 apresentaram a maior atividade antilisterial.
- As bacteriocinas produzidas eram de naturezas distintas, apresentando variações quanto à sensibilidade a proteases, estabilidade térmica e estabilidade em diferentes pHs.
- Todas as cepas estudadas produziram bacteriocinas em temperatura de refrigeração.

5 – REFERÊNCIAS

- [1] BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Autorização de uso de produto**. Ofício: AUP/DOI/DIPOA nº 563/98.
- [2] BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Autorização de uso de produto**. Ofício: AUP/DOI/DIPOA nº 161/98.
- [3] DABA, H., PANDIAN, S., GOSSELIN, J. F., SIMARD, R. E., HUANG, J., LACROIX, C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 12, p. 3450-3455, 1991.
- [4] DAESCHEL, M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technol.**, v. 43, n. 1, p. 164-167, 1989.
- [5] DELVES-BROUGHTON, J., BLACKBURN, P., EVANS, R. J., HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 193-201, 1996.
- [6] 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.**, v. 42, p. 119-126, 1998.
- [7] DE MARTINIS, E.C.P., PÚBLIO, M.R.P., SANTAROSA, P.R., FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian J. Microbiol.**, v. 32, p. 32-37, 2001.
- [8] GARCIA, T., MARTIN, R., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. E. Revisión: Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. **Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 35, n.1, p.1-18, 1995.
- [9] 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. 51, p. 29-31, 1989.
- [10] HASTINGS, J. W., STILES, M. E. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 127-134, 1991.
- [11] HECHARD, Y., DÉRIJARD, B., LETELLIER F., CENATIEMPO, Y. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 2725-2731, 1992.
- [12] HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, supl. 1, p. S139-S159, 1998.
- [13] JIMENEZ-DIAZ, R., RIOS-SANCHEZ, R. M., DEZMAZEAUD, 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. 1416-1424, 1993.
- [14] KEPPLER, K., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W. H. An a-amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*. **Food Microbiology**, v. 11, p. 39-45, 1994.
- [15] KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 39-86, 1993.
- [16] LERAYER, A.L.S. A nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais - diet, light e enriquecidos. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora. 1998.
- [17] LEWUS, C. B., KAISER, A., MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacteria pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.
- [18] LEWUS, C. B., SUN, S., MONTVILLE, T. J. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 143-149, 1992.
- [19] MATHIEU, F., SUWANDHI, S., REKHIF, N., MILLIÈRE, J. B., LEFEBVRE, G. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 372-379, 1993.
- [20] MAYR-HARTING, A., HEDGES, A. J., BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. In **Methods in Microbiology**, v. 7a. NORRIS, J.R., RIBBONS, D.W., eds. New York: Academic Press. 1972. p. 313-342.
- [21] Mc MULLEN, L. M., STILES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **J. Food Prot.**, v. 59, suppl., p. 64-71, 1996.
- [22] RIËTTE, L. J. M., van LAACK, SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W. H. Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, p. 183-195, 1992.
- [23] ROSE, N.L., PALCIC, M.M., SPORNS, P., MC MULLEN, L.M. Nisin: a novel substrate for glutathione S-transferase isolated from bovine muscle. **Workshop on the bacteriocins of lactic acid bacteria**. Banff, Canadá. Sessão 3, 28 de abril de 2000.
- [24] SCHILLINGER, U., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H. Antilisterial activity of carnosin 54, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. **Food Microbiology**, v. 12, p. 31-37, 1995.
- [25] STILES, M.E., HASTINGS, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends Food Sci. Technol.**, v.2, p. 247-251, 1991.

6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo Auxílio-Pesquisa 98/10759-2 e pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas a Priscila Rossi Santarosa (99/11689-0) e Flávia Zanolli Freitas (00/02756-5). São gratos também a Profa. Dra. Maria Teresa Destro, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pela doação da cepa de *Listeria monocytogenes* utilizada neste trabalho.