

**ROSINÉA APARECIDA DE PAULA**

**BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS  
DE SALAME TIPO ITALIANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**ROSINÉA APARECIDA DE PAULA**

**BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS  
DE SALAME TIPO ITALIANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de Outubro de 2005.

---

Prof<sup>a</sup> Marisa Vieira de Queiroz  
(Conselheira)

---

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani  
(Conselheiro)

---

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

---

Prof<sup>a</sup> Regina M. Nardi Drummond

---

Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

Com carinho, dedico este trabalho

Aos meus amáveis pais José Geraldo e Margarida.

Aos meus queridos irmãos César, Eduardo, Flávio e Leandro.

Aos meus adoráveis sobrinhos Lucas e Anna Júlia.

Aos meus amados e eternos amigos.

A Deus e a Santa Rita de Cássia, minha protetora.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pela concessão da bolsa de estudos.

Em especial, à professora Célia Alencar de Moraes, pela dedicação, pelos ensinamentos e orientação prestados não somente para a realização deste trabalho, mas para uma vida toda e, principalmente pela amizade e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelos ensinamentos, pelas valiosas críticas e sugestões, pela grande colaboração em todas as etapas deste trabalho e, principalmente, pela preciosa contribuição na publicação dos artigos.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pelo apoio e pela valiosa atenção dispendida neste trabalho.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pela colaboração, valiosas sugestões e, principalmente, pela boa vontade com que aceitou fazer parte deste trabalho.

À Professora Regina Maria Nardi Drummond pelas relevantes contribuições intelectuais e pela competente participação na banca examinadora.

À professora Elza Fernandes Araújo, pelo incentivo, ensinamentos e pela valiosa participação na banca de qualificação.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos, que contribuíram para minha formação profissional.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia, Nilcéa, Laura e D. Aparecida, pela constante disposição e alegria em nos servir.

Aos funcionários Danilo, Evandro, Zé Reinaldo, José Carlos (Esquilo), Sr. Toninho, Sr. Paulo e Sr. Raimundo, pelo respeito e amizade, e por sempre me receberem com sorrisos a cada dia de trabalho, tornando o dia-a-dia mais

agradável e, principalmente, por atenderem os meus pedidos sempre com alegria e satisfação.

Aos demais funcionários do BIOAGRO, pela presteza e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de microrganismos, pela amizade, pelos momentos de descontração e pela disponibilidade de empréstimos de materiais.

Aos amigos do Laboratório de Genética de microrganismos, pela amizade e pela grande contribuição em algumas análises.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade pelo precioso apoio e boa vontade indispensáveis em alguns momentos.

Aos amigos do Laboratório de Micorrizas, pela ajuda e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, pelas palavras de incentivo e pela grandiosa troca de experiências.

Aos amigos do Laboratório de Anaeróbios, pela atenção e pelo carinho com que sempre me trataram.

E mais que especial, a todos os eternos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial (nossa MIND), incluindo ex e atuais agradeço a: Patrícia, Cida, Juliana, Marciana, Waléria, Léo, Maurício, Elisângela, Simone Chequer, Simone Quintão, Eliana, Manoela, Yara, Inês, Fernanda, Gustavo, Carla, Marta, Zé Carlos, Alessandra, Ana Paula, Thiago, Tiago e Murilo, pelos ensinamentos compartilhados, pela convivência mais do que agradável tornando a MIND uma grande família e nosso segundo lar, pelos inesquecíveis momentos de descontração e festividades, pelo carinho e preocupação, pelo apoio nos momentos difíceis e decepcionantes, pela imprescindível ajuda na execução deste trabalho e, principalmente por suas amizades e por fazerem parte desta etapa importante em minha vida.

Às minhas ex-estagiárias Lorena e Sílvia, pela amizade, pela ajuda, apoio e dedicação indispensáveis durante a realização deste trabalho.

À Ana Andréa, pela amizade, pela valiosa e imprescindível colaboração na execução deste trabalho, pelos momentos de decepções e sufocos

compartilhados e, pela dedicação e carinho os quais me levaram a ser testemunha de sua união com Leandro.

À Patrícia (Patty), pelo carinho e disposição com que me recebeu em sua casa em Belo Horizonte, e pelo apoio nos momentos difíceis.

À Cássia do Laboratório Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade pela paciência e grande ajuda nas várias tentativas de identificação do isolado usado neste trabalho.

À Angélica do Laboratório de Enzimologia do BIOAGRO, pela disposição e ajuda em uma etapa importante dos meus experimentos.

Ao professor Marcelo Matos Santoro pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG, em Belo Horizonte-MG.

Ao Jamil Silvano de Oliveira pela preciosa atenção e grande ajuda nas análises realizadas no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas.

Aos novos amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, da UFMG, pelo carinho com que me receberam e pela torcida organizada a cada coloração do gel de poliacrilamida e, principalmente, por suas amizades.

À Cláudia do Núcleo de Microscopia e Microanálise, pela ajuda dispensada nas análises de microscopia eletrônica.

Aos meus pais, José Geraldo e Margarida, pelo exemplo de vida e perseverança, dedicação, ensinamentos, preocupações, orações e pela presença e apoio em todos os momentos de minha vida, sejam alegres, difíceis, decepcionantes ou mesmo vitoriosos.

Aos meus queridos irmãos César, Dudu, Flávio e Leandro, pela amizade, apoio, pelas alegrias e tristezas que passamos juntos, pelas vitórias conquistadas por cada um e, principalmente por sermos grandes amigos.

À minha cunhada Gorete, pela amizade e pelo apoio, e aos meus lindos sobrinhos, Lucas e Anna Júlia, e por trazerem mais felicidades em nossas vidas e por encher a nossa casa de alegria.

Aos meus avós ausentes, que mesmo descansando no reino de Deus, com certeza estarão sempre me guardando e comemorando as minhas vitórias.

Aos familiares, pelo carinho e pelo incentivo que sempre me deram.

Às amigas Bete, Dal, Tânia e Carla, pela verdadeira amizade, dedicação, pela força que sempre me deram nos momentos de desânimo e desespero, pelos inesquecíveis momentos de diversão e do clube da “Luluzinha” e, por sempre me incentivarem a vencer.

Enfim, agradeço a Deus e a Santa Rita de Cássia, minha protetora, por estarem sempre do meu lado, me abençoando todos os dias de minha vida, me iluminando e guiando para me tornar uma pessoa cada vez melhor.

## **BIOGRAFIA**

ROSINÉA APARECIDA DE PAULA, filha de José Geraldo de Paula e Margarida Alves de Paula, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, onde realizou os estudos básicos.

Em janeiro de 1993, diplomou-se em Economia Doméstica pela Universidade Federal de Viçosa.

Em outubro de 1993, foi contratada pela Universidade Federal de São Carlos onde atuou por um ano e meio no projeto de melhoria do Restaurante Universitário.

Em 1995, foi contratada pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro como Supervisora Técnica e de Produção do Restaurante Universitário, cargo que ocupou até abril de 1997.

Em agosto de 1997, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, onde concluiu o curso em agosto de 2000.

Em abril de 2001 foi selecionada para o curso de Doutorado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos para obtenção do título de “Doctor Scientiae”, no dia 27 de outubro de 2005, com defesa de tese.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	
Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico.....	4
1. Introdução.....	5
2. Compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias do ácido láctico.	7
2.1. Ácidos orgânicos.....	8
2.2. Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	9
2.3. Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ).....	9
2.4. Diacetil, acetaldeído e etanol.....	10
2.5. Reuterina.....	10
2.6. Bacteriocinas.....	11
3. Classificação das bacteriocinas de bactérias do ácido láctico.....	12
3.1. Classe I – Família dos lantibióticos.....	13
3.2. Classe II – Pequenos peptídeos não modificados.....	15
3.3. Classe III – Proteínas grandes.....	16
4. Purificação de bacteriocinas.....	18
5. Organização genética e biossíntese de bacteriocinas.....	20
5.1. Organização genética.....	20
5.2. Biossíntese de bacteriocinas.....	21
5.2.1 Regulação da biossíntese.....	26
6. Imunidade da célula produtora.....	27
7. Modo de ação das bacteriocinas.....	28
7.1. Modo de ação de Nisina.....	29
7.2. Modo de ação de bacteriocinas da classe II.....	32
8. Resistência.....	35

9. Aplicação de bacteriocinas ou culturas bacteriocinogênicas em alimentos.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO 2	
Seleção de cultura bacteriocinogênica isolada de salame tipo italiano.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	58
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1. Microrganismos.....	61
2.2. Preparo do sobrenadante neutralizado (SN) dos isolados lácticos.....	61
2.3. Preparo do extrato protéico bruto (EB).....	63
2.4. Determinação da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes neutralizados (SN) e extratos protéicos brutos (EB).....	63
2.5. Caracterização da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes neutralizados (SN) dos isolados lácticos.....	64
2.6. Viabilidade e crescimento de microrganismos indicadores em meio líquido adicionado dos sobrenadantes neutralizados (SN) e extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos.....	65
2.7. Curva de crescimento das culturas lácticas e determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ).....	65
2.8. Análise por microscopia eletrônica de varredura.....	66
2.9. Identificação do isolado PD 6.9.....	66
2.9.1. Técnica de amplificação de gene codificador da região rRNA 16S.....	67
2.9.2. Perfil de fermentação de açúcares.....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.1. Atividade de inibição dos sobrenadantes neutralizados (SN) e dos extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos.....	70
3.2. Efeito de enzimas proteolíticas e de catalase sobre a atividade de inibição dos sobrenadantes neutralizados (SN) dos isolados lácticos.....	74

3.3. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de inibição dos sobrenadantes neutralizados (SN) dos isolados lácticos.....	77
3.4. Efeito do pH sobre a atividade de inibição dos sobrenadantes dos isolados lácticos.....	77
3.5. Viabilidade e crescimento de microrganismos indicadores em meio líquido adicionado dos sobrenadantes neutralizados (SN) e dos extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos.....	79
3.6. Curvas de crescimento das bactérias lácticas e determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ).....	82
3.7. Análise por microscopia eletrônica.....	84
3.8. Identificação do isolado PD 6.9.....	85
4. CONCLUSÃO.....	88
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

### CAPÍTULO 3

Atividade anti- <i>Listeria</i> de bacteriocina produzida por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9 isolado de salame tipo italiano.....	94
1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	98
2.1. Microrganismos.....	98
2.2. Obtenção do sobrenadante neutralizado (SN) e do extrato protéico bruto (EB).....	99
2.3. Quantificação do extrato protéico bruto (EB).....	99
2.4. Inibição sobre <i>Listeria</i> e <i>S. aureus</i> em meio sólido.....	100
2.5. Efeito de enzimas proteolíticas e tratamento térmico sobre o extrato protéico bruto (EB).....	100
2.6. Inibição de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 em meio líquido.....	101
2.7. Análise do modo de ação da bacteriocina sobre <i>L. monocytogenes</i> 764/93.....	101
2.7.1. Análise de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 por microscopia eletrônica.....	102

2.8. Inibição de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 em caldo salame.....	102
2.8.1. Preparo do caldo salame.....	102
2.8.2. Crescimento e atividade de bacteriocina produzida por <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9 em caldo salame.....	103
2.8.3. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 em caldo salame.....	103
2.8.4. Inibição de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 em caldo salame por <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9.....	104
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
3.1. Inibição de <i>Listeria</i> em meio sólido.....	105
3.2. Inibição de <i>S. aureus</i> em meio sólido.....	107
3.3. Efeito de enzimas proteolíticas e do tratamento térmico sobre a atividade de inibição do extrato protéico bruto (EB) de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9.....	110
3.4. Quantificação da atividade do extrato protéico bruto (EB).....	112
3.5. Inibição de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 em meio líquido.....	112
3.6. Modo de ação.....	115
3.7. Inibição de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 em caldo de salame.....	118
3.7.1. Crescimento e atividade da bacteriocina de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9 em caldo salame.....	118
3.7.2. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 em caldo salame.....	121
3.7.3. Inibição de <i>L. monocytogenes</i> 764/93 durante co-cultivo com <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9 em caldo salame.....	123
4. CONCLUSÃO.....	126
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

#### CAPÍTULO 4

Purificação e caracterização de bacteriocina de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9 isolado de salame tipo italiano.....	134
1. INTRODUÇÃO.....	135
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	138
2.1. Microrganismos.....	138

2.2. Crescimento e produção de bacteriocina por <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9.....	138
2.3. Quantificação da atividade da bacteriocina.....	139
2.4. Obtenção do extrato protéico bruto (EB).....	139
2.5. Efeito do pH sobre a atividade da bacteriocina.....	140
2.6. Estabilidade físico-química da atividade do extrato protéico bruto (EB).....	140
2.7. Purificação da bacteriocina.....	141
2.7.1. Preparo da amostra e fracionamento com sulfato de amônio.....	141
2.7.2. Separação em coluna de troca iônica.....	142
2.7.3. Separação em coluna de interação hidrofóbica.....	142
2.7.4. Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase-reversa.....	144
2.8. Determinação do teor de proteína.....	144
2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	145
2.10. Coloração do gel de eletroforese.....	145
2.11. Atividade em gel de poliacrilamida.....	146
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	147
3.1. Crescimento de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PD 6.9 e produção de bacteriocina.....	147
3.2. Atividade em diferentes valores de pH.....	148
3.3. Estabilidade físico-química da atividade da bacteriocina.....	150
3.3.1. Efeito do tratamento térmico.....	150
3.3.2. Liofilização e congelamento/descongelamento.....	151
3.3.3. Temperatura de armazenagem.....	152
3.4. Purificação da bacteriocina.....	153
4. CONCLUSÃO.....	164
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165

## RESUMO

De PAULA, Rosinéa Aparecida, D. S. Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2005. **Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico isoladas de salame tipo italiano**. Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Hilário Cuquetto Mantovani e Marisa Vieira de Queiroz.

Bactérias do ácido láctico, isoladas de salame tipo italiano, com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foram caracterizadas. A natureza protéica dos agentes antagonistas nas seis linhagens foi demonstrada por serem conservadas em sobrenadantes neutralizados, pela não sensibilidade à catalase e pela sensibilidade a proteases. Cinco perfis de resistência a Proteinase K, Papaína, Tripsina e Protease de *Bacillus polimyxa* foram observados entre os seis isolados lácticos. Em todos os isolados, a atividade antagonista manteve-se presente em sobrenadantes neutralizados após tratamento térmico de 98 °C por 40 minutos. Em todos os isolados, a atividade inibitória manteve-se independentemente do pH do meio, entre pH 2 e pH 10. O isolado que apresentou melhor inibição contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*, inclusive em meio líquido, foi identificado pela análise da seqüência de um gene codificador do rRNA 16S e pelo perfil de fermentação de açúcares como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, e aqui denominado *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9. O modo de ação da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre *L. monocytogenes* foi definido como bactericida. A produção de bacteriocina e o efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* em condições que simulam o salame foram demonstrados. *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 atingiu 10<sup>9</sup> UFC/mL e a bacteriocina foi detectada após 8 horas. Em estudo de co-cultivo com *L. monocytogenes*, o crescimento de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 não foi afetado pela presença de *L. monocytogenes* e apresentou o mesmo comportamento que quando cultivado como monocultura. Porém, o crescimento de *L. monocytogenes* foi reprimido e o número inicial de 10<sup>6</sup> células foi mantido

até aproximadamente 12 horas de cultivo e nenhum crescimento foi detectado após 32 horas em um limite de detecção de 10 UFC/mL. A atividade da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, em meio D-MRS, surge no final da fase logarítmica de crescimento e é máxima na fase estacionária. A atividade foi mais alta em condições ácidas do que em básicas, com atividade máxima em pH 2 e não foi alterada por tratamento térmico a 121 °C por 20 minutos, pelo processo de liofilização ou pelo efeito de congelamento e descongelamento. O armazenamento da bacteriocina nas temperaturas de -20 °C e -80 °C por até 6 meses também não alterou a atividade de inibição. A purificação foi realizada utilizando precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e HPLC-fase reversa. Grande perda de atividade da bacteriocina foi observada especialmente após cromatografia de troca iônica e somente 0,025% da atividade inicial foi recuperada após HPLC-fase reversa. Os resultados obtidos com a purificação indicam que a bacteriocina é pequena, catiônica, hidrofóbica e com capacidade de formar agregados.

## ABSTRACT

De PAULA, Rosinéa Aparecida, D. S. Universidade Federal de Viçosa, October 2005. **Bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from Italian salami.** Advisor: Célia Alencar de Moraes. Committee members: Hilário Cuquetto Mantovani and Marisa Vieira de Queiroz.

Lactic acid bacteria, isolated from Italian type salami, displaying antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* were characterized. The proteinaceous nature of the inhibitory agents in the six strains was demonstrated by their maintenance in neutralized supernatants, non sensibility to catalase and by sensibility proteases. Five resistance profiles to Proteinase K, Papain, Trypsin and Protease of *Bacillus polimyxa* were observed among the six strains. In all the isolates, the antagonistic activity was present in neutralized supernatants after heat treatment at 98 °C for 40 minutes. For all the isolates, the inhibitory activity was maintained, independently of the pH of the broth, between pH 2 and pH 10. The isolate that presented best activity against *L. monocytogenes* and *S. aureus*, including in broth, was identified by nucleotide sequence analysis of a gene encoding 16S rRNA and by sugar fermentation pattern as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, here denominated *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9. The bacteriocin produced by *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 has bactericidal effect on *L. monocytogenes*. Bacteriocin production and inhibitory effect on *L. monocytogenes* under conditions that simulate those of salami were demonstrated. *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 reached 10<sup>9</sup> CFU/mL and the bacteriocin was detected after 8 hours of cultivation in salami broth. In co-cultivation, *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 was unaffected by the presence of *L. monocytogenes* and presented the same behavior as when cultivated as monoculture. However, the growth of *L. monocytogenes* was repressed and the initial number of 10<sup>6</sup> cells was maintained to approximately 12 hours of cultivation and nothing was detected after 32 hours with a limit of detection of 10 CFU/mL. The activity of the bacteriocin produced by *L. lactis* subsp. *lactis* PD

6.9, in D-MRS broth, appears at the end of the logarithmic growth phase and reaches its maximum in the stationary phase. The activity was higher under acidic conditions, with maximum activity in pH 2 and it was not altered by heat treatment at 121 °C for 20 minutes, by lyophilization or by freeze-thaw treatment. The storage of the bacteriocin at -20 °C and -80 °C for up to 6 months did not alter the inhibitory activity. Purification was performed by precipitation with ammonium sulphate, ion-exchange chromatography, hydrophobic-interaction chromatography and reverse-phase HPLC. Loss of activity of the bacteriocin was especially observed after ion-exchange chromatography and only 0,025% of the initial activity was recovered after reverse-phase HPLC. The results obtained with the purification indicate that the bacteriocin is small, cationic, hydrophobic and with capacity to form aggregates.

## INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico são usadas na produção de alimentos fermentados desde os primórdios da civilização para aumentar a segurança e a qualidade do produto final. Um papel importante das bactérias lácticas é desenvolver as propriedades organolépticas dos alimentos fermentados por meio de produção de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas. Vários produtos metabólicos com ação antimicrobiana são produzidos por essas bactérias incluindo, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, CO<sub>2</sub>, diacetil, reuterina e bacteriocinas. O maior efeito de conservação dos alimentos pelas bactérias lácticas é devido à produção de ácido láctico que resulta na diminuição do pH do meio. As bacteriocinas de bactérias do ácido láctico podem inibir o crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos tais como, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus* sp. Por esta razão, bacteriocinas têm recebido atenção especial por parte das indústrias como conservante natural e a cada dia aumenta mais o número de bacteriocinas identificadas e caracterizadas, principalmente nos últimos anos, devido ao potencial para a sua aplicação em alimentos.

A bacteriocina nisina, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, foi a primeira bacteriocina a ser descoberta por ROGERS e WHITTIER em 1928, quando iniciaram a investigação de compostos antimicrobianos de natureza protéica produzidos por bactérias lácticas. Nisina é a bacteriocina mais bem caracterizada e considerada segura, e é a única bacteriocina que tem o uso aprovado como aditivo alimentar em pelo menos 48 países, incluindo Brasil. Outras bacteriocinas têm potencial para aplicação como conservantes em alimentos, em particular, pediocina produzida por *Pediococcus acidilactici*. Pediocina está sendo bastante estudada e provavelmente será a segunda bacteriocina de bactérias do ácido láctico usada na indústria alimentícia. A regulamentação de aditivos não facilita a introdução de novas bacteriocinas para aplicação em alimentos e, portanto uma alternativa à introdução da bacteriocina

purificada em alimentos é o uso de bactérias lácticas *starter* que produzam bacteriocinas *in situ*.

Culturas *starter* de origem cárnea ainda são relativamente pouco aperfeiçoadas em relação às culturas *starter* usadas em produtos lácteos. As culturas *starter* usadas em salames fermentados normalmente consistem de um ou dois microrganismos, sendo um acidificante, para estabilizar biologicamente o produto, e outro redutor de nitrato, que, se presente, é reduzido a nitrito. A dominância das bactérias é favorecida pela condição de anaerobiose e pelo baixo pH inicial da mistura. O crescimento de vários microrganismos deterioradores e patogênicos, em salames fermentados, é inibido por componentes da formulação inicial e pelas condições prevaletentes no salame fermentado como nitrito, baixa tensão de oxigênio, pH e atividade de água. Entretanto, produtos cárneos fermentados têm sido encontrados contaminados com *S. aureus* e *L. monocytogenes* e podem servir como veículos de transmissão destas bactérias. Estes microrganismos são considerados problema de segurança alimentar devido à sua tolerância a altas concentrações de NaCl, baixo pH e reduzida atividade de água. O controle destas bactérias patogênicas, que são capazes de sobreviver a todas as barreiras da fermentação, poderia ser feito por meio de culturas lácticas *starter* com capacidade de produzir bacteriocinas *in situ*, especificamente contra estes microrganismos ou microrganismos de interesse. Neste caso, as linhagens produtoras de bacteriocinas podem melhorar a competição da cultura *starter* utilizada ou servirem como cultura protetora, para garantir a segurança do produto. As bactérias lácticas mais promissoras como culturas *starter* ou protetoras são aquelas originadas da microbiota indígena dominante, pois são bem adaptadas às condições da fermentação.

Em estudos anteriores foram isoladas 484 bactérias lácticas durante as fases de fermentação e maturação de salame tipo italiano processado naturalmente e foi verificado que 115 isolados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Escherichia coli* ou *Salmonella enteritides*. Posteriormente foi realizada uma triagem de produção de proteínas com atividade antagonista sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* em 51

destes isolados, e foi verificado que 6 isolados são possíveis produtores de bacteriocina. O presente trabalho propõe: (1) estudar essa coleção de bactérias lácticas em relação ao espectro de inibição e caracterizar a atividade antimicrobiana; (2) selecionar, dessa coleção, uma bactéria para ser usada como cultura *starter* protetora na elaboração de embutidos cárneos, (3) caracterizar a atividade bacteriocinogênica presumida do isolado selecionado contra *L. monocytogenes*; (4) determinar a atividade de inibição em meio que simula as condições do salame; (5) caracterizar e purificar parcialmente esta bacteriocina.

Para atender a estes objetivos esta tese consta de quatro capítulos: o Capítulo 1 revisa a literatura sobre o tema central deste trabalho, bacteriocinas de bactérias do ácido láctico; o Capítulo 2 consta de seleção de cultura láctica bacteriocinogênica isolada de salame tipo italiano; o Capítulo 3 demonstra a atividade anti-*Listeria* de bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 isolada de salame tipo italiano; o Capítulo 4 descreve a purificação parcial e caracterização da bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 isolada de salame tipo italiano.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

#### **Bacteriocinas de bactérias do ácido lático**

## 1. Introdução

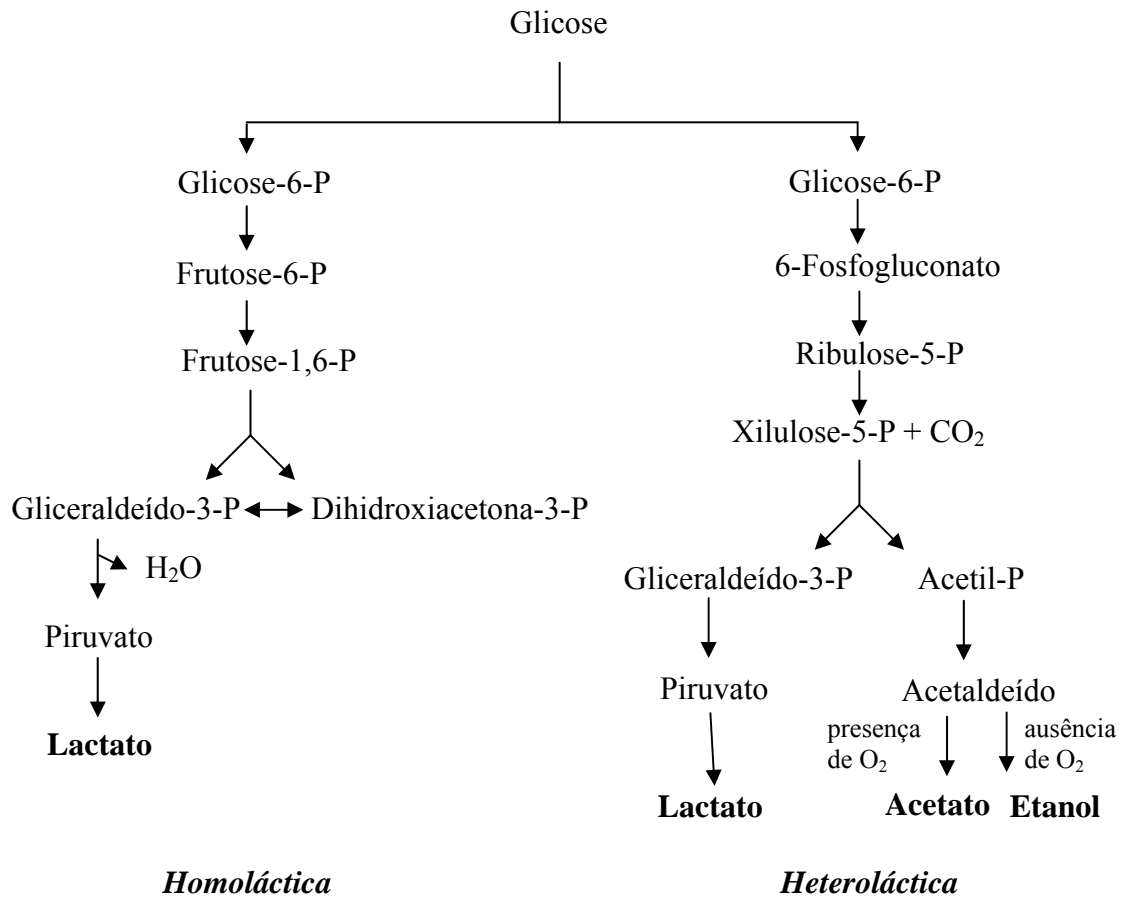
A produção de alimentos fermentados é uma das mais antigas técnicas de preservação de alimentos conhecida. Desde o início da civilização, métodos para a fermentação de leite, carnes e vegetais têm sido descritos, e os primeiros registros datam de 6000 anos antes de Cristo (FOX, 1993). Os principais objetivos da fermentação são conservar o alimento, podendo aumentar a vida de prateleira e aumentar o valor nutritivo do produto, garantir a segurança microbiológica e produzir alimentos com características diferentes, influenciando assim na comercialização dos produtos (CAPLICE E FITZGERALD, 1999). A adição de cultura *starter* para controlar a fermentação, resulta num produto de melhor qualidade e com menor tempo de fermentação e garante o desenvolvimento de uma microbiota segura a qual é importante para prevenir o crescimento de bactérias patogênicas e deterioradoras (BACUS e BROWN, 1981). Os microrganismos *starter* mais usados incluem as leveduras para produção de cerveja e vinhos, e bactérias lácticas para fermentação de uma variedade de produtos lácteos, vegetais e carnes (ROSS et al., 2002). As bactérias do ácido láctico constituem o maior volume das culturas *starter* comerciais e representam o maior valor de mercado (HANSEN, 2002).

As bactérias do ácido láctico constituem um grupo diverso de bactérias que estão amplamente distribuídas no ambiente, tendo como habitat, desde superfícies de plantas até o trato intestinal de muitos animais (CHASSY e MURPHY, 1993). Essas bactérias são caracterizadas como Gram-positivas, não formadoras de esporos e, normalmente, desprovidas de motilidade, que produzem ácido láctico como o maior ou o único produto da fermentação. As bactérias do ácido láctico crescem anaerobiamente, porém a maioria não é sensível ao O<sub>2</sub> e pode crescer também na sua presença (MADIGAN et al., 1997). São geralmente mesófilas, mas certos grupos podem crescer em temperaturas abaixo de 5°C e outros acima de 45°C. A maioria das espécies pode crescer em pH de 4 a 4,5, mas algumas são ativas em pH 9,6 e outras em pH 3,2. Muitas apresentam fraca atividade lipolítica e proteolítica e requerem aminoácidos pré-

formados, bases purinas e pirimidinas e vitaminas do complexo B para seu crescimento (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

Estudos taxonômicos sugerem que neste grupo estão incluídas espécies dos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* e *Weisella* (STILES e HOLZAPFEL, 1997). Os membros mais comuns deste grupo, explorados em alimentos, incluem *Lactococcus* para fabricação de queijos, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* para queijos e iogurtes e várias espécies de *Lactobacillus* para uma variedade de produtos lácteos, carnes e vegetais fermentados (ROSS et al., 2002). Todas as bactérias do ácido láctico produzem este ácido a partir de hexoses e obtêm energia via fosforilação em nível de substrato. A via pela qual a glicose é metabolizada divide as bactérias do ácido láctico em dois grupos: homofermentativo e heterofermentativo (Figura 1). Bactérias homofermentativas, tais como *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, e alguns *Lactobacillus*, produzem ácido láctico como o único produto final da fermentação de glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas. Entretanto, sob condições de crescimento alteradas e quando o substrato inicial é uma pentose, isto pode mudar. Bactérias heterofermentativas tais como *Weisella*, *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus* produzem quantidades equimolares de ácido láctico, CO<sub>2</sub> e etanol ou acetato, a partir de glicose, por usarem a via do 6-fosfogluconato (MADIGAN, 1997; CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

Os produtos finais do catabolismo possuem efeito preservativo por limitar o crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos nos produtos alimentícios, além de contribuírem para o sabor, aroma e textura ajudando a determinar características únicas do produto (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).



**Figura 1.** Fermentação de glicose em bactérias do ácido láctico (adaptado de CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

## 2. Compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias do ácido láctico

Os metabólitos antimicrobianos produzidos pelas bactérias do ácido láctico durante o processo de fermentação incluem a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, CO<sub>2</sub>, diacetil, reuterina e bacteriocinas (O'KEEFFE e HILL, 1999).

## 2.1. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos, tais como acético, láctico e propiônico produzidos como produtos finais do metabolismo inibem o crescimento de muitos microrganismos deterioradores e patogênicos. Os ácidos orgânicos, na forma não dissociada, são facilmente solúveis na membrana celular, interferem com a sua permeabilidade, inibem o transporte ativo e reduzem o pH intracelular para faixas que promovem a acidificação celular e inibem o metabolismo causando a morte (CLIVER e MARTH, 1990, CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Em valores de pH de salames fermentados secos, aproximadamente 4,8, somente 10% do ácido láctico ( $pK_a = 3.86$ ) está na forma não dissociada, e resulta numa moderada atividade inibitória (Cherrington et al., 1991, citados por TYÖPPÖNEM et al., 2002). A atividade antimicrobiana de cada ácido a uma dada concentração molar não é a mesma. Ácido acético é mais inibitório do que o ácido láctico e pode inibir leveduras, fungos filamentosos e bactérias (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Porém, altas quantidades de ácido acético não são desejáveis em salames fermentados por causar diminuição da qualidade (TYÖPPÖNEM et al., 2002).

Ácido propiônico inibe fungos e bactérias e está presente em produtos comerciais como Microguard<sup>®</sup> e Bioprofit<sup>®</sup> (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Microguard<sup>®</sup> é produzido pela fermentação realizada por *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* em leite desnatado, o qual é posteriormente pasteurizado. Nos Estados Unidos é adicionado como conservante em queijo cottage para prevenir o crescimento de bactérias Gram-negativas e fungos (DAESCHEL, 1989). O Bioprofit<sup>®</sup> contém *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* e *Lactobacillus rhamnosus* com maior atividade de inibição contra fungos e algumas bactérias Gram-positivas (MAYRA-MAKINEN e SUOMALAINEN, 1995).

## **2.2. Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Bactérias do ácido láctico não sintetizam catalase, enzima responsável pela eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado na presença de O<sub>2</sub> ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). O peróxido de hidrogênio pode acumular no meio de crescimento e inibir vários microrganismos. A inibição é mediada pelo efeito de oxidação de lipídeos da membrana e de proteínas da célula (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

Peróxido de hidrogênio pode reagir com outras substâncias e formar compostos ainda mais inibidores. Em leite, o peróxido de hidrogênio gerado pelas bactérias do ácido láctico pode reagir com tiocianato, por ação do sistema lactoperoxidase, e formar o radical tóxico hipotiocianato (DAESCHEL, 1989; O'KEEFFE e HILL, 1999). Em embutidos fermentados, a formação de peróxido de hidrogênio não é conveniente, pois o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode causar a descoloração do pigmento da carne curada e a oxidação de ácidos graxos insaturados (LUCKE, 1985).

## **2.3. Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)**

O CO<sub>2</sub> formado durante a fermentação heteroláctica pode criar um ambiente anaeróbio o qual é tóxico para muitos microrganismos aeróbios presentes nos alimentos (De VUYST e VANDAME, 1994). O CO<sub>2</sub> também pode exercer efeito antimicrobiano, inibindo reações de descarboxilação enzimática e atuando na membrana celular, causando acúmulo de gases na bicamada lipídica (EKULAND, 1984). Em baixas concentrações, pode estimular o crescimento de algumas bactérias (LINDGREN e DOBROGOSZ, 1990).

## 2.4. Diacetil, acetaldeído e etanol

Diacetil é um produto do metabolismo de citrato responsável pelo aroma e sabor da manteiga e de alguns leites fermentados. Bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos são mais sensíveis ao diacetil do que bactérias Gram-positivas. Acredita-se que o seu modo de ação é devido a interferência com a utilização de arginina (De VUYST e VANDAME, 1994). Os níveis de diacetil encontrados em alimentos são geralmente insuficientes para contribuir significativamente na atividade antimicrobiana (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

O acetaldeído e o etanol podem ser produzidos pelas bactérias lácticas, porém os níveis produzidos nos alimentos são baixos e a contribuição para a inibição é mínima. O acetaldeído é mais importante para o sabor e aroma de produtos lácteos (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

## 2.5. Reuterina

Reuterina ( $\beta$ -hidroxipropionaldeído) é um composto inibitório produzido por *Lactobacillus reuteri* sob condições anaeróbias na presença de glicerol. Possui um amplo espectro de ação inibindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, fungos filamentosos, vírus e protozoários (AXELSSON et al., 1989). Seu modo de ação pode ser devido à inibição da enzima ribonucleotideo redutase (TALARICO e DOBROGOSZ, 1989). Os microrganismos de significância em saúde pública que são inibidos por reuterina incluem espécies de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Cândida* e *Trypanosoma* (O'KEEFFE e HILL, 1999).

## 2.6. Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas extracelulares com variado espectro de atividade produzidos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e capazes de inibir vários microrganismos deterioradores e patogênicos. Em todos os casos, a célula produtora apresenta imunidade específica à ação de sua própria bacteriocina (O'KEEFFE e HILL, 1999). As bacteriocinas foram primeiramente caracterizadas em bactérias Gram-negativas e o termo bacteriocina foi criado em 1953, especificamente para definir antibióticos protéicos do tipo colicina, produzidos por *Escherichia coli* e ativos contra linhagens da mesma espécie (JACK et al., 1995). A observação que levou à descoberta de bacteriocinas de bactérias do ácido láctico foi feita por ROGERS e WHITTIER (1928), na Inglaterra, quando verificaram que *Streptococcus lactis* (atualmente classificado como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) tinha efeito inibitório sobre o crescimento de *Lactobacillus plantarum*. WHITEHEAD (1933) observou inibição similar das culturas *starter* de queijos, e isolou e identificou a substância antimicrobiana com sendo de natureza protéica. O nome Nisina foi dado por MATTICK e HIRSCH (1947) e proveniente de “substância inibitória N”, uma vez que *L. lactis* foi originalmente classificado como *Streptococcus* do grupo serológico N.

Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico atuam principalmente na membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas, dissipando a força próton-motora através da formação de poros e promovem a liberação de várias substâncias intracelulares como aminoácidos, potássio, fosfato inorgânico e ATP intracelular (ABEE et al., 1995; MONTVILLE e CHEN, 1998). A atividade das bacteriocinas de bactérias do ácido láctico é geralmente limitada a bactérias Gram-positivas. Bactérias Gram-negativas não são sensíveis a bacteriocinas de bactérias do ácido láctico devido à barreira protetora do lipopolissacarídeo na sua membrana externa. Uma vez que a função de barreira da membrana externa das bactérias Gram-negativas seja destruída, aumenta-se a efetividade da bacteriocina (ABEE et al., 1995; DESMAZEAUD, 1996; SCHILLINGER et al., 1996;

CAPLICE e FITZGERALD, 1999). A permeabilidade da membrana das bactérias Gram-negativas pode ser aumentada por injúria subletal, incluindo aquela que pode ocorrer quando se usa altas pressões hidrostáticas e campo elétrico pulsado como métodos de preservação, além do uso de agentes quelantes, tais como EDTA, que causam quebra da integridade da membrana (ABEE et al., 1995; CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Bacteriocinas são freqüentemente confundidas com antibióticos e, em muitos países a distinção entre eles é crítica. As bacteriocinas contrastam com os antibióticos, considerados ilegais como conservantes em alimentos, pelo fato de não apresentarem utilização no tratamento de doenças clínicas infecciosas. Na Tabela 1 estão listadas as principais diferenças entre bacteriocinas de bactérias do ácido láctico e antibióticos (CLEVELAND et al., 2001).

### **3. Classificação das bacteriocinas de bactérias do ácido láctico**

Várias tentativas têm sido feitas para classificar as bacteriocinas de bactérias lácticas. A classificação de bacteriocinas de bactérias lácticas foi proposta com base em sua estrutura primária. Existe grande variação entre os peptídeos em termos de comprimento, composição e seqüência de aminoácidos, secreção e processamento, modificação pós-traducional e atividade antimicrobiana (EIJNSINK et al., 2002). A classificação mais usada é a proposta por KLAENHAMMER (1993) e modificada por NES et al. (1996), na qual as bacteriocinas de bactérias do ácido láctico são divididas em três classes, expostas a seguir.

**Tabela 1.** Diferenças entre bacteriocinas de bactérias lácticas e antibióticos.

<b>Características</b>	<b>Bacteriocinas</b>	<b>Antibióticos</b>
Aplicação	Alimentos	Clínica, alimentação animal
Síntese	Ribossomal	Metabólito secundário e síntese enzimática
Atividade	Espectro limitado a bactérias Gram-positivas	Espectro variado
Imunidade da célula hospedeira	Sim	Não
Mecanismo de resistência ou tolerância da célula alvo	Geralmente a adaptação afetando a composição da membrana celular	Determinantes genéticos transferíveis afetam diferentes sítios dependendo do modo de ação
Requerimento de interação	Algumas vezes requerem moléculas de ancoramento	Alvo específico
Modo de ação	Formação de poros, algumas podem inibir síntese da parede celular	Parede ou membrana celular ou alvos intracelulares
Toxicidade	Nenhuma conhecida	Efeitos colaterais

Fonte: adaptado de CLEVELAND et al. (2001)

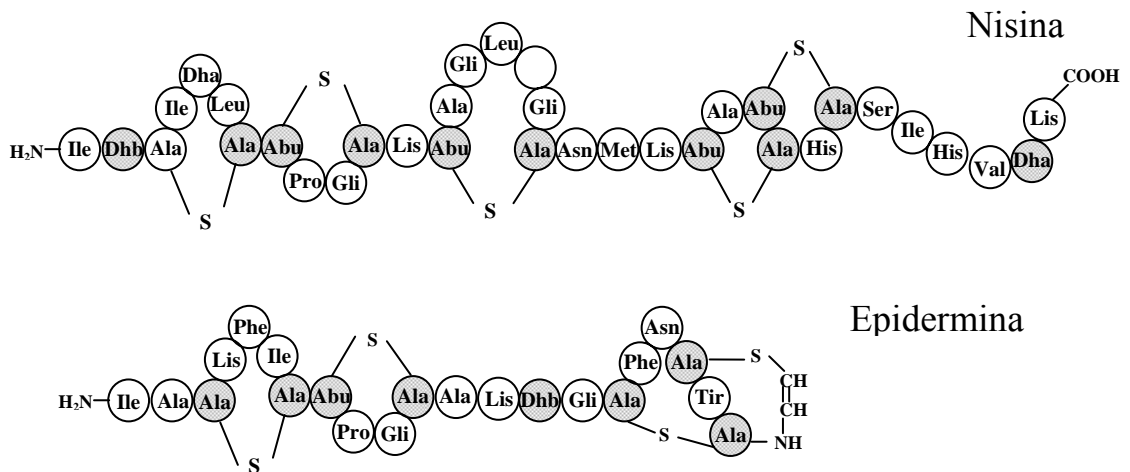
### **3.1. Classe I – Família dos lantibióticos**

Bacteriocinas desta classe são geralmente pequenas com um ou dois peptídeos de aproximadamente 3 kDa, e estáveis ao calor. Uma característica comum destas bacteriocinas é que elas possuem aminoácidos modificados pós-tradução tais como, lantionina (Lan), metil lantionina (MeLan), dehidrobutirina (Dhb) e dehidroalanina (Dha), e são denominadas Lantibióticos. O termo

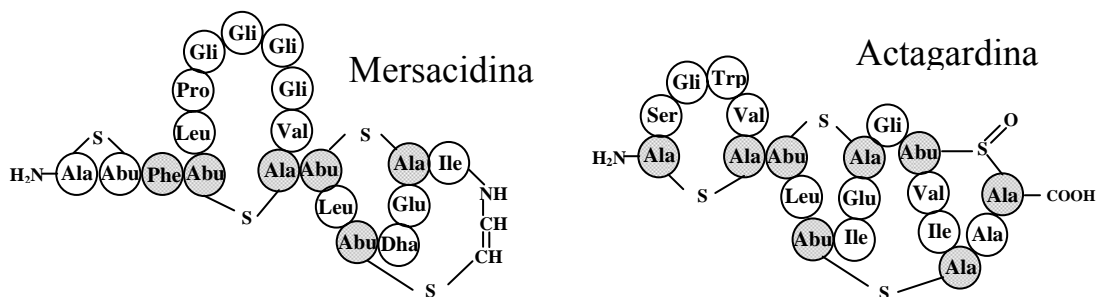
lantibiótico refere-se a uma abreviação de “antibióticos peptídeos contendo lantionina” (BRÖTZ e SAHL, 2000; ROSS et al., 2002). Esta e outras modificações pós-tradução influenciam fortemente na estrutura do peptídeo, bem como na sua estabilidade à degradação por proteases. Atualmente existem muitos lantibióticos descritos na literatura, mas nisina é a principal representante desta classe (BRÖTZ e SAHL, 2000).

Lantibióticos são subdivididos em duas categorias baseadas em suas estruturas e diferenças no modo de ação (Figura 2). Lantibióticos do tipo A, por exemplo, Nisina, são peptídeos catiônicos e hidrofóbicos que formam poros na membrana de células sensíveis, e possuem a estrutura alongada e flexível quando comparada com o tipo B. Lantibióticos do tipo B possuem uma estrutura globular rígida e interferem em reações enzimáticas celulares. Exemplos são mersacidina e actagardina que atuam na inibição da biossíntese da parede celular (MOLL et al., 1999; BRÖTZ e SAHL, 2000, HÉCHARD e SAHL, 2002). Alguns membros da família de lantibióticos, como Lacticina 3147, requerem dois peptídeos complementares para a atividade. A descoberta contínua de novos membros deste grupo complexo de peptídeos indica que a classificação deve ser atualizada (McAULIFFE, et al., 2001; ROSS et al., 2002).

## Tipo A



## Tipo B



**Figura 2.** Estrutura primária de lantibióticos do tipo A e do tipo B. Resíduos de aminoácidos modificados estão ilustrados na cor cinza. **Abu**, Ácido aminobutírico; **Abu-S-Ala**, Metil-lantionina; **Ala-S-Ala**, Lantionina; **Dha**, 2-3-dideidroalanina; **Dhb**, 2-3-dideidrobutirina (adaptado de BRÖTZ e SAHL, 2000).

### 3.2. Classe II – Pequenos peptídeos não modificados

São geralmente peptídeos não modificados pós-tradução, menores que 10 kDa, catiônicos, hidrofóbicos e estáveis ao calor. Com base em sua estrutura primária eles são divididos em quatro subclasses, denominadas IIa, IIb, IIc e IId. A classe IIa compreende bacteriocinas com forte similaridade na seqüência de

aminoácidos, principalmente na parte amino-terminal com a seqüência consensus -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys- e apresentam forte atividade contra *Listeria* spp. Este grupo é caracterizado pelas Pediocinas, tendo sido esta a primeira a ser identificada e a mais estudada. Bacteriocinas da classe IIb requerem atividade complementar de dois peptídeos para a atividade bacteriocinogênica, ou pelo menos para atividade ótima. Exemplos são Lacticina F produzida por *Lactobacillus johnsonii* 11088 (MURIANA e KLAENHAMMER, 1991) e Lactococina G produzida por *Lactococcus lactis* LMG2081 (NISSEN-MEYER et al., 1992). Bacteriocinas pertencentes à classe IIc são secretadas pelo sistema de transporte *sec*-dependente, como por exemplo, Acidocina B (LEER et al., 1995) produzida por *Lactobacillus acidophilus* (ENANAHAR et al., 2000a; HÉCHARD e SAHL, 2002). A Classe IId foi recentemente proposta e incluem bacteriocinas que não se enquadram nos subgrupos anteriores (CINTAS et al., 2001). Divergicina 750 produzida por *Carnobacterium divergens* 750 (HOLCK et al., 1996) e Lactocina 705 produzida por *Lactobacillus casei* CRL 705 (PALACIOS et al., 1999) estão incluídas nesta classe.

### **3.3. Classe III – Proteínas grandes**

Bacteriocinas da classe III são constituídas de proteínas grandes, com peso molecular acima de 30 kDa e sensíveis ao calor. Helvetina J produzida por *Lactobacillus helveticus* (JOERGER e KLAENHAMMER, 1986) pertence a esta classe. Elas não são bem caracterizadas e são de pouco interesse para aplicação em alimentos (AYMERICH et al., 1998; ROSS et al., 2002; CHEN e HOOVER, 2003). As propriedades bioquímicas e o mecanismo de ação ainda não estão esclarecidos e inibem apenas espécies proximamente relacionadas como *Lactobacillus* e *Lactococcus* (KLAENHAMMER, 1993).

KLAENHAMMER (1993) propôs uma quarta classe a qual é formada por bacteriocinas complexas constituídas de uma mistura indefinida de proteínas, lipídeos e carboidratos. Estas bacteriocinas incluem glicoproteínas como,

Leucocina S (LEWUS et al., 1992), Lactocina 27 (UPRET, 1994) e lipoproteínas como Mesenterocina 52 (SUDIRMAN et al., 1994). Uma vez que, as bacteriocinas são capazes de formar agregados com outras macromoléculas nos extratos brutos e, após purificação são resolvidas em peptídeos simples. A existência desta classe permanece indefinida (CINTAS et al., 2001). Este fenômeno foi mostrado em algumas bacteriocinas como, por exemplo, Plantaricina S produzida por *Lactobacillus plantarum* LPCO10. JIMÉNEZ-DÍAZ et al. (1993) propuseram a presença de uma fração glicolipídica na molécula de Plantaricina S, mas, após purificação da bacteriocina observaram que a atividade antimicrobiana era devida a dois peptídeos (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 1995). Atualmente, bacteriocinas da quarta classe não têm sido purificadas e o fato de formarem agregados com outras moléculas têm sido uma boa razão para acreditar que este tipo de bacteriocina não exista e seja apenas um artefato (CLEVELAND et al., 2001).

COTEER et al. (2005) propõem que a classificação de bacteriocinas de bactérias lácticas deve ser revisada e sugerem um esquema que divide as bacteriocinas de bactérias lácticas em duas categorias: lantibióticos que contêm lantionina (Classe I) e bacteriocinas que não contêm lantionina (Classe II), e as proteínas antimicrobianas grandes e sensíveis ao calor (normalmente classificadas como bacteriocinas da classe III) são consideradas proteínas líticas e não bacteriocinas, e integrariam um grupo denominado ‘Bacteriolisinas’.

A maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico associada a alimentos pertence às classes I e II (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). As bacteriocinas das classes I e II são as mais estudadas por serem moléculas menores, mais abundantes, resistentes ao calor e por serem melhores candidatas para a aplicação industrial (NES et al., 1996; AYMERICH et al., 1998).

#### 4. Purificação de bacteriocinas

O primeiro passo para a purificação de bacteriocinas geralmente refere-se à obtenção do sobrenadante livre de células da cultura produtora seguido por um passo que envolve a concentração do peptídeo (VENEMA et al., 1997). A concentração é realizada por técnicas que permitem a separação das frações de acordo com o seu tamanho ou natureza físico-química. As técnicas mais usadas incluem: (1) filtração por diálise ou ultrafiltração (SCHILLINGER e LÜCKE, 1989, MURIANA e KLAENHAMMER, 1991; PARENTE e HILL, 1992); (2) precipitação de proteínas usando sais como sulfato de amônio ou ácidos (HOLO et al., 1991); (3) extração de proteínas com solventes orgânicos como butanol e etanol (PIVA e HEADON, 1994); além disto, o sobrenadante pode também ser concentrado por liofilização. Porém essas técnicas não eliminam compostos indesejáveis do meio de cultura que interferem no processo de purificação (SCHILLINGER e LÜCKE, 1989). O passo de concentração do sobrenadante é necessário para reduzir o volume da amostra inicial e para recuperar bacteriocinas, porém não é muito seletivo. Para obter bacteriocinas de alta pureza é necessário realizar sua separação de outros compostos protéicos por técnicas baseadas nas propriedades e características físico-químicas da bacteriocina. Os peptídeos são geralmente purificados após serem submetidos a uma seqüência de métodos cromatográficos. (CASAUS et al, 1997). Independentemente do procedimento de purificação usado, o rendimento diminui durante o processo, sendo necessário otimizar as condições experimentais para produção da respectiva bacteriocina (CINTAS et al., 2001).

Um dos esquemas de purificação usado com grande sucesso na purificação de várias bacteriocinas consiste das seguintes etapas: cultivar a célula produtora em meio líquido sob condição ótima para produção da bacteriocina, coletar as células por centrifugação e precipitar as proteínas do sobrenadante com sulfato de amônio. Em seguida, ocorrem várias etapas de fracionamento das bacteriocinas através de vários passos cromatográficos. Estes passos de cromatografia incluem cromatografia de troca iônica, de interação hidrofóbica e

de fase reversa (CINTAS et al., 2001). Este procedimento foi usado para purificar Nisina A (CINTAS et al., 1995), Pediocina PA-1 (NIETO-LOZANO et al., 1992), Bavaricina A (LARSEN et al., 1993), Enterocina A (AYMERICH et al., 1996) dentre muitas outras bacteriocinas. Um procedimento modificado incluindo gel filtração antes da cromatografia de troca iônica para purificar Lactococina S (CINTAS et al., 1998), Lactacina F (MURIANA e KLAENHAMMER, 1991), Enterocina B (HERRANZ et al., 2001), dentre outras, foi usado com sucesso. VENEMA et al. (1997) tiveram êxito na purificação de Lactococina B e Pediocina PA-1 excluindo as cromatografias e utilizando um procedimento de três passos: (1) precipitação das bacteriocinas por adição de etanol ao sobrenadante livre de células, (2) separação das proteínas por focalização isoeétrica e (3) ultrafiltração.

Um procedimento de purificação de bacteriocinas completamente diferente foi descrito por YANG et al. (1992). O método é baseado na natureza catiônica das bacteriocinas e em sua capacidade de adsorver reversivelmente e sem especificidade às células da linhagem produtora. Bacteriocinas adsorvem eficientemente às células produtoras dependendo do valor de pH do meio, com máxima adsorção (aproximadamente 90%) em pH 6 e mínima adsorção (aproximadamente 2%) em pH 2. O método consiste em cultivar a bactéria sob condição ótima para produção da bacteriocina e submeter a pasteurização para inativar as células. O pH é ajustado para 6 para permitir a adsorção e as células são coletadas, ressuspendidas em tampão salino pH 2 e incubadas a 4°C para permitir a desadsorção das bacteriocinas das células produtoras. A suspensão de bacteriocina é então dialisada, concentrada por liofilização e subseqüentemente submetida à cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa. Pediocina PA-1, Leucocina Lcm1, Nisina A e Sakacina são exemplos de bacteriocinas que foram purificadas por este procedimento, resultando em rendimento de aproximadamente 106, 96.2, 93.3 e 44.3%, respectivamente.

Algumas bacteriocinas se encontram em estado nativo como moléculas de alta massa molecular, formando agregados de 30-300 kDa. Estes agregados podem mascarar parcialmente ou totalmente a atividade antimicrobiana da

bacteriocina e também induzir a erros na determinação de seu peso molecular. Isto é verdadeiro para bacteriocinas de baixo peso molecular, apolares, as quais facilmente interagem com material extracelular de células lisadas e com outros compostos apolares do meio de cultura tais como lipídeos e ácidos graxos provenientes de Tween 80 presente no meio (MURIANA e KLAENHAMMER, 1991; CONTRERAS et al., 1997). Em todos os casos, complexos macromoleculares podem ser desagregados por meio de agentes dissociantes como, uréia e SDS (GONZÁLEZ et al., 1994), ultrafiltração (MURIANA e KLAENHAMMER, 1987) ou por eliminação de lipídeos por extração com metanol-clorofórmio ou por etanol-dietil-éter (CONTRERAS et al., 1997).

## **5. Organização genética e biossíntese de bacteriocinas**

### **5.1. Organização genética**

Os genes para síntese da bacteriocina ativa estão comumente organizados em operons. Os clusters de genes podem estar localizados em cromossomos como ocorre com os de Sakacina P, que se encontra num fragmento de 7,6 kpb (TICHACZEK et al., 1994); ou em plasmídeos como, por exemplo, os de Pediocina PA-1 que estão localizados em um plasmídeo de 9,4 kpb (MARUGG et al., 1992); ou ainda em transposons como no caso de Nisina cuja localização genética é em um transposon de 68 kpb (HORN et al., 1991). *Carnobacterium piscicola* LV17B produz duas bacteriocinas denominadas Carnobacteriocina B1 e B2, sendo uma codificada no cromossomo e outra em um plasmídeo de 61 kpb (QUADRI et al., 1994).

Os operons de lantibióticos geralmente contêm um gene que codifica para a pré-bacteriocina (*lanA*); genes de imunidade cujos produtos conferem proteção à célula produtora contra sua própria bacteriocina (*lanI* e *lanFEG*); genes que codificam enzimas necessárias à modificação pós-tradução (*lanB*, *lanC* e *lanM*), genes cujos produtos são responsáveis pela remoção da sequência líder

(*lanP*), gene que codifica proteína de transporte do tipo ABC (ATP-binding cassette) (*lanT*). Para a expressão de algumas bacteriocinas, há necessidade de genes adicionais relacionados à regulação e que codificam proteínas regulatórias (*lanR* e *lanK*) (JACK et al., 1995; NES et al., 1996; CLEVELAND et al., 2001; McAULIFFE et al., 2001; CHEN e HOOVER, 2003).

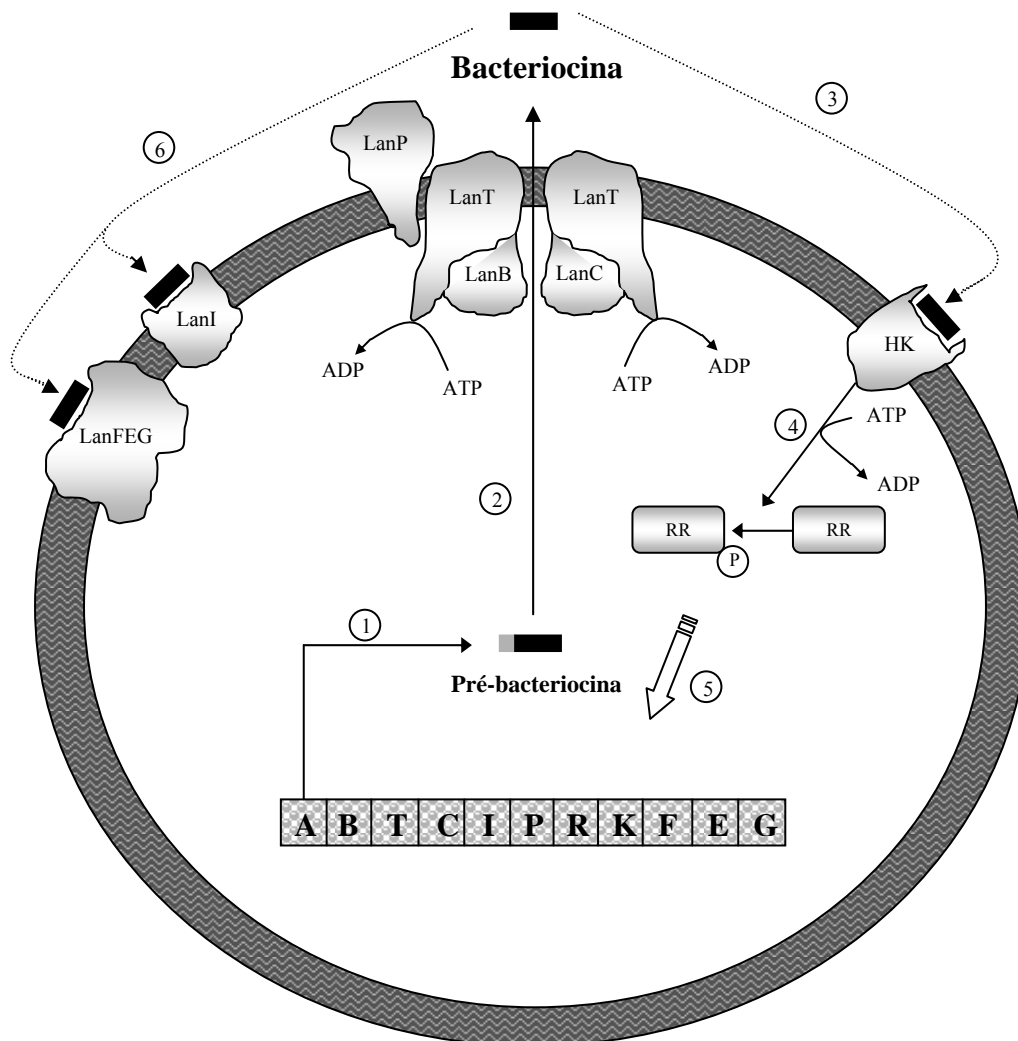
Os operons que codificam a síntese de bacteriocinas da classe II apresentam similaridade com os lantibióticos em sua organização genética. Consistem também de um gene que codifica um peptídeo precursor, genes que codificam proteínas de imunidade, transporte e em alguns casos proteínas regulatórias, e genes que codificam proteínas acessórias que são essenciais para a externalização das bacteriocinas da classe II. Essas proteínas acessórias não foram encontradas para lantibióticos (JACK et al., 1995; NES et al., 1996; ENNAHAR et al., 2000; McAULIFFE et al., 2001; CHEN e HOOVER, 2003).

## **5.2. Biossíntese de bacteriocinas**

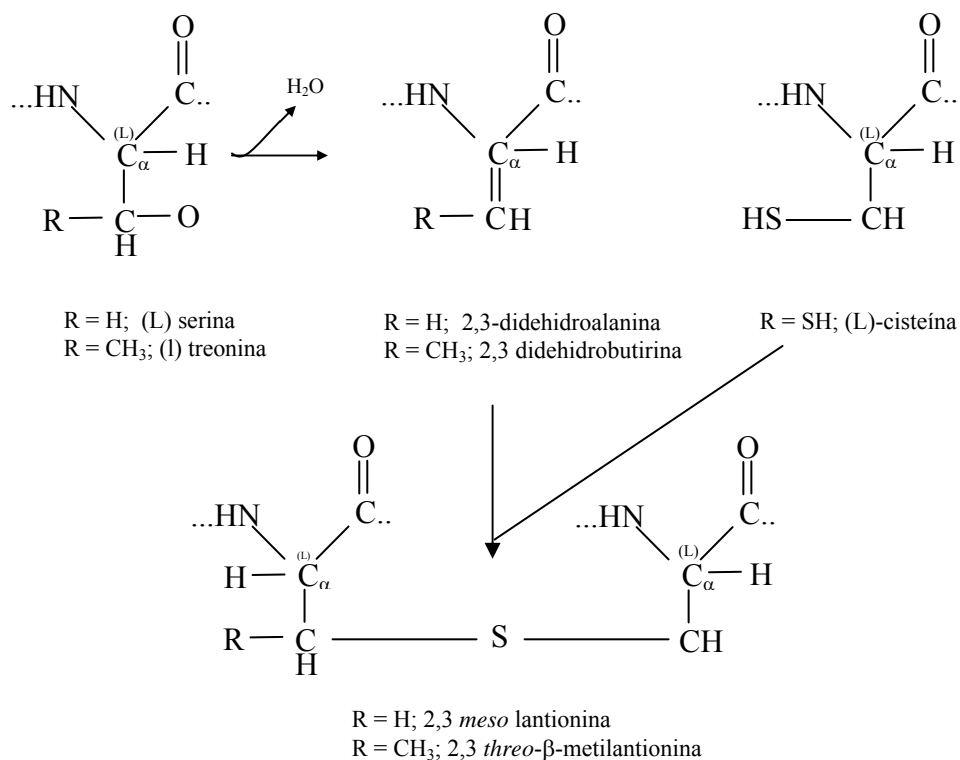
A maioria das bacteriocinas é sintetizada primeiramente como pré-peptídeo biologicamente inativo que contém uma seqüência líder ligada em sua parte carboxi-terminal. As seqüências líder das bacteriocinas que direcionam sua secreção geralmente consistem de 18 a 30 resíduos de aminoácidos. Várias funções para a seqüência líder já foram propostas. Elas servem como sítio de reconhecimento, os quais direcionam o pré-peptídeo para maturação e transporte através da membrana e protegem a célula produtora por manter a bacteriocina em estado inativo (McAULIFFE et al., 2001).

A via biossintética dos lantibióticos segue um esquema geral e está ilustrada na Figura 3. Inicialmente, ocorre a formação do pré-peptídeo, seguida por reações de modificações. O primeiro passo na modificação é a desidratação por enzima específica (LanB) dos aminoácidos serina e treonina, resultando em aminoácidos desidratados Dha e Dhb, respectivamente (Figura 4). A formação do aminoácido Lantionina é catalisada por enzimas LanC e ocorre quando uma

dupla ligação em Dha é atacada pelo grupo tiol (-SH) de uma cisteína vizinha; MeLan é formado quando a reação envolve o aminoácido Dhb (JACK e SALH, 1995; McAULIFFE et al., 2001; CHEN e HOOVER, 2003). Alguns aminoácidos desidratados não contêm cisteína na vizinhança e permanecem como tais nos peptídeos maduros. O pré-peptídeo modificado é processado por uma serino protease (LanP) e translocado através do transportador tipo ABC. Este processamento proteolítico resulta na ativação do peptídeo e dependendo da posição de LanP, ele pode acontecer antes ou após a translocação. Por exemplo, a protease LanP de Epicidina 280 e Pep5 (SAHL e BIERBAUM, 1998) estão localizadas intracelularmente, enquanto NisP de Nisina é uma protease extracelular. Lantibióticos do tipo B, como Lacticina 481, são modificados por uma única enzima (LanM) e o processamento acontece concomitantemente com o transporte (McAULIFFE et al., 2001; CHEN e HOOVER, 2003). Geralmente, todos os transportadores ABC contêm dois domínios, um domínio hidrofóbico localizado na membrana e um domínio citoplasmático com sítio para ligação de ATP. A região amino-terminal está envolvida com o processamento, enquanto a região carboxi-terminal contém dois domínios conservados de ligação de ATP. A hidrólise do ATP induz uma mudança conformacional e ocorre um fornecimento de energia suficiente para a exportação da bacteriocina (NES et al., 1996; McAULIFFE et al., 2001; CHEN e HOOVER, 2003).

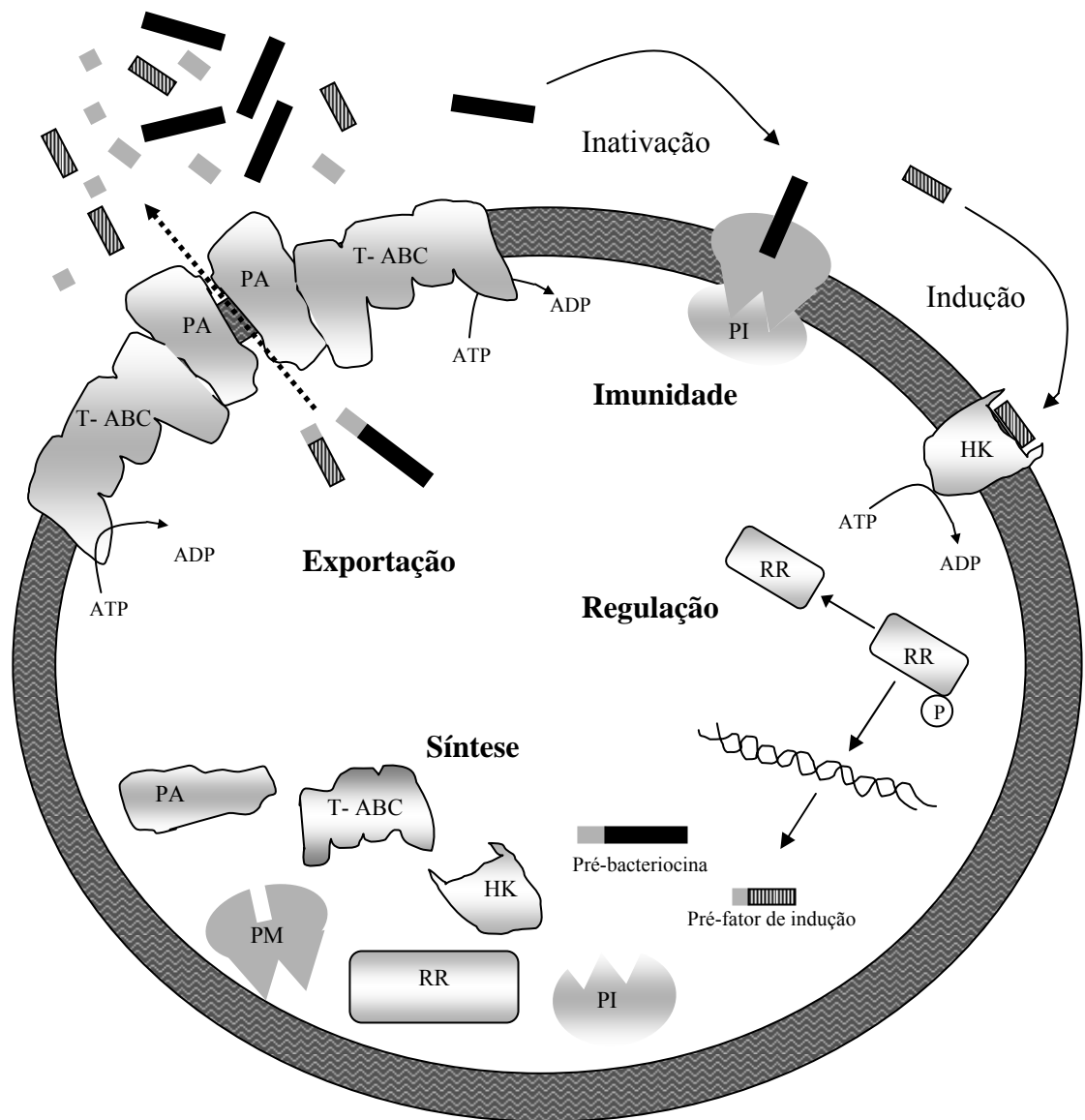


**Figura 3.** Representação esquemática da síntese de Lantibióticos. (1) Formação da pré-bacteriocina; (2) A pré-bacteriocina é modificada por LanB e LanC (proteínas envolvidas na modificação pós-traducional), translocada através do transportador LanT do tipo ABC e processado por LanP (serino protease), resultando na liberação da bacteriocina madura; (3) A bacteriocina serve de sinal e HK (Histidina Kinase) se autofosforila; (4) O grupo fosforil (P) é transferido para o RR (Regulador de Resposta); (5) RR ativa a transcrição dos genes regulados; (6) Imunidade da célula produtora é mediada pela proteína de imunidade LanI e pelas proteínas do transportador do tipo ABC, LanFEG (adaptado de CHEN e HOOVER, 2003).



**Figura 4.** Mecanismo geral de formação do aminoácido Lantionina durante maturação de lantibióticos (adaptado de McAULIFFE et al., 2001).

Bacteriocinas da classe II são sintetizadas como pré-peptídeo e possuem a região amino-terminal bastante conservada. Esta região contém um sítio de processamento proteolítico localizado entre duas glicinas, com exceção de bacteriocinas da classe IIc, as quais são produzidas com uma seqüência do “tipo sec” na região amino-terminal e são processadas e secretadas por uma via secretória (LEER et al., 1995; WOROBO et al., 1995). As bacteriocinas da classe II não passam por modificações pós-tradução e após a formação do pré-peptídeo, este é processado para remover a seqüência líder, concomitantemente com a exportação da bacteriocina por meio do transportador tipo ABC e da proteína acessória, duas proteínas ligadas à membrana (Figura 5) (NES et al., 1996; ENNAHAR et al., 2000).



**Figura 5.** Representação esquemática da maquinaria sugerida para produção de bacteriocinas da classe II, mostrando a síntese, excreção, imunidade e o sistema de regulação de três componentes. A bacteriocina é traduzida juntamente com o IF (fator de indução); a pré-bacteriocina e o pré-fator de indução são processados e translocados por meio do transportador do tipo ABC (T-ABC) e da proteína acessória (PA); o fator de indução ativo serve de sinal e se liga a HK (Histidina Kinase) que, uma vez ativada, fosforila o RR (Regulador de Resposta); o RR ativa a transcrição dos genes; a bacteriocina ativa interage indiretamente com a proteína de imunidade (PI) através de um alvo ou receptor comum, a proteína de membrana (PM) (adaptado de ENNAHAR et al., 2000a).

### 5.2.1. Regulação da biossíntese

A produção de algumas bacteriocinas parece ser estimulada por fatores de estresse tais como, baixa temperatura e presença de microrganismos competidores. Uma menor taxa específica de crescimento pode resultar em menor quantidade de ácido prejudicando a competição, e com isto a célula necessita de outros fatores como a produção de bacteriocina para competir. A produção pode ser controlada por um sistema de comunicação célula-célula conhecido como *quorum-sensing*, um sistema regulatório de transdução de sinal com dois componentes (O'KEEFFE e HILL, 1999).

A biossíntese de bacteriocinas das classes I e II é geralmente regulada por um sistema de transdução de sinais, de dois componentes, que consiste de uma proteína Histidina Kinase (HK), que funciona como um sensor na membrana da célula produtora de bacteriocina, e o segundo componente é o Regulador de Resposta (RR), que existe no citoplasma. Quando a HK recebe o sinal extracelular, que pode ser a própria bacteriocina, ela autofosforila-se no resíduo de histidina conservado. O grupo fosforil é subsequentemente transferido para um resíduo de ácido aspártico presente no RR. O RR fosforilado ativa a transcrição dos genes da bacteriocina, incluindo o gene estrutural, os da proteína de exportação e de imunidade e, em alguns casos os próprios genes regulatórios (NES et al., 1996; CHEN e HOOVER, 2003). A bacteriocina nisina é regulada por este sistema, onde a própria nisina atua como um sinal extracelular para regular sua própria síntese (Figura 3).

Em algumas estirpes produtoras de bacteriocinas da classe II, a síntese da bacteriocina é regulada por um sistema regulatório de três componentes, que incluem a HK, RR e um IF (fator de indução). O IF é secretado pela própria estirpe produtora e serve como sinal extracelular. Ele se liga a HK que, uma vez ativada, fosforila o RR o qual estimula a transcrição dos genes necessários para a produção da bacteriocina (Figura 5). O IF é um peptídeo pequeno, estável ao calor, catiônico e hidrofóbico que é sintetizado primeiramente como um pré-peptídeo com duas glicinas na seqüência líder. O IF é clivado no transportador

ABC e exportado concomitantemente com a bacteriocina madura (NES et al., 1996; ENNAHAR et al., 2000). Muitas bacteriocinas não podem ser produzidas na ausência do fator de indução. A produção de Enterocina A e B por *Enterococcus faecium* CTC492 é dependente da presença de um peptídeo extracelular. Este fator foi purificado e identificado como um peptídeo de 25 aminoácidos (NILSEN et al., 1998).

## **6. Imunidade da célula produtora**

Cada estirpe produtora tem um mecanismo de proteção contra a sua própria bacteriocina. Este sistema é referido como imunidade. A cada bacteriocina corresponde sua própria proteína de imunidade a qual é expressa concomitantemente. Em todos os operons de bacteriocinas estudados até agora, genes de imunidade têm sido identificados próximos aos genes estruturais da bacteriocina (NES et al., 1996; CLEVELAND et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais estas proteínas conferem imunidade ainda não foram totalmente esclarecidos. Dois sistemas de imunidade aos lantibióticos já foram identificados (Figura 3). No primeiro deles, a proteção é mediada por proteínas de imunidade (LanI) e o segundo consiste especialmente de proteínas do transportador ABC, LanFEG, que podem ser codificadas em duas ou três ORFs (Open Reading Frame). Além de *lanT* (gene que codifica proteína transportadora do tipo ABC), genes que codificam um segundo transportador já foram identificados para muitos lantibióticos. Estes dois sistemas trabalham sinergisticamente para proteger a célula produtora. As proteínas LanI possuem o domínio amino-terminal hidrofóbico e uma parte terminal carboxílica hidrofílica sugerindo que elas estão associadas à membrana, e conferem imunidade ao produtor por prevenir a formação de poros na membrana. As proteínas LanFEG aparentemente atuam por transportar de volta para o meio externo moléculas de bacteriocinas que se inserirem na membrana, e assim mantêm a concentração de

bacteriocina na membrana no nível crítico (SIEGERS e ENTIAN, 1995; McAULIFFE et al., 2001; CHEN e HOOVER, 2003).

Em bacteriocinas da classe II, o gene de imunidade geralmente codifica uma proteína que apresenta-se frouxamente associada com a membrana (Figura 5). É sugerido que a proteína de imunidade não interage diretamente com sua respectiva bacteriocina, mas interage de uma forma indireta através de um alvo ou receptor comum (ENNAHAR et al., 2000; CHEN e HOOVER, 2003). A proteína de imunidade de Carnobacteriocina B2, a CbiB2, foi purificada e experimentos *in vitro* mostraram que a maior parte de CbiB2 é encontrada no citoplasma e uma pequena porção está associada à membrana (QUADRI et al., 1995).

## **7. Modo de ação das bacteriocinas**

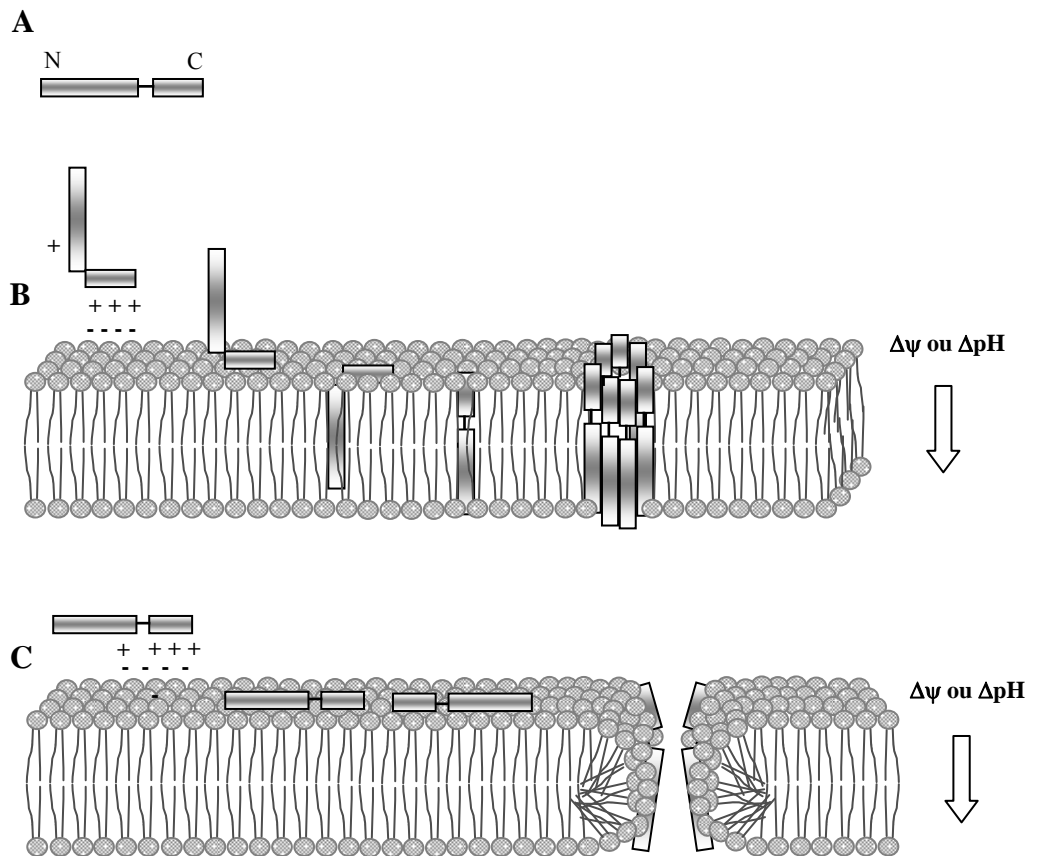
O alvo primário das bacteriocinas de bactérias lácticas é a membrana plasmática das células sensíveis onde promovem a dissipação da força próton-motora e liberação de várias substâncias intracelulares como aminoácidos, potássio, fosfato inorgânico e ATP intracelular (ABEE et al., 1995; MONTVILLE e CHEN, 1998; ENNAHAR et al., 2000). Além da liberação desses compostos de baixo peso molecular, há a ocorrência de outros efeitos secundários como a inibição do processo biológico como a síntese de proteínas, DNA, RNA, peptidoglicano e lise celular (MONTVILLE e BRUNO, 1994). A célula afetada é incapaz de direcionar energia para sintetizar macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos e morre rapidamente (JACK et al., 1995).

De maneira geral, o mecanismo de ação das bacteriocinas das classes I e II é considerado um processo de três etapas. A primeira etapa é a ligação da bacteriocina na membrana celular da bactéria alvo. Neste estágio, bacteriocinas são sensíveis a uma possível ação de enzimas proteolíticas. A segunda etapa é a sua inserção dentro da membrana causando a dissipação da força próton-motora e por fim a agregação dos monômeros resultando na formação de poros, por onde a

célula perde material intracelular. Esta etapa é irreversível e envolve mudanças letais na célula alvo (ABEE et al., 1995; MONTVILLE e CHEN, 1998; MOLL et al., 1999).

### **7.1. Modo de ação de Nisina**

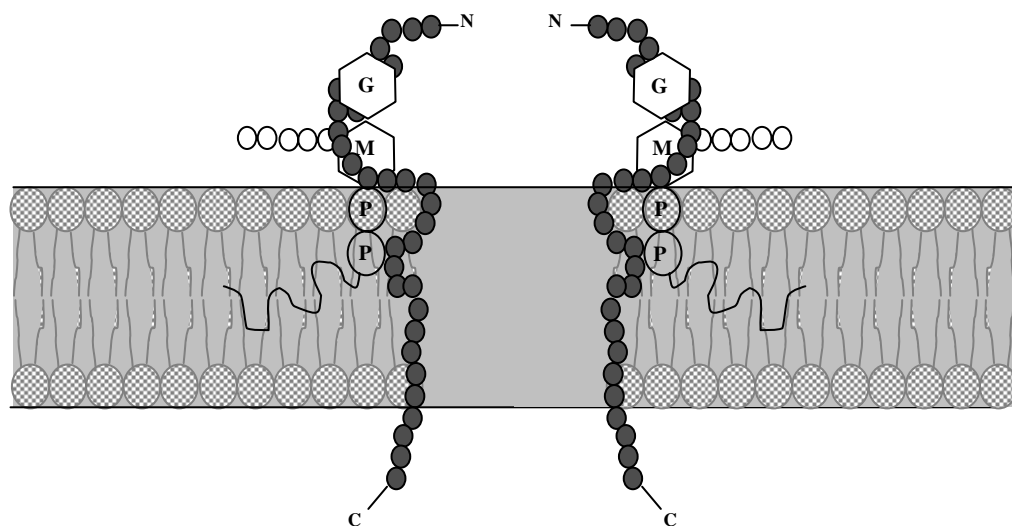
O modelo do modo de ação dos lantibióticos é o da nisina e concentra-se em estudos baseados em modelos de membranas biológicas. Muitos modelos têm sido propostos para o mecanismo de formação de poros por lantibióticos, mas pouco se sabe sobre a situação *in vivo*. O modelo “barrel-stave” (JUNG e SAHL, 1991) e o modelo “wedge” (DRIESSEN et al., 1995) fornecem mecanismos alternativos para a formação de poros (Figura 6). Bactérias Gram-positivas são caracterizadas pelo alto conteúdo de lipídeos aniônicos na membrana e devido ao caráter catiônico de nisina, ela se liga fortemente nesses lipídeos com sua extremidade carboxílica, via interação eletrostática. No modelo “barrel-stave”, nisina liga-se como monômero, sua parte amino-terminal insere-se na bicamada lipídica e o monômero inserido agrega-se lateralmente a outros para formar poros. Como lantibióticos são muito pequenos para atravessar a membrana várias vezes, sugere-se que várias moléculas se aglomeram na membrana para formar poros de 1nm (ABEE et al., 1995; MOLL et al., 1999). No modelo “wedge”, o poro é formado quando ocorre uma perturbação local na bicamada lipídica que ocorre quando várias moléculas de nisina se ligam, e são então puxadas para dentro da membrana por um dos componentes da força-próton motora, o potencial de membrana (dentro negativo) ou de pH (dentro alcalino). A bacteriocina não interage com o setor hidrofóbico da membrana e sua região hidrofóbica fica inserida apenas no folheto externo da bicamada lipídica (MOLL et al., 1999).



**Figura 6.** Modelos para formação de poros por Nisina. **A** - representação esquemática do peptídeo mostrando os domínios amino e carboxi-terminais entre uma região flexível; **B** – modelo “barrel-stave”; **C** – modelo “wedge”. Em ambos modelos, a ligação inicial envolve interação eletrostática e possíveis vias de ligação da bacteriocina à membrana. Os componentes da força próton-motora ( $\Delta\psi$  ou  $\Delta\text{pH}$ ) aumentam ou mediam a inserção e a formação de poros. Em ambos modelos, a face hidrofílica da molécula de nisina fica em contato com a membrana (adaptado de MONTVILLE e CHEN, 1998).

Os modelos descritos utilizam concentrações micromolares de nisina, mas a eficiência de nisina *in vivo* necessita apenas de concentrações nanomolares indicando que atividades adicionais ou alvos específicos podem estar envolvidos no modo de ação (HÉCHARD e SAHL, 2002). LINNETT e STROMINGER (1973) relataram que nisina inibe a biossíntese da parede celular por ligar-se no lipídeo II, o qual é precursor do peptidoglicano e denominado ácido undecaprenilpirofosforil-N-acetilmuramico (pentapeptídeo) -N-cetilglucosamina.

Deste resultado, surgiu a idéia de que o lipídeo II poderia estar envolvido na formação de poros. Estudos detalhados *in vitro* mostraram que lipídeo II serve como molécula de ancoramento para ligação específica da bacteriocina na membrana ou como núcleo para formação de poro (Figura 7) (BRÖTZ et al., 1998, BREUKINK et al., 1999). A vida útil do poro aumentou de milisegundos para cerca de 6 segundos na presença de lipídeo II e o tamanho do poro aumentou de 1 para 2-2.5 nm (MOLL et al., 1999). A combinação de dois mecanismos de ação, inibição da síntese do peptideoglicano e formação de poro, potencializa *in vivo* a atividade antimicrobiana e resulta em valores nanomolares de concentração inibitória mínima (HÉCHARD e SAHL, 2002).



**Figura 7.** Modelo de formação de poro por nisina utilizando o lipídeo II como molécula de ancoramento (adaptado de HÉCHARD e SAHL, 2002).

Além da formação de poros e inibição da parede celular, nisina e lantibióticos relacionados induzem a autólise de algumas espécies de *Staphylococcus*. As enzimas, N-acetilmuramoil-L-alanina amidase e N-acetilglucosaminidase, são proteínas catiônicas que se ligam fortemente à parede celular, via interações eletrostáticas com ácidos lipoteicoico, teicoico e

teicurônico carregados negativamente, mantendo as autolisinas inativas. Os lantibióticos substituem essas enzimas da parede celular, por um processo de troca iônica, liberando-as, o que resulta na ativação das autolisinas e uma rápida lise celular (BIERBAUM e SAHL, 1987).

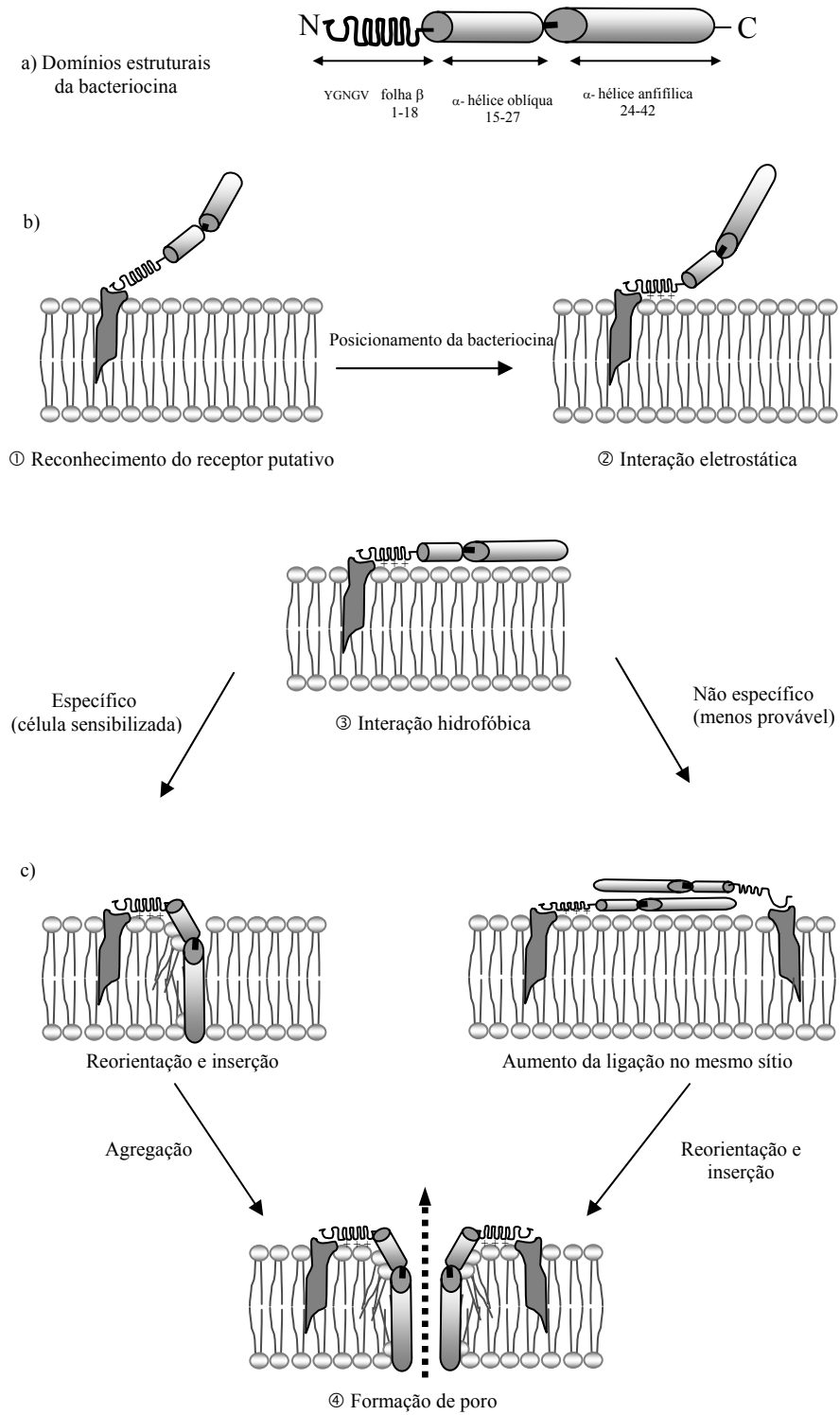
Nisina e subtilina inibem a germinação de esporos de bacilos e clostrídios. O mecanismo de inibição ainda não é bem esclarecido, embora seja bem determinado que a ação é esporostática. A atividade de inibição depende da presença do resíduo Dha na posição 5 e presume-se que nisina interage com grupo sulfidrílico presente na membrana bacteriana, que é essencial para a germinação do esporo (LIU e HANSEN, 1983; MORRIS et al., 1984).

## **7.2. Modo de ação de bacteriocinas da classe II**

As bacteriocinas da classe II também atuam principalmente na membrana de microrganismos susceptíveis através da formação de poros causando um desbalanço iônico e liberação de fosfato inorgânico (KLAENHAMMER et al., 1993; JACK et al., 1995; ABEE et al., 1995). Ao contrário dos lantibióticos, não ocorre liberação de ATP que pode ser devido ao menor tamanho dos poros causados pelas bacteriocinas da classe II (MOLL et al., 1996). A Figura 8 mostra uma representação esquemática do processo de formação de poros por bacteriocinas da classe II. O primeiro passo para formação de poros é a ligação da bacteriocina à membrana que ocorre devido à interação eletrostática da bacteriocina com uma molécula receptora ligada à membrana alvo. As bacteriocinas da classe II apresentam na região amino-terminal uma estrutura característica de folha  $\beta$  pregueada e, em uma volta  $\beta$  encontra-se o motivo -YGNGV-, o qual é facilmente exposto e pode ser reconhecido pelo receptor putativo na membrana (MONTVILLE e CHEN, 1998). Vários estudos têm demonstrado o envolvimento de uma proteína como molécula alvo e recentemente, o sistema PTS de manose (fosfotransferase dependente de fosfoenolpiruvato),  $EII_t^{Man}$ , foi proposto como receptor para todas as

bacteriocinas da subclasse IIa em *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e em outras bactérias sensíveis (DALET et al., 2001; HÉCHARD et al., 2002). A presença da folha  $\beta$  pregueada fornece uma característica anfifílica nesta região, a qual é de grande significância na interação eletrostática da bacteriocina com a membrana. Pressume-se que a bacteriocina também estaria envolvida no passo de reconhecimento (CHEN et al., 1997).

Após interação eletrostática, ocorre interação hidrofóbica entre a região carboxílica e os lipídeos da membrana, que é crucial para o processo de formação de poros. De fato, a região carboxílica é mais hidrofóbica e contém um domínio que parece que está envolvido com o mecanismo de interação hidrofóbica. Interação hidrofóbica pode ocorrer entre resíduos de aminoácidos na região que determina especificidade e os componentes de membrana (FIMLAND et al., 1998). Após interação hidrofóbica, a bacteriocina pode ser reorientada para uma posição mais energeticamente favorável e insere na membrana seguida por agregação (KAISER e MONTVILLE, 1996). Alternativamente, pode ocorrer um acúmulo de bacteriocinas na superfície da membrana causando sua desestabilização e formação do poro, o que parece menos provável de ocorrer (ENNAHAR et al., 2000a).



**Figura 8.** Modelo de estrutura de uma bacteriocina da classe IIa e modelo de formação de poros. (a) domínios estruturais da bacteriocina; (b) possível interação de cada domínio com a superfície da membrana; (c) inserção da bacteriocina e formação de poro hidrofílico (modelo “barrel- stave”) (adaptado de ENNAHAR et al., 2000a).

## 8. Resistência

A maior preocupação com relação ao uso de bacteriocinas como conservante alimentar é a freqüente ocorrência de resistência à bacteriocina, entre espécies bacterianas que são normalmente sensíveis, uma vez que isto pode comprometer a eficiência antibacteriana deste composto. Dentro de uma dada espécie, linhagens altamente tolerantes e/ou resistentes podem existir naturalmente ou após exposição a bacteriocinas (DAVIES e ADAMS, 1994; MAISNIER-PATIN e RICHARD, 1996; ENNAHAR et al., 2000b).

A maioria dos estudos com o surgimento de mutantes resistentes e/ou altamente tolerantes de bactérias sensíveis expostas a nisina tem sido com *Listeria* spp. A resistência de *L. monocytogenes* a bacteriocinas da classe II também tem sido observada. ENNAHAR et al. (2000b) verificaram que linhagens de *Listeria* spp foram naturalmente resistentes a bacteriocinas da classe IIa, mas não apresentaram resistência a nisina.

Um dos mecanismos de resistência envolve a adaptação da célula a altas concentrações de bacteriocina. Linhagens de *L. monocytogenes* desenvolveram resistência espontaneamente a nisina em uma freqüência relativamente alta, de  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$ , em meio de cultura e em alimentos (HARRIS et al., 1991). O mecanismo implicado na resistência a bacteriocina parece ser complexo e envolve várias mudanças fisiológicas e estruturais nas células bacterianas. Modificações na composição da membrana plasmática são freqüentemente estudadas para explicar a resistência, considerando o papel primordial da membrana na atividade das bacteriocinas.

No caso da resistência de *L. monocytogenes* a nisina são descritas alterações na composição de ácidos graxos (MING e DAESCHEL, 1993; MAZZOTTA e MONTVILLE, 1997) e de fosfolipídios (MING e DAESCHEL, 1995; VERHEUL et al., 1997), as quais rendem uma membrana menos fluida que previne a inserção de moléculas de nisina. Mudanças específicas na composição de ácidos graxos incluem a presença de uma menor taxa de ácidos graxos C-15 a C-17 nas linhagens resistentes do que nas selvagens (MAZZOTTA

e MONTVILLE, 1997), maior quantidade de fosfatidiletanolamina zwitter iônica e menor de fosfatidilglicerol aninônico e cardiolipina (VERHEUL et al., 1997). Além da alteração na composição da membrana, modificações na parede celular (DAVIES e ADAMS, 1994) e requerimento de cátions divalentes também podem acontecer (CRANDALL e MONTVILLE, 1998).

Estudos mais recentes sobre o mecanismo de resistência a bacteriocinas da classe IIa mostram que há evidência de um mecanismo prevalente entre várias linhagens de *Listeria* spp. e de *E. faecalis* (GRAVESEN et al., 2002; HÉCHARD et al., 2001). Este mecanismo envolve a ausência da subunidade EIIAB específica do sistema PTS de manose. PTS é um grupo de translocação de transporte de açúcar onde este é fosforilado durante o transporte. O fosfato é transferido do fosfoenolpiruvato (PEP) via proteínas do sistema PTS, EI, HPr e EII. O EII é um complexo permease composto de três ou quatro subunidades: IIA e IIB são responsáveis pela fosforilação, IIC é uma subunidade integral envolvida no transporte do açúcar e IID encontra-se geralmente associada com IIC e é encontrada especificamente em permeases da família manose (POSTMA et al., 1993). Estudos realizados por DALET et al. (2001) e GRAVESEN et al. (2002) mostraram que uma inativação no gene *mptA*, que codifica para a subunidade EIIAB, que reside no operon de  $EII_t^{Man}$  de *L. monocytogenes* resultou num alto nível de resistência a bacteriocinas da classe IIa. Vale ressaltar que esta mesma subunidade do PTS-manose foi proposta como receptora para todas as bacteriocinas da subclasse IIa durante o processo de formação de poros.

## **9. Aplicação de bacteriocinas ou culturas bacteriocinogênicas em alimentos**

A adição direta de bacteriocinas e o uso de bactérias lácticas bacteriocinogênicas associadas com alimentos constituem meios de conservar alimentos e bebidas dos efeitos deletérios de microrganismos deterioradores e patogênicos (NETTLES e BAREFOOT, 1993). Segundo SCHILLINGER et al.

(1996) várias estratégias para aplicação de bacteriocinas na preservação de alimentos podem ser consideradas:

1. Inoculação de bactérias lácticas (culturas *starter* ou protetoras) nos alimentos que produzam bacteriocina *in situ*;
2. Adição da bacteriocina purificada ou semi-purificada como conservante alimentar;
3. Uso de um produto previamente fermentado com a linhagem produtora de bacteriocina como um ingrediente no processamento.

A nisina é a única bacteriocina considerada GRAS (Generally Reconized As Safe) para uso específico em alimentos, é considerada não tóxica e de natureza não alergênica (FEDERAL REGISTER, 1988). Foi primeiramente comercializada na Inglaterra em 1953 e desde então tem longa história de uso em alimentos em pelo menos 48 países. É usada como ingrediente de preservação em queijos frescos e processados, alimentos enlatados, vegetais processados e alimentos para bebês, sendo mais estável em alimentos de acidez mais alta. Os níveis de nisina usados variam de 2,5 a 100 mg/Kg (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). A legislação brasileira permite o uso de nisina em queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/Kg (Portaria DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996). A nisina é adicionada aos produtos na forma de pó concentrado, preparado a partir de leite desnatado fermentado, e é comercializada como Nisaplin<sup>®</sup> (Aplin and Barret Ltd.) cuja preparação contém 2,5% de nisina, 77,5% de NaCl e leite em pó desnatado (12% de proteínas e 6% de carboidratos) (O'SULLIVAN et al., 2002; COTTER et al., 2005). Outra bacteriocina de bactérias lácticas usada em alimentos é Pediocina PA-1 produzida por linhagens de *Pediococcus acidilactici*. Pediocina PA-1 ainda não foi aprovada como conservante alimentar pelo FDA nem no Brasil, porém é objeto de várias patentes americanas e européias, e é comercializada nesses países na forma de um composto denominado ALTA 2431 (STILES, 1996; MONTIVILLE e CHEN, 1998; CLEVELAND et al., 2001; COTTER et al., 2005).

Existem vários fatores a serem considerados antes de adicionar diretamente uma bacteriocina no alimento. SCHILLINGER et al. (1996) relatam

alguns fatores que podem afetar a eficiência das bacteriocinas nos alimentos: (i) ligação da bacteriocina aos componentes do alimento tais como partículas de gordura ou de proteínas de superfície, (ii) surgimento de microrganismos resistentes à bacteriocina, (iii) condições que desestabilizem a atividade biológica da bacteriocina, como proteases ou processos de oxidação, (iv) inativação por outros aditivos; (v) baixa solubilidade e distribuição irregular no alimento, (vi) efeito do pH sobre a estabilidade e atividade da bacteriocina. Estudos mostraram que a atividade de nisina contra *L. monocytogenes* diminui com o aumento da concentração de gordura; nisina provavelmente liga-se aos glóbulos de gordura reduzindo sua disponibilidade para inibir as células de *L. monocytogenes* (JUNG et al., 1992),

Algumas características são importantes para a aplicação de bactérias lácticas bacteriocinogênicas como bioconservantes em alimentos: primeiramente a bactéria produtora de bacteriocinas deve ser GRAS e deve ter capacidade para crescer e produzir bacteriocina no alimento; a produção de bacteriocina deve ser confiável; a bacteriocina deve ter atividade bactericida, ser estável no ambiente e deve ser produzida preferencialmente no início do crescimento; a bacteriocina deve ter amplo espectro de inibição ou ter atividade contra um patógeno específico; a bacteriocina deve ser estável ao calor, de natureza não tóxica e a sua introdução deve melhorar a segurança, aroma e qualidade do produto; a cultura produtora deve ter uma limitada produção de ácido e de gás, não produzir polissacarídeos e possuir uma fraca atividade proteolítica (McMULLEN e STILES, 1996; COTTER et al., 2005). O uso de bactérias lácticas bacteriocinogênicas apresenta a melhor opção para introduzir bacteriocinas em carnes, pois elas podem fornecer a bacteriocina por um período de tempo maior. Porém, alguns fatores podem contribuir para a redução da atividade como, perda espontânea da habilidade de produzir bacteriocina, antagonismo por outros microrganismos presentes no alimento, infecção por fago e um meio ambiente inadequado para produção de bacteriocina, por exemplo, temperatura, pH, nutrientes e presença de enzimas exógenas (NETTLES e BAREFFOT, 1993; SCHILLINGER et al., 1996).

Uma das vantagens associadas com o uso de bacteriocinas em alimentos é que elas são consideradas constituintes normais da dieta de homens e animais, presentes nas carnes e em produtos lácteos, que são fontes ricas de bactérias do ácido lático bacteriocinogênicas. Por serem de natureza protéica, a degradação das bacteriocinas no alimento é indesejável, porém apresentam a vantagem de poder serem inativadas por proteases de origem gástrica e pancreática durante passagem no trato gastrointestinal e, portanto, não são absorvidas pelo organismo na sua forma ativa e nem interferem com a microbiota intestinal (CAPLICE e FITZGERALD, 1999; O'KEEFFE e HILL, 1999). Outra vantagem é que a maioria das bacteriocinas possui boa termoestabilidade e assim pode sobreviver ao processamento térmico dado a alguns alimentos. Outras possuem atividade em baixa temperatura e em baixo pH, sendo assim, podem ser úteis em alimentos ácidos, produtos processados pelo frio e àqueles estocados sob refrigeração (SCHILLINGER et al., 1996).

A maior limitação para aplicação de bacteriocinas em alimentos é com relação à sua incapacidade de inibir bactérias Gram-negativas e ao baixo espectro de inibição. Para superar esta limitação e aumentar a segurança e vida útil do produto, o uso de outros obstáculos ao desenvolvimento microbiano tem sido proposto. Os métodos geralmente mais empregados são o uso de baixa ou alta temperatura, agentes quelantes, alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado, antimicrobianos como sorbato de potássio e diacetato de sódio, atmosfera modificada, sistema lactoperoxidase e combinação de bacteriocinas (LEISTNER, 2000; CLEVELAND et al., 2001; CHEN e HOOVER, 2003). A eficiência antimicrobiana das bacteriocinas pode ser aumentada quando estas são usadas em combinação com outros processos tecnológicos. Frequentemente, em uma população sensível, algumas células podem ser resistentes a uma barreira, mas podem ser inibidas por outra (SCHILLINGER et al., 1996). O uso combinado de Nisina (1000 ou 10000 IU/mL) e embalagem por atmosfera modificada (MAP) inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas fragi* mais eficientemente do que o tratamento com apenas Nisina (FANG e LIN, 1994). Nisina (2000 IU/mL) usada com EDTA, citrato ou lactato em combinação com

MAP foi efetiva contra as bactérias Gram-negativas *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7 (CUTTER e SIRAGUSA, 1995). A combinação de várias bacteriocinas tem sido usada para aumentar a atividade antimicrobiana. BOUTTFROY e MILLIÈRE (2000) verificaram que a combinação de Nisina (50 IU/mL) e Curvaticina 13 (160 AU/mL) teve maior efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* do que uma única bacteriocina. Outros tratamentos utilizados juntamente com bacteriocinas que produzem um efeito sinérgico de inibição foram estudados por vários autores, e foram citados por CLEVELAND et al. (2001) e CHEN e HOOVER (2003).

Bacteriocinas podem também ser usadas para promover qualidade ao invés de simplesmente prevenir a deterioração e garantir segurança microbiológica. Bacteriocinas podem ser usadas para controlar a microbiota não *starter*, como bactérias do ácido láctico não *starter* (BALNS) em queijos e vinhos. A formação de cristais de lactato de cálcio e de queijos com muitos buracos são alguns dos defeitos em queijos causados pelo crescimento não controlado dessas BALNS. Em vinhos, ocorre a produção de compostos prejudiciais ao sabor. Bactérias lácticas *starter* ou *starter* adjunto com capacidade de produzir bacteriocinas estão sendo usadas para reduzir significativamente estes problemas, embora a eliminação completa dessas BALNS nem sempre é desejável, pois muitas podem contribuir para melhorar o sabor desses produtos (O'SULLIVAN et al., 2002; COTTER et al., 2005). Queijos Cheddar processados com linhagens *starter* de *Lactococcus lactis*, que produzem a bacteriocina Lacticina 3147, apresentaram níveis bem menores de BALNS no produto final (RYAN et al., 1996).

Um novo foco de interesse surgido na última década é a incorporação de bacteriocinas nas embalagens, para controlar o crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos (SCHILLINGER et al., 1996). A inibição ocorre por contato direto da embalagem com a superfície dos alimentos como carnes e queijos. Um dos métodos usados para preparar filmes com bacteriocinas é incorporá-la na formulação do plástico (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002). SIRAGUSA et al. (1999) incorporaram nisina em filme plástico que foi usado

para embalar a vácuo carcaças de boi. Nisina manteve atividade contra *Lactobacillus helveticus* e *Brochotrix thermophacta* inoculadas nessas carcaças e, após estocagem de 20 dias sob temperatura de 4 ou 12 °C, as populações foram significativamente menores que do controle (sem Nisina).

Outro método propõe revestir ou adsorver a bacteriocina na superfície do polímero. Envoltórios de celulose e sacos plásticos revestidos com Pediocina, usados para embalar carnes e frangos estocados a 4°C, inibiram completamente o crescimento de *L. monocytogenes* por 12 semanas (MING et al., 1997).

O uso de bacteriocinas está tradicionalmente associado com a preservação de alimentos, mas em um futuro próximo o alimento poderá servir como veículo de bactérias probióticas que produzem bacteriocinas. A produção de bacteriocinas por culturas probióticas é uma característica desejável, pois elas podem contribuir para inibir bactérias patogênicas no intestino. Bactérias bacteriocinogênicas probióticas podem ser ingeridas de forma que facilite o trânsito no trato gastro-intestinal, permitindo a produção *in vivo* de bacteriocinas no intestino delgado ou grosso (TANNOCK, 1997; TYÖPPÖNEN et al., 2002; COTTER et al., 2005).

Aplicações clínicas para bacteriocinas de bactérias lácticas também têm sido propostas, principalmente devido à ação dos lantibióticos contra bactérias patogênicas Gram-positivas de origem humana e animal (COTTER et al., 2005). O lantibiótico Lacticina 3147 tem capacidade de inibir vários desses patógenos como, *S. aureus* (incluindo linhagens resistentes a meticilina – MRSA), *Streptococcus* (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. uberis*, dentre outros), *Clostridium botulinum* e *Propionibacterium acnes* (GALVIN et al., 1999). Em ensaios com modelos animais a aplicação de lantibióticos tem tido muito sucesso no tratamento de infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae* (GOLDSTEIN et al., 1998), por *S. aureus* (SARM) (NIU e NEU, 1991) e na prevenção de cáries e gengivites (RYAN et al., 1999). O uso de nisina para aplicação clínica em humanos foi licenciada para Biosynexus Incorporated pela Nutrition 21 e o uso clínico em animais pode ser exemplificado pelo produto

anti-mastítico Mast Out licenciado pelo ImmuneCell Corporation para Pfizer Animal Health (COTTER et al., 2005).

Em geral, todas as aplicações industriais de bacteriocinas envolvem a exploração daquelas que apresentam amplo espectro de inibição, atuação em grande faixa de pH e estabilidade ao calor, sendo esta a mais importante (ROSS et al., 1999). Um obstáculo que necessita ser superado antes do uso comercial de uma nova bacteriocina como bioconservante é o de que a bacteriocina deve ser aprovada como um aditivo alimentar. Para aprovação, a bacteriocina deve ser identificada e caracterizada quimicamente e sua eficiência deve ser demonstrada. É necessário entender a biologia das bacteriocinas, elucidar sua regulação, imunidade, modo de ação e produção. O processo de produção e o ensaio usado para quantificação e padronização do peptídeo devem ser descritos. Dados toxicológicos e o destino da molécula após ingestão são também necessários (CLEVELAND et al., 2001). No entanto, a produção *in situ* não é sujeita à mesma regulamentação (SCHILLINGER et al., 1996). O uso de culturas *starter* que produzam bacteriocinas como ingrediente pode não requerer consideração especial se a cultura for considerada GRAS (CLEVELAND et al., 2001).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 28, p. 169-185, 1995.
- APPENDINI, P. HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innov. Food Sci. Ermerg. Technol.**, v. 3, p. 113-126, 2002.
- AYMERICH, M. T., HOLO, H., HAVARSTEIN, L. S., HUGAS, M., GARRIGA, M., NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new listerial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 1676-1682, 1996.
- AYMERICH, M. T., HUGAS, M., MONFORT, J. M. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Sci. Technol. Int.**, v. 4, n. 3, p. 141-158, 1998.
- AXELSSON, L. T., CHUNG, T. C., DOBROGOSZ, W. J., LINDGREN, S. E. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbiol. Ecol. Heath Dis.**, v. 2, p. 131-136, 1989.
- BACUS, J. N., BROWN, W., L. Use of microbial cultures: meat products. **Food Technol.**, v. 35, n. 1, p. 74-78, 1981.
- BAHK, J., MARTH, E. H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne disease**, Califórnia: Academic Press Inc., 1990. p. 247-257.
- BIERBAUM, G., SAHL, H. G. Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22 influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. **J. Bacteriol.**, v.169, p. 5452-5458, 1987.
- BOUTTEFROY, A., MILLIÈRE, J. B. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, p. 65-85, 2000.

- BREUKINK, E., WIEDEMANN, I., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O. P., SAHL, H. -G., KRUIFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science**, v. 286, p. 2361-2364, 1999.
- BRÖTZ, H., BIERBAUM, G., LEOPOLD, K., REYNOLDS, P. E., SAHL, H-G. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 42, p. 154-160, 1998.
- BRÖTZ, H., SAHL, H-G. New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target. **J. Antimicrob. Chemot.**, v. 46, p. 1-6, 2000.
- CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, n.(1-2), p. 131-149, 1999.
- CASAU, M. P., NILSEN, T., CINTAS, L. M., NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E., HOLO, H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiology**, v. 143, p. 2287-2294, 1997.
- CINTAS, L. M., RODRÍGUEZ, J. M., FERNÁNDEZ, M. F., SLETTEN, K., NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E., HOLO, H. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2643-2648, 1995.
- CHASSY, B. M., MURPHY, C. M. *Lactococcus* and *Lactobacillus*. In: SONENSHEIN, A. L., HOCH, J. A., LOSICK, R. (Eds.). **Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria**. Washington D. C.: American Society for Microbiology, 1993. p. 65-82.
- CHEN, Y., SHAPIRA, R., EISENTEIN, 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.**, v. 63, p. 5240-531, 1997.
- CHEN, H., HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety**, v. 2, p. 82-100, 2003.
- CINTAS, L. M., RODRÍGUEZ, J. M., FERNÁNDEZ, M. F., SLETTEN, K., NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E., HOLO, H. Isolation and characterization of

- pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2643-2648, 1995.
- CINTAS, L. M., CASAUS, M. P., FERNÁNDEZ, M. F., HERNÁNDEZ, P. E. Comparative antimicrobial activity of pediocin PA-1, enterocin L50, nisin A and lactocin S against spoilage and food-borne pathogenic bacteria. **Food Microbiol.**, v. 15, p. 289-298, 1998.
- CINTAS, L. M., CASAUS, M. P., HERRANZ, C. NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Sci. Technol. Int.**, v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.
- 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.
- CLIVER, D. O., MARTH, E. H. Preservation, sanitation and microbiological specifications for food. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne disease**, California: Academic Press Inc, 1990. p. 85-106.
- CONTRERAS, B. G. L., De VUYST, L., DEVREESE, B., BUSANYOVA, K., RAYMAECKERS, I., BOSMAN, F., SABLO, E., VANDAMME, E. J. Isolation, purification and characterization of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 13-20, 1997.
- COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature**, v. 3, p. 777-788, 2005.
- CRANDALL, A. D., MONTVILLE, T. J. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 231-237, 1998.
- CUTTER, C. N., SIRAGUSA, G. R. Population reductions of Gram negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. **J. Food Protect.**, v.58, p. 977-983, 1995.
- DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technol.**, v. 43, n. 1, p. 164-167, 1989.

- DALET, K., CENATIEMPO, Y., COSSART, P., The European *Listeria* Genome Consortium, HÉCHARD, Y. A  $\sigma^{54}$ -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. **Microbiology**, v. 147, p. 3263-3269, 2001.
- DAVIES, E. A., ADAMS, M. R. Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 21, p. 341-347, 1994.
- DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. In: **International Symposium of Lactic Acid Bacteria**, San Miguel de Tucumán, Argentina, 7-11 de Outubro, 1996.
- De VUYST, L., VANDAMME, E. J. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* strain: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De VUYST, L., VANDAMME, E. J. (Ed). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application**, London: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 151-221.
- DRIESSEN, A. J. M., VAN DEN HOOVEN, H. W., KUIPER, W., VAN DE KAMP, M., SAHL, H. G. KONINGS, R. N. H., KONINGS, W. N. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. **Biochemistry**, v. 34, p. 1606-1614, 1995.
- EIJSINK, V. G. H., AXELSSON, L., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., HOLO, H., NES, I. F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 639-654, 2002.
- EKULAND, T. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake process in the bacterial membrane vesicles. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 1, p. 179-185, 1984.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 85-106, 2000a.
- ENNAHAR, S., DESCHAMPS, N., RICHARD, J. Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. **Current Microbiol.**, v. 41, p. 1-4, 2000b.

- FANG, T. J., LIN, L. W. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packaging/nisin combination. **J. Food Protect.**, v.57, p. 479-485, 1994.
- FEDERAL REGISTER. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Fed. Regist.** 54, 11247-11251.
- FIMLAND, G., JACK, R., JUNG, G., NES, I. F., NISSEN-MEYER, J. the bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment de spans the bacteriocin from the center towards the C-terminus. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 5057-5060, 1998.
- FOX, P. F. Cheese: an overview. In: FOX, P. F. (Ed). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. v. 1, 2 ed., London: Chapman & Hall, 1993. p. 1-36.
- GALVIN, M., HILL, C., ROSS, R. P. Lacticin 3147 displays activity en buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 355-358, 1999.
- GONZÁLEZ, B., ARCA, P., MOYO, B., SUÁREZ, J. E. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 2158-2163, 1994.
- GOLDSTEIN, B.P., WEI, J., GREENBERG, K., NOVICK, R. Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae in vitro*, and a mouse infection model. **J. Antimicrob. Chemot.**, v. 42, p. 277-278, 1998.
- GRAVESEN, A., RAMNATH, M., RECHINGER, K. B., ANDERSON, N., JÄNSCH, L., HÉCHARD, Y., HASTINGS, J. W., KNØCHEL, S. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, v. 148, p. 2361-2369, 2002.
- HANSEN, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the culture. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 78, p. 119-131, 2002.
- HARRIS, L. J., FLEMING, H. P., KLAENHAMMER, T. R. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL 500 to nisin. **J. Food Protect.**, v.54, p. 836-840, 1991.

- HÉCHARD, Y., CENATIEMPO, Y., FRÈRE, J. Analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent genes in *Enterococcus faecalis* a manose PTS permease (EII<sup>Man</sup>) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesenterocin Y105. **Microbiology**, v. 147, p. 1575-1580, 2001.
- HÉCHARD, Y., SAHL, H-G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, v. 84, p. 545-557, 2002.
- HERRANZ, C., CASAUS, P., MUKHOPADHYAY, S., MARTÍNEZ, J. M., RODRÍGUEZ, J. M. NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E., CINTAS, L. M. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 115-131, 2001.
- HOLCK, A., AXELSSON, L. SCHILLINGER, U. Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 136, p. 163-168, 1996.
- HOLO, H., NISSEN, O. NES, I. F. Lactococcin A a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3879-3887, 1991.
- HORN, N., SWINDELL, S., DODD, H. M., GASSON, M.J. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. **Molec. Gen. Genet.**, v. 228, p. 129-135, 1991.
- HURST, A. Nisin. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 85-123, 1981.
- JACK, R. W., TAGG, J. R. RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, V. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.
- JACK, R. W. SAHL, H. G. Unique peptide modification involved in the biosynthesis of lantibiotics. **Tibtech**, v. 13, p. 269-278, 1995.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R., RÍOS-SANCHEZ, R. M., DESMAZEAUD, M., RUIZ-BARBA, J. L., PIARD, J. C. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green live fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 1416-1424, 1993.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, RCATHCART, D. P., HOLO, H., NES, I. F., SLETTEN, K. H., WARNER, P. J. Purification and partial amino sequence of plantaricin S,

- a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 4459-4463, 1995.
- JOERGER, M. C., KLAENHAMMER, T. R. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacteriol.**, v. 167, p. 439-446, 1986.
- 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.**, v. 75, p. 387-393, 1992.
- JUNG, G., SAHL, H. G. Nisin and Novel Lantibiotics. ESCOM, Leiden, 1991.
- KAISER, A. L., MONTVILLE, T. J. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 4529-4535, 1996.
- KALCHAYANAND, N., SIKES, A., DUNNE, C. P., RAY, B. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. **J. Food Protect.**, v. 1, p. 425-431, 1998.
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 39-86, 1993.
- LARSEN, A. G., VOGENSEN, F. K., JOSEPHSEN, J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1410. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, p. 113-122, 1993.
- LEER, R. J., VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M., VAN GIEZEN, M., VAN NOORT, J. M., POWELS, P. H. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Microbiology**, v. 141, p. 1639-1635, 1995.
- LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 55, p. 1813-186, 2000.

- 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.
- LINDGREN, S. E., DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 87, p. 149-163, 1990.
- LINNETT, P. E., STROMINGER, J. L. Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 4, p. 231-236, 1973.
- LIU, W., HANSEN, J. N. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 648-651, 1993.
- LUCKE, F. K. Fermented sausages. In: WOOD, B. J. B. **Microbiology of fermented foods**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1985, v. 2, p. 41-84.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8 ed. Prentice-Hall. 1997. 986p.
- MAISNIER-PATIN, S., RICHARD, J. Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 140, p. 29-35, 1996.
- MATTICK, A. T. R., HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **Lancet**, v. 2, p 5-7, 1947.
- MAYRA-MAKINEN, A., SUOMALAINEN, T. *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus*, bacterial preparations for the controlling of yeast and moulds. U. S. Patent US 5. 378.458, 1995.
- MAZZOTA, A. S., MONTVILLE, T. J. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 82, p. 32-38, 1997.
- McAULIFFE, O., ROSS, R. P., HILL, C. Antibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 285-308, 2001.

- McMULLEN, L. M., STILES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **J. Food Protect.**, Suppl., p. 64-71, 1996.
- MING, X. DAESCHEL, M. A. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. **J. Food Protect.**, v. 26, p. 944-948, 1993.
- MING, X., DAESCHEL, M. A. Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. **J. Food Protect.**, v. 58, p. 416-420, 1995.
- MING, X., WEBER, G., AYRES, J., SNDINE, W. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **J. Food Sci.**, v. 62, p. 413-415, 1997.
- MOLL, G. N., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 185-198, 1999.
- MONTVILE, T. J., BRUNO, M. E. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. **Int. J. Food Microbiol.**, 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.**, v. 50, p. 511-519, 1998.
- MORRIS, S. L., WALSH, R. C., HANSEN, J. N. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. **J. Biol. Chemist.**, v. 201, p. 581-584, 1984.
- MULLET-POWELL, N., LACOSTE-ARMYNOT, A. M., VIÑAS, M., DE BUOCHBERG, M. S. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. **J. Food Protect.**, v. 61, n. 9, p. 1210-1212, 1998.
- MURIANA, P. M, KLAENHAMMER, T. R. Conjugal transfer of plasmid encode determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 553-560, 1987.

- MURIANA, P. M, KLAENHAMMER, T. R. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 114-121, 1991.
- NETTLES, C. G., BAREFOOT, S. F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. **J. Food Protect.**, v. 56, n. 4, p. 338-356, 1993.
- NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRURBERG, M. B., EIJSINK, V., HOLO, H. R. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 113-128, 1996.
- NIETO-LOZANO, J. C., NISSEN-MEYER, J., SLETTEN, K., PELÁEZ, C., NES, I. F. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, p. 1-6, 1992.
- NILSEN, T., NES, I. F., HOLO, H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. **J. Bacteriol.**, v. 180, n.7, p. 1848-1854, 1998.
- NISSEN-MEYER, J., HOLO, H., HAVARSTEIN, L. S., SLETTEN, K. NES, I. F. novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5626-5692, 1992.
- NIU, W.W., NEU, H. C. Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin and daptomycin. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 35, p. 998-1000, 1991.
- O'KEEFFE T., HILL, C. Bacteriocins potential in food preservation. <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/bacteriocins.doc> -1999.
- O'SULLIVAN, L. ROSS, R. P., HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, p. 593-604, 2002.
- PALACIOS, J., VIGNOLO, G., FARIAS, M. E., de RUIZ HOLGADO, A. P., OLIVER, G., SESMA F. Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. **Microbiol. Res.**, v. 154, p. 199-204, 1999.

- PARENTE, E., HILL, C. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 497-502, 1992.
- PARENTE, E., GIGLIO, M A., RICCIARDI, A., CLEMENTI, F. The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 40, p. 65-75, 1998.
- PIVA, A., HEADON, D. R. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. **Microbiology**, v. 140, p. 697-702, 1994.
- POL, I. E., MASTWIJK, H. C., BARTELS, P. V., SMID, E. J. Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 428-430, 2000.
- POSTMA, P. W., LENGELERM, J. W., JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 543-594, 1993.
- QUADRI, L. E. N., SAILERS, M., ROYS, K. L., VEDERAS, J. C., STILES, M. E. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. **J. Biol. Chemist.**, v.269, p. 12204-12211, 1994.
- QUADRI, L. E. N., SAILERS, M., ROYS, K. L., VEDERAS, J. C., STILES, M. E. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocin B2 e BM1. **J. Bacteriol.**, v.177, p. 1114-1151, 1995.
- ROGERS, L. A., WHITTIER, E. D. Limiting factors in lactic fermentation: past, present and future. **J. Bacteriol.**, v. 16, p. 211-229, 1928.
- ROSS, R. P., GALVIN, M., McAULIFFE, O., MORGAN S. M. et al. Developing applications for lactococcal bacteriocins. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 185-198, 1999.
- ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 79, p. 3-16, 2002.
- RYAN, M. P., REA, M. C., HILL, C., ROSS, R. P. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel

- broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. **Appl. Environ. Microbiol.**, v, 45, p. 612-619, 1996.
- RYAN, M. P., FLYIN, J., HILL, C., ROSS, R. P., MCANCY, W. J. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 2625-2631, 1999.
- SAHL, H. G., BIERBAUM, G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. **Annual Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 41-49, 1998.
- SCHILLINGER, U., LÜCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1901-1906, 1989.
- SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol**, v. 7, p. 158-164, 1996.
- SCHLYTER, J. H., GLASS, K. A., LOEFFELHOLZ, J., DEGNAN, A. J., LUCHANSKY, J. B. The effects of diacetate with nitrite, lactate or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 19, p. 271-281, 1993.
- SIEGERS, K., ENTIAN, K. D. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1082-1089, 1995.
- SIRAGUSA, G. R., CUTTER, C. N., WILLETT, J. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. **Food Microbiol.**, v. 16, p. 229-235, 1999.
- STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 36, p. 1-29, 1997.
- SUDIRMAN, I., MATHIEU, F., BENOIT, V., LEFEBVRE, G. Properties of two bacteriocins synthesized by *Leuconostoc* strains. **Current Microbiol.**, v. 28, p. 155-159, 1994.

- SZABO, E. A., CAHILL, M. E. The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 43, p. 21-231, 1998.
- TALARICO, T. I., DOBROGOSZ, W. J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 33, p. 674-679, 1989.
- TANNOCK, G. W. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 270-274, 1997.
- TICHACZEK, P. S., VOGEL, R. F., HAMMES, W. P. Cloning and sequencing of sak P encoding, sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. **Microbiology**, v. 140, p. 361-367, 1994.
- TYÖPPÖNEN, S., PETÄJÄ, E., MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 83, n. 3, p. 233-244, 2002.
- UPRETI, G. C. Lactocin 27, a bacteriocin produced by homofermentative *Lactobacillus helveticus* strain LP27. In: De VUYST, L., VANDAMME, E. J. (Ed). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application**, London: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 151-221.
- VENEMA, K., CHIKINDAS, M. L., SEEGER, J. F. M. L., HAANDRIKMAN, A. J., LEENHOUTS, K. J., VENEMA, G., KOK, J. Paid and efficient purification methods for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 305-309, 1997.
- VERHEUL, A., RUSSELL, N. J., VAN'T HOF, R., ROMBOUTS, F. M., ABEE, T. Modification of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3451-3457, 1997.
- WHITEHEAD, H. R. A substance inhibiting bacterial growth produced by certain strains of lactic streptococci. **Biochem. Journal**, v. 59, p. 1793-1800, 1933.
- WOROBO, R. W., VANBELKUM, M. J., SAILER, M., ROY, K. L., VEDERAS, J. C., STILES, M. E. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 3143-3149, 1995.

YANG, R. JONHSON, M. C., KAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3355-3359, 1992.

ZAPICO, P., MEDINA, M., GAYA, P., NUÑEZ, M. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 40, p. 35-42, 1998.

## **CAPÍTULO 2**

**Seleção de cultura láctica bacteriocinogênica isolada de salame tipo italiano**

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico são usadas na fermentação da carne com o objetivo de melhorar a estabilidade e segurança do produto, além de permitir a diversificação de produtos com novas propriedades sensoriais (LUCKE, 2000).

As principais espécies de bactérias do ácido láctico utilizadas como culturas *starter* na fermentação da carne são *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici* (TYÖPPÖNEN et al., 2002). Muitas indústrias de carnes não usam culturas *starter* e o processo de fermentação é realizado pelo método artesanal, onde a fermentação é feita pela microbiota natural da carne (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

A ação biopreservativa das bactérias lácticas *starter* em alimentos é atribuída à ação combinada de metabólitos antimicrobianos produzidos durante a fermentação (CAPLICE e FITZGERALD, 1999; ROSS et al., 2002). Esses incluem os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (STILES, 1996; CAPLICE e FITZGERALD, 1999; O'SULLIVAN et al., 2002; ROSS et al., 2002). Os ácidos orgânicos exercem efeito antimicrobiano por interferir com o potencial de membrana inibindo o transporte ativo, reduzindo o pH intracelular e inibindo uma variedade de funções metabólicas (CLIVER e MARTH, 1990, CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Além disto, têm amplo modo de ação e inibem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos filamentosos e leveduras (ROSS et al., 2002). O peróxido de hidrogênio possui forte efeito oxidativo sobre lipídeos da membrana e proteínas celulares (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Em embutidos fermentados, a formação de peróxido de hidrogênio não é conveniente, pois este pode causar alterações indesejáveis como a descoloração do pigmento da carne curada e a oxidação de ácidos graxos insaturados (LUCKE, 1985).

Algumas bactérias do ácido láctico produzem bacteriocinas que são peptídeos ou proteínas extracelulares capazes de formar poros na membrana de

bactérias Gram-positivas causando liberação de material intracelular (TAGG et al., 1976). A capacidade para produzir bacteriocinas é comum entre microrganismos isolados de alimentos fermentados e esta propriedade tem sido considerada benéfica e segura (CLEVELAND et al., 2001). Entretanto nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, é a única bacteriocina considerada GRAS (Generally Recognized As Safe) para uso específico em alimentos e é usada como aditivo alimentar em pelo menos 50 países (AYMERICH et al., 1998; CLEVELAND et al., 2001). No Brasil, nisina pode ser adicionada a determinados queijos pasteurizados na concentração de 12,5 mg/Kg (Portaria DETEN/MS nº 29 - 22/01/1996). Mas o uso de nisina em carnes não tem tido muito sucesso devido à sua baixa solubilidade, distribuição desigual e falta de estabilidade (AYMERICH et al., 1998).

Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico apresentam potencial para uso como conservante em alimentos. Porém, a regulamentação de aditivos alimentares não facilita a introdução de novas bacteriocinas para aplicação em alimentos e, portanto, uma alternativa à introdução da bacteriocina purificada em alimentos é o uso de bactérias lácticas bacteriocinogênicas, as quais produzam bacteriocinas *in situ* (SCHILLINGER et al., 1996; AYMERICH et al., 1998, HANSEN, 2002). Neste caso, linhagens de bactérias lácticas bacteriocinogênicas podem melhorar a competitividade da cultura *starter* ou servir como cultura protetora, para garantir a segurança do produto (HAMMES e HERTEL, 1998).

A carne e os produtos cárneos são ambientes favoráveis para o crescimento de patógenos e microrganismos deterioradores. Salame fermentado é feito pela mistura de carne de boi, carne de porco e gordura de porco, com a adição de açúcar, nitrato e nitrito de sódio, cloreto de sódio, ascorbato e condimentos. O crescimento de vários microrganismos é inibido por nitrito, baixo potencial de oxigênio, pH e atividade de água. Entretanto, todas estas barreiras presentes no salame fermentado não são suficientes para prevenir o crescimento de *Listeria monocytogenes* (TYÖPPÖNEN et al., 2002). Produtos cárneos fermentados têm sido encontrados contaminados com *L. monocytogenes*

(STILES, 1996) e *Staphylococcus aureus* (SMITH et al., 1983) e podem servir como veículos de transmissão destas bactérias.

Algumas bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico, como nisina, são efetivas contra muitos microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos. Portanto, o uso de bacteriocinas como conservante natural de alimentos tem motivado o estudo de um grande número dessas proteínas inibidoras, onde muitas têm potencial para essa aplicação em alimentos (O'SULLIVAN et al., 2002). O isolamento e seleção de bactérias lácticas bacteriocinogênicas, as quais podem ser usadas como cultura *starter* na fermentação da carne, constituem um desafio para a padronização e o uso destas para qualidade do salame. As culturas lácticas dominantes durante a fermentação da carne são mais bem adaptadas à ecologia da fermentação (HUGAS e MONFORT, 1997). Portanto, existe a necessidade de selecionar bactérias do ácido láctico da microbiota indígena do produto fermentado com base em critérios tecnológicos importantes visando obter linhagens que são bem adaptadas às condições de fermentação e que possam dominar a microbiota do produto cárneo durante a fermentação (PAPAMANOLI et al., 2003).

Em estudos anteriores foram isoladas bactérias lácticas durante as fases de fermentação e maturação de salame tipo italiano processado naturalmente em diferentes meios de cultivo (MACIEL, 1998) e uma caracterização parcial dessa coleção indicou que alguns isolados são possíveis produtores de bacteriocina com atividade sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus* (De PAULA, 2000).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar essa coleção de bactérias do ácido láctico isoladas de salame tipo italiano processado por fermentação natural avaliando o critério tecnológico de inibição de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, e selecionar um dos isolados para uso como cultura *starter* ou protetora, bem como identificá-lo. Outros critérios também foram avaliados, como o espectro de inibição, a estabilidade ao tratamento térmico e ao pH e a velocidade de crescimento dos isolados lácticos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos

Os isolados lácticos utilizados, identificados e não identificados, foram isolados de salame tipo italiano processado por fermentação natural e caracterizados por MACIEL (1998). Foram selecionados seis isolados que apresentaram atividade de inibição sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus*, e que foram considerados possíveis produtores de bacteriocina (De PAULA, 2000).

Os isolados lácticos foram cultivados em seus respectivos meios de isolamento: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ID 8.5, os isolados ID 1.5, ID 3.1, PD 4.7 e PD 6.9 em meio D-MRS (HAMMES et al., 1992) e *Lactobacillus mali* PR 3.1 em meio MRS (De MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960). As culturas foram congeladas em nitrogênio líquido em seus respectivos meios com 20% de glicerol e mantidas a -80 °C. No início de cada experimento, as culturas lácticas foram ativadas em caldos MRS ou D-MRS, e incubadas a 30 °C por 24 horas.

As culturas de microrganismos indicadores utilizados neste estudo estão listadas na Tabela 1. Elas foram estocadas em a -80 °C e ativadas nos respectivos meios por 18 horas, antes de cada experimento.

### 2.2. Preparo do sobrenadante neutralizado (SN) dos isolados lácticos

Para obtenção do SN livre de células, *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* ID 8.5 e os isolados ID 1.5, ID 3.1, PD 4.7 e PD 6.9, em meio D-MRS, e *L. mali* PR3.1 em meio MRS, foram cultivados em volumes de 10 mL e incubados a 30 °C durante 24 horas. Após crescimento, as culturas foram submetidas à centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 5 °C e os sobrenadantes foram coletados e neutralizados para pH 6,5 com NaOH 5 M (pH meter

accumet<sup>®</sup> modelo 15) e filtrados em membrana Millipore 0,20 µm. O SN foi conservado a -20 °C para análises posteriores.

**Tabela 1.** Microrganismos indicadores usados neste estudo, seus respectivos meios de cultivo e a temperatura de crescimento.

<b>Microrganismos</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRS	37
<i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33620	MRS	37
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 705	MRS	30
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393	MRS	37
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20	MRS	37
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	MRS	37
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> ATCC 9649	MRS	37
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 12315	MRS	37
<i>Lactobacillus gasserii</i> ATCC 33323	MRS	37
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	MRS	37
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 691	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	M17	30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (coleção do laboratório)	M17	30
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	Meio basal	30
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (coleção do laboratório)	MRS	30
<i>Streptococcus thermophilus</i> NCDO1968	TSB	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	Meio basal	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Meio basal	37
<i>Staphylococcus carnosus</i> (coleção do laboratório)	Meio basal	37
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 4904	CN	37
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	CN	37
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	CN	37
<i>Bacillus stercorophilus</i> ATCC 12980	CN	55
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6041	CN	37
<i>Listeria innocua</i> CERELA	Meio basal	37
<i>Listeria sw</i> CERELA	Meio basal	37
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Meio basal	37
<i>Listeria monocytogenes</i> CERELA	Meio basal	37
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A CERELA	Meio basal	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 173/94 (coleção do laboratório)	Meio basal	37

**MRS** (Man, Rogosa e Sharpe, 1960); **M17** (triptona 2,5 g/L, peptona de carne 2,5 g/L, peptona de soja 5 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L, extrato de carne 5 g/L, glicerofosfato de sódio 1,9 g/L, ácido ascórbico 0,5 g/L, lactose 0,5 g/L, glicose 10 g/L); **TSB** (Tryptic Soy Broth-Oxoid); **Meio basal** (peptona 10 g/L, glicose 10 g/L, NaCl 5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L, extrato de carne 8 g/L, extrato de levedura 4 g/L); **CN** (extrato de carne 1 g/L, extrato de levedura 2 g/L, peptona 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L).

### **2.3. Preparo do extrato protéico bruto (EB)**

Os extratos protéicos brutos foram obtidos utilizando 250 mL de cada sobrenadante dos 6 isolados lácticos após 24 horas de cultivo. O sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (Sigma) 60% por 2 horas em gelo. Após o fracionamento, o sobrenadante foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 5 °C, o sedimento foi ressuspenso em 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,4 e submetido à diálise. Para diálise utilizou-se membrana com ponto de corte de 1.000 Daltons e a diálise ocorreu contra 2 L do mesmo tampão a 4 °C por 24 horas, com troca de tampão a cada 8 horas. Após diálise, o dialisado foi filtrado em membrana Millipore de 0,20 µm e o EB resultante foi estocado a -20 °C para análises posteriores.

### **2.4. Determinação da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes neutralizados (SN) e dos extratos protéicos brutos (EB)**

A atividade de inibição do SN e do EB de cada isolado láctico sobre os microrganismos indicadores foi avaliada pelo método de difusão em ágar com algumas modificações (TAGG et al., 1976), onde 30 µL do SN e do EB foram adicionados em orifícios (5 mm) feitos em placas contendo 20 mL de meio de cultura sólido inoculado com aproximadamente  $10^5$  células/mL de cada microrganismo indicador (Tabela 1). As placas foram mantidas a 4 °C por 12 horas para difusão e posteriormente incubadas em condições ótimas para o crescimento do microrganismo indicador. Após 24 horas de incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido e apresentado como à medida do diâmetro externo do halo de inibição subtraído do diâmetro do orifício.

## **2.5. Caracterização da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes neutralizados (SN) dos isolados lácticos**

Para eliminar o efeito de peróxido de hidrogênio, o SN dos isolados lácticos foi tratado com Catalase C40 (Sigma) na concentração final de 1 mg/mL e incubado por 1 hora a 37 °C. Após este período de incubação, as enzimas proteolíticas, Proteinase K, Protease (Dispase) de *Bacillus polymyxa*, Papaína e Tripsina (todas Sigma) foram adicionadas na concentração final de 5 mg/mL com o objetivo de determinar se a natureza da substância inibidora era protéica. Após 2 horas de incubação a 37 °C, os sobrenadantes foram submetidos ao teste de inibição.

Para verificar a estabilidade ao calor do composto inibidor, alíquotas do SN foram submetidas à temperatura de 90 °C por 40 minutos e a atividade de inibição foi verificada.

O efeito do pH sobre a atividade do composto inibidor foi avaliado ajustando os sobrenadantes das culturas lácticas para valores de pH que variaram de 2 a 10 e as amostras foram incubadas a 4 °C por 24 horas. Alíquotas do meio estéril com o pH ajustado para esses valores foram usadas como controle. Após cada tratamento, amostras e controles foram submetidos ao teste de inibição.

A atividade de inibição foi avaliada pelo método de difusão em ágar, como descrito no item 2.4, utilizando *Micrococcus luteus* ATCC 10240 como microrganismo indicador. A bactéria *M. luteus* foi escolhida por ser aquela que apresentou maior sensibilidade ao composto inibidor produzido pelas bactérias lácticas.

## **2.6. Viabilidade e crescimento de microrganismos indicadores em meio líquido adicionado dos sobrenadante neutralizados (SN) e dos extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos**

O efeito dos SN e dos EB dos isolados lácticos sobre a viabilidade de *M. luteus* ATCC 10240, *S.aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes* CERELA foi avaliado. A bactéria *M. luteus* foi escolhida devido grande sensibilidade aos compostos inibidores produzidos pelos isolados lácticos. As culturas de *S.aureus* e *L. monocytogenes* foram escolhidas porque são as bactérias de interesse neste estudo. Os microrganismos indicadores foram cultivados em meio basal e em suas respectivas temperaturas de crescimento durante 18 horas. Após este período, 100 µL de cada cultura ativa foram inoculados em 5 mL de meio de cultivo contendo 100 µL do SN ou do EB de cada isolado láctico. As culturas foram incubadas e leituras de DO<sub>630</sub> nm foram realizadas em intervalos de tempos determinados durante 10 horas de cultivo, tempo necessário para as células alcançarem a fase estacionária.

## **2.7. Curva de crescimento dos isolados lácticos e determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ )**

Curvas de crescimento dos isolados lácticos foram construídas com o objetivo de calcular a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), a qual é também um parâmetro importante na seleção de uma cultura láctica bacteriocinogênica.

Tubos contendo 5 mL de meio de cultura foram adicionados com um inóculo de 2% (v/v) das culturas lácticas, correspondendo à concentração de aproximadamente  $10^4$  UFC/mL. Estes foram incubados a 30 °C e a leitura da densidade óptica foi monitorada a 630 nm (Spectronic 20, Milton Roy) durante o desenvolvimento das culturas. Os dados obtidos foram usados para construção da curva de crescimento e a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi calculada, onde  $\mu$  foi determinada usando a equação:  $\mu = (\ln X - \ln X_0)/(t - t_0)$ .

## **2.8. Análise por microscopia eletrônica de varredura**

As células do isolado PD 6.9 foram cultivadas em 10 mL de meio D-MRS a 30°C por 10 horas foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 5 °C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7 e submetidas novamente à centrifugação. Este processo de lavagem foi realizado por 2 vezes e o concentrado de células foi ressuspensado em 5 mL do mesmo tampão e filtrado em membrana Millipore 0,22 µm. A membrana foi cortada em pedaços de aproximadamente 1 cm x 1 cm e as células foram fixadas por 16 horas em glutaraldeído 2,5% preparado em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7. O material fixado foi lavado 6 vezes neste mesmo tampão por 10 minutos. A seguir, a desidratação foi realizada submetendo a membrana a uma série de concentrações de etanol da seguinte forma: 30%/10 minutos, 50%/10 minutos, 70%/10 minutos, 80%/10 minutos, 90%/10 minutos, 100%/15 minutos por 2 vezes. A membrana foi seca utilizando o método de secagem em ponto crítico em CO<sub>2</sub> líquido por um período determinado, para retirada de qualquer vestígio de umidade remanescente. Em seguida, a membrana foi colocada em suporte apropriado, coberta com ouro (metalização) e a preparação foi examinada em microscópio eletrônico de varredura modelo Leo 1430 VP e fotografada com aumento de 5.000X.

## **2.9. Identificação do isolado PD 6.9**

A identificação do isolado bacteriocinogênico selecionado foi realizada pela análise da seqüência do gene codificador da região rRNA 16S e pela análise do perfil de fermentação de açúcares pelo kit API 50 CH (Biomérieux – França).

### 2.9.1. Técnica de amplificação de gene codificador da região rRNA 16S

O gene codificador do rRNA 16S foi amplificado por PCR segundo metodologia descrita por UETANABARO (1999). O molde usado na amplificação foi o DNA total extraído das células de PD 6.9 pelo método descrito em MORAES (1995) e os *primers* foram os mesmos usados por UETANABRO (1999). Os primers utilizados são específicos para as regiões conservadas correspondentes às extremidades de rDNA de eubactérias (WEISBURG et al., 1991) e foram obtidos de GIBCO-BRL. Suas seqüências de nucleotídeos são:

FD: CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

MD: CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

A reação de amplificação foi conduzida em termociclador Perkin Elmer em uma mistura de reação contendo aproximadamente 50 ng de DNA total como molde, 40 pmoles de cada *primer*, 25 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 2,5 µL do tampão da enzima Taq DNA polimerase (10X), MgCl<sub>2</sub> (25 mM) e 1U da enzima Taq DNA polimerase (Promega). O termociclador foi programado para 25 ciclos de 95 °C/2 minutos, 58 °C/50 segundos e 72 °C/2 minutos e um ciclo final de 95 °C/2 minutos, 58 °C/50 segundos e 72 °C/5 minutos. O produto da reação foi precipitado com 2,5 volumes de etanol, em seguida foi centrifugado a 12.000 g por 20 minutos e ressuspenso em água desionizada.

O fragmento de DNA amplificado foi clonado em vetor TOPO (Introgen). A reação de ligação foi feita segundo instruções do fabricante do vetor e mantida por 6 horas em temperatura ambiente. A transformação foi feita adicionando todo produto da reação de ligação (6 µL) em 200 µL de células de *E. coli* DH 5α competentes (INOUE et al., 1990) e incubadas em gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 segundos, colocadas novamente em gelo e foram adicionados 800 µL de SOC (meio SOB acrescido de glicose 1M) pré-aquecido a 37 °C. As células foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação a 150 rpm. Em seguida, toda a

suspensão de células foi plaqueada em ágar LB contendo ampicilina (50 µg/mL), IPTG (0,2 mM/mL) e X-Gal (0,08 mg/mL) e as placas incubadas a 37 °C. Os clones obtidos foram submetidos à lise rápida (extração de plasmídeos diretamente da colônia) para confirmação do inserto de DNA no vetor TOPO. A lise rápida foi feita colocando uma pequena quantidade de colônia em eppendorfs estéreis, em seguida foram adicionadas 40 µL de solução de lise (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaOH 100 mM e SDS 1%) e estes foram deixados em temperatura ambiente por 15 minutos. Após, foram adicionados 3 µL de HCl 1N e 5 µL de azul de bromofenol e os eppendorfs foram colocados a -80 °C por 20 minutos. Em seguida, foram submetidos à centrifugação de 10.000 g por 5 minutos e todo o sobrenadante foi aplicado em gel de agarose 0,8%.

A extração do vetor TOPO recombinante foi realizado com o kit Wizard<sup>TM</sup> Minipreps DNA “Purification System” (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado no Núcleo de Análise Genômica (NAGE) da Universidade Federal de Minas Gerais. O seqüenciador utilizado foi MegaBACE 1000 (Amershan/Pharmacia) com o kit Dyanamic ET terminator. A seqüência gerada foi alinhada e comparada, utilizando-se o serviço BLAST da NCBI (“National Center of Biotechnology Information”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast/cgi>).

### **2.9.2. Perfil de fermentação de açúcares**

A cultura do isolado PD 6.9 foi ativada 3 vezes em caldo D-MRS, sendo a última ativação feita em volume de 50 mL, e incubada a 30 °C por 18 horas. A cultura foi centrifugada a 3.000 g por 15 minutos a 5 °C e o sobrenadante descartado. O concentrado de células foi ressuspendido em 5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7, para lavagem das células e submetido a uma nova centrifugação nas mesmas condições já descritas. Em seguida, o sobrenadante foi

descartado e o concentrado foi ressuspensionado em 2 mL do mesmo tampão, e utilizado como inóculo.

A padronização do inóculo foi feita adicionando-se gotas do inóculo em 5 mL de água destilada, até obter uma  $DO_{600} = 0,7 \pm 0,2$  em espectrofotômetro (Spectronic 20D, Milton Roy). O dobro da quantidade de gotas do inóculo utilizadas na água destilada foi adicionado em 10 mL de meio CHL (meio MRS sem adição de extrato de carne e glicose, adicionado de púrpura de bromocresol, adquirido junto com o kit API CH 50).

A suspensão bacteriana em meio CHL foi distribuída nas 50 cúpulas da bandeja do kit API com auxílio de micropipeta e, posteriormente, cada cúpula foi recoberta com óleo mineral para fornecer condições de anaerobiose e, incubada a 30 °C. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas foi feita a leitura e o resultado positivo foi atribuído à mudança de cor provocada pela reação de redução da púrpura de bromocresol do meio para cada carboidrato. A identificação foi realizada utilizando-se o APILAB.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Atividade de inibição dos sobrenadante neutralizados (SN) e dos extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos

A atividade antimicrobiana dos isolados lácticos foi testada sobre diferentes microrganismos indicadores. A Tabela 1 mostra o espectro de inibição dos SN e dos EB dos 6 isolados lácticos.

Os sobrenadantes neutralizados dos isolados ID 1.5, ID 3.1 e ID 8.5 não apresentaram atividade de inibição sobre as bactérias lácticas indicadoras, com exceção de *Lb. casei* subsp. *casei* ATCC393, *Lb. delbrueckii* UFV H2B20 e *M. luteus* ATCC 10240. O crescimento da maioria das bactérias lácticas usadas como indicadoras foi inibido pelo EB dos 6 isolados lácticos. *Lactococcus lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* foram resistentes aos SN e aos EB de todos os isolados lácticos. Por outro lado, *M. luteus* apresentou grande sensibilidade aos SN e aos EB de todos os 6 isolados lácticos testados.

A linhagem de *Staphylococcus carnosus* foi inibida pelo EB de todos os isolados lácticos, mas apenas os SN dos isolados PD 4.7 e PD 6.9 apresentaram atividade de inibição. O EB do isolado PD 6.9 foi o único que apresentou atividade de inibição contra *S. aureus*, uma bactéria patogênica que está freqüentemente associada com contaminação alimentar.

O SN e o EB de todos os 6 isolados lácticos foram capazes de inibir diferentes espécies de *Bacillus*. *B. subtilis* foi o único que não foi inibido por nenhum dos isolados lácticos, enquanto *B. coagulans* foi inibido tanto pelo SN quanto pelo EB de todos os isolados lácticos. O EB de todos os isolados lácticos inibiu o crescimento de *B. cereus*, mas apenas o SN do isolado PD 6.9 inibiu o seu crescimento. Entretanto, *B. licheniformis* foi inibido pelo SN e pelo EB dos isolados PD 4.7 e PD 6.9 e apenas pelo EB dos demais isolados.

**Tabela 1.** Halos de inibição (mm) produzidos pelos sobrenadantes neutralizados (SN) e pelos extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos sobre diferentes microrganismos indicadores.

Microrganismos Indicadores	Isolados lácticos											
	ID 1.5		ID 3.1		ID 8.5		PR 3.1		PD 4.7		PD 6.9	
	SN	EB	SN	EB	SN	EB	SN	EB	SN	EB	SN	EB
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	-	3	-	8	-	3	-	-	-	5	2	13
<i>Lb. amylovorus</i> ATCC 33620	-	18	-	22	-	18	5	14	2	19	8	27
<i>Lb. casei</i> CRL 705	-	10	-	15	-	10	2	7	2	11	10	19
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC393	-	21	3	25	3	21	11	18	10	18	19	30
<i>Lb. delbrueckii</i> . UFV H2B20	6	19	6	21	4	19	12	17	10	24	19	28
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	-	9	-	13	-	8	-	6	-	11	2	20
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> ATCC 9649	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	14
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> ATCC 12315	-	2	-	8	-	2	-	-	-	4	-	13
<i>Lb. gasseri</i> ATCC 33323	-	10	-	9	-	8	8	15	4	10	4	10
<i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009	-	10	-	12	-	9	-	7	-	16	5	20
<i>Lb. plantarum</i> CRL 691	-	10	-	15	-	10	2	7	2	13	10	19
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (coleção do lab.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	15	21	16	24	14	22	17	22	16	23	20	26
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (coleção do lab.)	-	7	-	12	-	7	-	2	-	8	-	11
<i>Streptococcus thermophilus</i> NCDO 1968	-	-	-	7	-	-	-	3	-	3	-	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
<i>S. carnosus</i> (coleção do lab.)	-	14	-	17	-	13	-	12	6	15	11	16

-: Nenhum halo formado

Continua....

**Tabela 1, Cont.**

Microrganismos Indicadores	Isolados lácticos											
	ID 1.5		ID 3.1		ID 8.5		PR 3.1		PD 4.7		PD 6.9	
	SN	EB	SN	EB	SN	EB	SN	EB	SN	EB	SN	EB
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 4904	-	7	-	8	-	6	-	6	-	7	5	11
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	10	12	9	13	8	11	7	10	10	13	10	15
<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	-	10	-	13	-	8	-	7	3	11	7	15
<i>B. stercorophilus</i> ATCC 12980	4	11	3	15	3	10	6	10	5	11	12	20
<i>B. subtilis</i> ATCC 6041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> CERELA	-	7	-	10	-	6	-	-	-	7	8	12
<i>L. sw</i> CERELA	-	5	-	8	-	5	-	-	-	5	-	11
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> CERELA	-	9	-	11	-	10	-	6	-	11	7	12
<i>L. monocytogenes</i> Scott A CERELA	-	4	-	8	-	-	-	-	-	5	-	11
<i>L. monocytogenes</i> 173/94	-	10	-	13	-	9	-	7	-	11	10	15

-: Nenhum halo formado

Das 4 linhagens de *L. monocytogenes* testadas, 3 linhagens foram sensíveis ao SN e ao EB do isolado PD 6.9, *L. monocytogenes* CERELA, Scott A, e 173/94. Com relação aos demais isolados lácticos, apenas o EB foi capaz de inibir *L. monocytogenes*. O EB dos isolados lácticos inibiu outras espécies de *Listeria* incluindo *L. sw* e *L. innocua*, exceto o isolado PR 3.1. Além do EB do isolado PD 6.9 o SN também foi capaz de inibir *L. innocua*.

Todos os isolados lácticos possivelmente bacteriocinogênicos possuem um amplo espectro de inibição e foram ativos contra a maioria das bactérias do ácido láctico testadas, mas não inibiram as linhagens de *L. lactis* e *L. lactis subsp. cremoris*. Uma provável explicação pode ser devido à resistência dessas linhagens a algumas bacteriocinas. Em trabalhos realizados por AYMERICH et al. (1996) foi observada a resistência de *Lactococcus* a algumas bacteriocinas da classe IIa, como Sakacina A e P e Enterocina A.

Interessantemente, *B. cereus* um microrganismo que pode causar duas doenças de origem alimentar foi sensível ao SN e ao EB do isolado PD 6.9. O isolado PD 6.9 também foi o isolado que apresentou melhor inibição sobre *Listeria*, principalmente *L. monocytogenes*.

Uma vez que todos os isolados lácticos possivelmente bacteriocinogênicos estudados neste trabalho foram isolados de salame fermentado, espera-se que eles sejam altamente competitivos em sistema de carne e hábeis para produzirem bacteriocinas *in situ*, e conseqüentemente serem mais adequados para a segurança microbiológica desses alimentos do que microrganismos isolados de outros ambientes.

Portanto, analisando o efeito inibitório de todos os isolados lácticos, principalmente sobre patógenos de origem alimentar como *S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*, foi observado que o isolado PD 6.9 apresentou os melhores resultados de inibição. Um ponto negativo é que ele também inibiu algumas linhagens de bactérias lácticas geralmente usadas como *starter* em produtos cárneos como *L. casei*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* e *S. carnosus*. Vale ressaltar que este é um ponto importante que deve ser levado em consideração quando usa-se culturas *starter* contendo uma ou mais linhagens de bactérias lácticas. Um

estudo mais detalhado deve ser realizado utilizando o maior número possível de culturas *starter*.

Devido à alta sensibilidade de *M. luteus* ATCC 10240 ao composto inibidor de todos os 6 isolados lácticos testados, os demais testes para seleção de uma linhagem bacteriocinogênica foram realizados com esta bactéria.

### 3.2. Efeito de enzimas proteolíticas e de catalase sobre a atividade de inibição dos sobrenadantes neutralizados (SN) dos isolados lácticos

Para confirmar a natureza química da substância inibidora presente nos SN dos isolados lácticos, estes foram tratados com Catalase, para excluir o efeito de peróxido de hidrogênio, e com proteases, para evidenciar a natureza protéica. A substância inibidora manteve a atividade de inibição quando tratada com catalase, sugerindo que a inibição não foi devido ao peróxido de hidrogênio (Tabela 2).

**Tabela 2.** Halos de inibição (mm) produzidos pelos sobrenadantes neutralizados (SN) dos isolados lácticos adicionados de Catalase na concentração final de 1 mg/mL e de diferentes enzimas proteolíticas na concentração final de 5 mg/mL sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

Isolados lácticos	Controle (SN)	SN + C	SN + C + Pk	SN+ C + Pap	SN+ C + Pro	SN+ C + Tri
ID 1.5	18	18	-	12	-	14
ID 3.1	19	19	10	16	12	17
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ID 8.5	16	16	-	13	2	12
<i>L. mali</i> PR 3.1	19	19	-	15	7	14
PD 4.7	19	19	-	15	7	15
PD 6.9	22	22	-	20	14	20

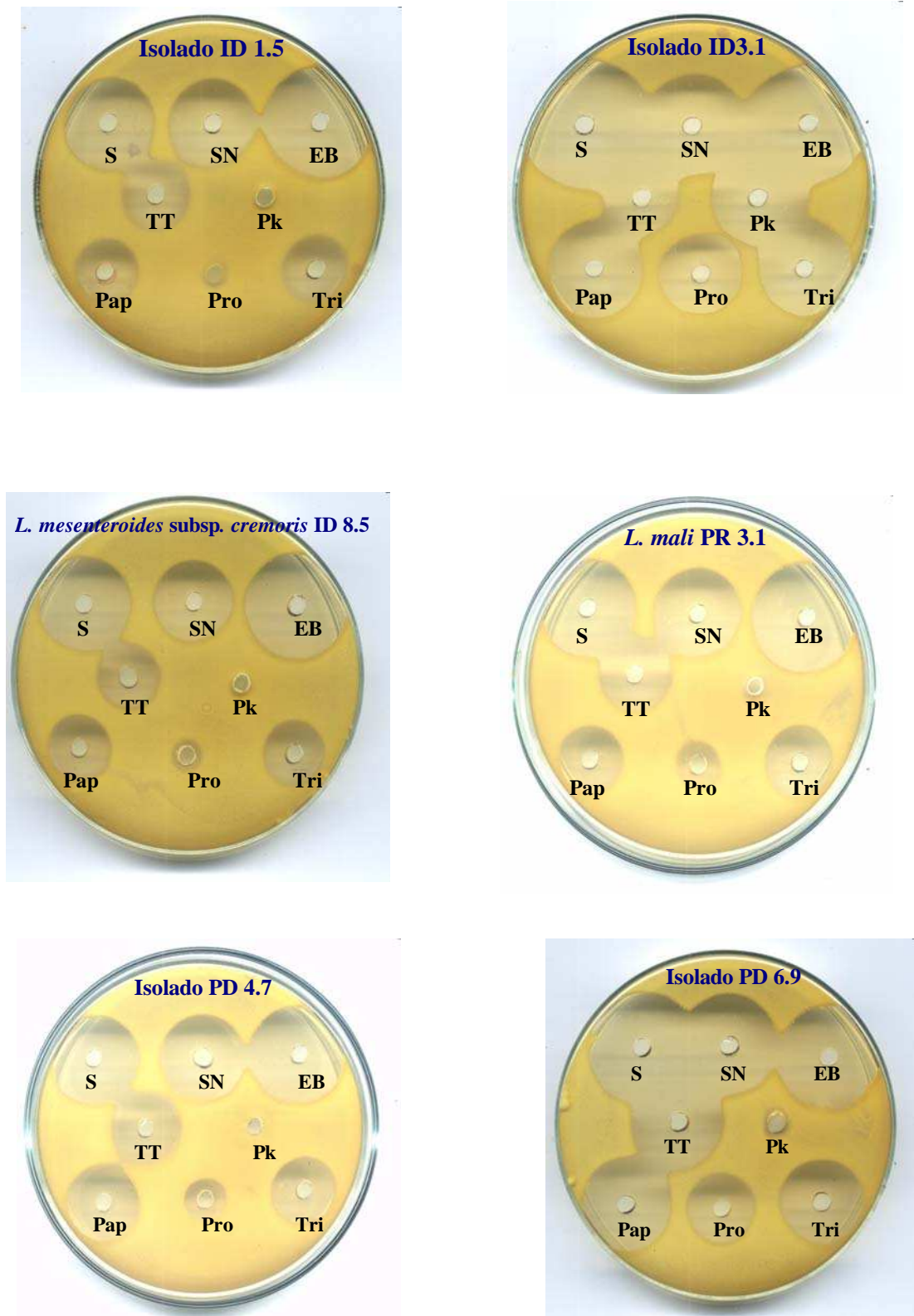
-: Nenhum halo formado

C - Catalase; Pk - Proteinase K; Pap - Papaína; Pro - Protease; Tri - Tripsina

A sensibilidade da substância inibidora quando submetida ao tratamento com várias enzimas proteolíticas está ilustrada na Tabela 2 e Figura 1. Todas as substâncias inibidoras foram inativadas pela enzima Proteinase K, exceto a substância produzida pelo isolado ID 3.1. As enzimas Papaína e Tripsina foram as enzimas que tiveram menos efeito sobre a atividade de inibição dos SN dos isolados lácticos. A enzima Protease de *Bacillus polimyxa* aboliu completamente a atividade de inibição do isolado ID 1.5, e apresentou uma redução considerável da atividade de inibição da substância inibidora de *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* ID8.5, *L. mali* PR 3.1 e do isolado PD 4.7. A substância inibidora produzida pelo isolado ID 3.1 não foi abolida por nenhuma das enzimas proteolíticas testadas

A sensibilidade a proteinases das substâncias inibidoras produzidas pelos isolados lácticos demonstra a sua natureza protéica, a qual é uma característica geral de bacteriocina, com exceção do isolado ID 3.1. Uma possível explicação para a insensibilidade da bacteriocina do isolado ID 3.1 pode ser por tratar-se de uma bacteriocina diferente das demais, onde o domínio ativo dessa substância inibidora não foi afetado por nenhuma dessas enzimas utilizadas. Este efeito também foi observado por LEWUS et al. (1991) quando estudavam sensibilidade dos compostos inibidores presentes no sobrenadante de várias bactérias lácticas a diferentes enzimas proteolíticas.

Comparando o comportamento de sensibilidade às enzimas proteolíticas dos isolados lácticos, pode-se perceber que o isolado ID 1.5 e *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* ID 8.5 apresentaram um padrão bastante semelhante, e o mesmo foi observado para *L. mali* PR 31 e o isolado PD4.7. As enzimas Papaína, Protease e Tripsina apresentaram redução do halo de inibição na maioria das bactérias lácticas. LIU e HANSEN (1990) observaram que a clivagem da nisina em dois fragmentos resultou na redução da atividade em 10 vezes, mas não ocorreu a inativação completa da atividade inibitória.



**Figura 1.** Atividade de inibição dos isolados lácticos sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240. Sobrenadante (S), Sobrenadante neutralizado (SN), Extrato protéico bruto (EB), SN submetido ao tratamento de 98 °C/40 min (TT), SN tratados com: Proteinase K (Pk), Papaína (Pap), Protease (Pro) e Tripsina (Tri).

### 3.3. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de inibição dos sobrenadantes neutralizados (SN) dos isolados lácticos

Os SNs de todos os isolados lácticos foram submetidos ao tratamento térmico de 98 °C por 40 minutos (Figura 1). Os resultados mostraram que as substâncias inibidoras presentes em todos os SN dos isolados lácticos foram resistentes ao calor (Tabela 3). A resistência ao calor é mais uma característica comum de bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico, tais como Enterocina 1071A e 1071B (BALLA et al., 2000), Lactococina MMFII (FERCHICHI et al., 2001), Bovicina HC5 (MANTOVANI et al., 2002), Divergicina M35 (TAHIRI et al., 2004), entre outras. Algumas bacteriocinas de bactérias do ácido láctico são instáveis ao calor e este fato foi observado por vários autores (LEE e PAIK, 2001; MESSI et al., 2001; LASH et al., 2005).

**Tabela 3.** Halos de inibição (mm) produzidos pelos sobrenadante neutralizados (SN) dos isolados lácticos submetidos a 98 °C por 40 minutos sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

Isolados lácticos	Controle (SN)	SN + tratamento térmico
ID 1.5	18	14
ID 3.1	19	15
<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i> ID 8.5	16	12
<i>L. mali</i> PR 3.1	19	16
PD 4.7	19	16
PD 6.9	22	21

### 3.4. Efeito do pH sobre a atividade de inibição dos sobrenadantes dos isolados lácticos

A atividade inibitória presente nos sobrenadantes dos isolados lácticos foi mantida em ampla faixa de pH, que variou de 2 a 10 (Tabela 4). Estes resultados sugerem que as substâncias inibidoras produzidas pelos isolados

láticos retêm atividade em ampla faixa de pH. Isso indica que as substâncias inibidoras presentes nos sobrenadantes das bactérias lácticas podem ser úteis em alimentos ácidos e não ácidos.

As condições de pH do meio podem comprometer a atividade das bacteriocinas. Muitas bacteriocinas possuem maior atividade inibitória em condições de baixo pH. Valores de pH baixos podem afetar a estabilidade do peptídeo, a liberação da bacteriocina da superfície da célula, as modificações pós-traducional ou a atividade na membrana (LIU E HANSEN, 1990; BISWAS et al., 1991). GEORGALAKI et al. (2002) verificaram que Mucedocina, um lantibiótico produzido por *Streptococcus macedonicus*, é estável em ampla faixa de pH, mas resultados diferentes foram encontrados por LASH et al. (2005) os quais verificaram que em valores de pH menores que 4,0 e maiores que 5,0, a bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, perdeu totalmente a atividade inibitória.

**Tabela 4.** Halos de inibição (mm) produzidos pelos sobrenadantes dos isolados lácticos ajustados para valores de pH de 2 a 10 sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

Valores de pH	Controle (meios)	Isolados lácticos					
		ID 1.5	ID 3.1	ID 8.5	PR 3.1	PD 4.7	PD 6.9
2	-	21	22	23	24	23	22
3	-	21	22	23	24	22	22
4	-	21	22	23	24	22	22
5	-	21	22	23	24	22	22
6	-	21	23	22	23	21	22
7	-	20	22	22	22	21	21
8	-	20	21	22	22	21	20
9	-	20	21	21	22	21	20
10	-	20	20	21	21	20	19

-: Nenhum halo formado

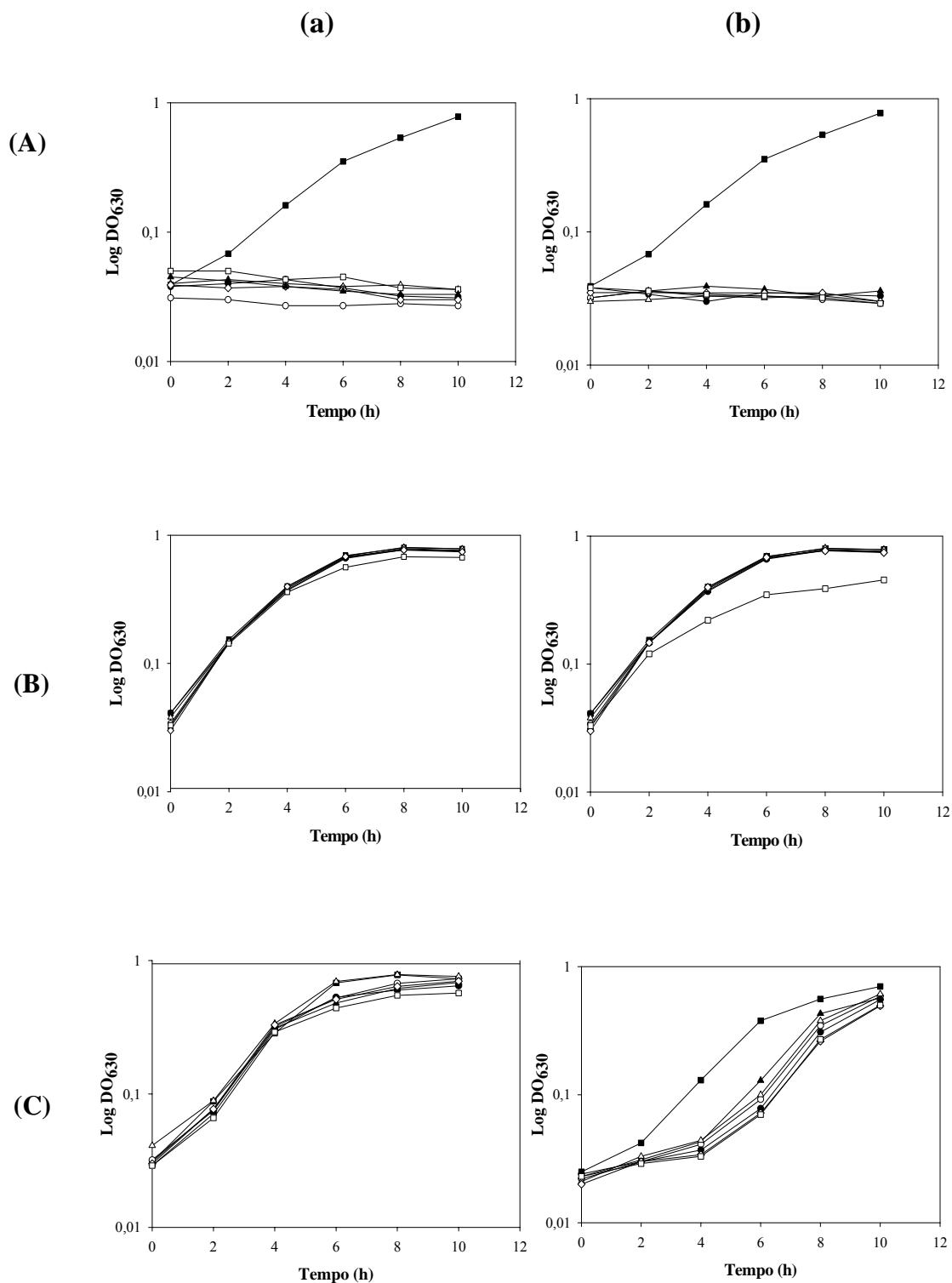
### **3.5. Viabilidade e crescimento de microrganismos indicadores em meio líquido adicionado dos sobrenadantes neutralizados (SN) e dos extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos**

O efeito do SN e do EB dos 6 isolados lácticos sobre a viabilidade de *M. luteus* ATCC 10240, *S. aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes* CERELA está mostrado na Figura 2.

O crescimento de *M. luteus* foi completamente inibido durante 10 horas de crescimento pelo SN e pelo EB de todos os isolados lácticos (Figura 2A). Estes resultados confirmam a alta sensibilidade deste microrganismo à substância inibidora, presente nos sobrenadantes dos isolados lácticos verificada no método de difusão em ágar (Tabela 1).

Por outro lado, apenas o SN e o EB do isolado PD 6.9 exerceu efeito de inibição sobre *S. aureus* (Figura 2B). Quando *S. aureus* cresceu em meio contendo o SN de PD 6.9, houve diferença na sua taxa de crescimento comparada ao controle, os valores de  $\mu$  diminuíram de 0,49 para 0,44 h<sup>-1</sup> (Tabela 5) e também foi verificada uma pequena diminuição da densidade ótica no final do crescimento. Porém, em meio adicionado de EB do isolado PD 6.9, verificou-se uma grande variação na taxa de crescimento que, mudou de 0,57 para 0,27 h<sup>-1</sup> com grande redução na densidade celular (0,78 para 0,45) após 10 horas de cultivo. Os demais SN não tiveram nenhum efeito, uma vez que não alteraram a velocidade de crescimento e também não afetaram a densidade celular.

Vale ressaltar que o isolado PD 6.9 foi o único que inibiu *S. aureus* pelo método de inibição em ágar (Tabela 1). No método de difusão em ágar o SN do isolado PD 6.9 não produziu halo de inibição sobre *S. aureus*, este resultado pode ser em decorrência do número inicial de células de *S. aureus*. Em meio líquido, o número de células era de aproximadamente 10<sup>3</sup> células/mL e em meio sólido de 10<sup>5</sup> células/mL, portanto não teria a concentração mínima da substância inibidora necessária para inibir 10<sup>5</sup> células de *S. aureus*.



**Figura 2.** Inibição de *Micrococcus luteus* ATCC 12240 (A), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B) e *Listeria monocytogenes* CERELA (C) em meio basal adicionado de 1:50 dos sobrenadantes neutralizados (SN) (a) e de 1:50 dos extratos protéicos brutos (EB) (b) dos isolados lácticos. (■) Controle, (▲) ID 1.5, (○) ID 3.1, (●) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ID 8.5, (△) *Lactobacillus mali* PR 3.1, (◇) PD 4.7, (□) PD 6.9.

Quando *L. monocytogenes* foi cultivada em meio contendo os SN das bactérias lácticas, um ligeiro efeito de inibição foi observado (Figura 2C). A substância inibidora presente no SN de *L. mali* PR 3.1 foi a que exerceu maior efeito sobre a velocidade de crescimento de *L. monocytogenes*, alterando-a de 0,71 para 0,60 h<sup>-1</sup>, porém não houve redução da densidade celular no final do crescimento. No método de inibição em ágar, *L. mali* PR 3.1 foi a que apresentou menor halo de inibição sobre *L. monocytogenes* CERELA (Tabela 1). Porém, quando *L. monocytogenes* cresceu em meio contendo SN dos demais isolados não foi observada nenhuma mudança em sua taxa de crescimento, mas houve uma pequena redução do número de células em relação ao controle. Este número de células foi menor quando na presença do SN do isolado PD 6.9 que atingiu densidade ótica de aproximadamente 0,57 sendo que a do controle foi de no máximo 0,78.

**Tabela 5.** Valores de  $\mu$  obtidos durante crescimento de *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* CERELA em meio basal adicionado de 1:50 dos sobrenadantes neutralizados (SN) e dos extratos protéicos brutos (EB) dos isolados lácticos.

Isolados lácticos	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )					
	<i>M. luteus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	SN	EB	SN	EB	SN	EB
Controle	0,14	0,37	0,49	0,57	0,71	0,55
ID 1.5	0	0	0,47	0,61	0,70	0,57
ID 3.1	0	0	0,47	0,60	0,70	0,45
ID 8.5	0	0	0,49	0,55	0,68	0,46
PR 3.1	0	0	0,48	0,58	0,60	0,44
PD 4.7	0	0	0,49	0,63	0,68	0,45
PD 6.9	0	0	0,44	0,27	0,71	0,46

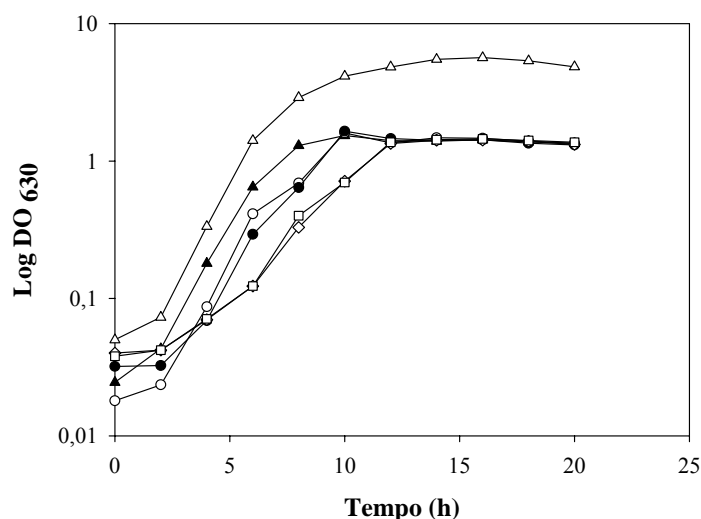
Entretanto, quando *L. monocytogenes* foi cultivada em meio adicionado dos EBs das culturas lácticas verificou-se um aumento na fase lag, que passou a ser de 4 horas e uma redução da taxa de crescimento para todos os isolados, com

exceção do isolado 1.5 (Tabela 5). A taxa de crescimento de *L. monocytogenes* passou de 0,55 para em média 0,45 h<sup>-1</sup> e uma grande redução do número de células em relação ao controle durante todo o cultivo foi observada.

Os resultados dos experimentos de inibição em meio líquido estão coerentes com os experimentos de inibição em ágar. O crescimento de *M. luteus* foi sensível à substância inibidora presente no SN e EB de todas as bactérias lácticas testadas, e o isolado PD 6.9 foi o que apresentou melhor resultado de inibição sobre *S. aureus*. Os EBs de todos os 6 isolados tiveram efeito de inibição sobre *L. monocytogenes*.

### **3.6. Curvas de crescimento das bactérias lácticas e determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ )**

A Figura 3 mostra as curvas de crescimento dos isolados lácticos cultivados em seus respectivos meios de isolamento na temperatura de 30 °C. Todos os isolados lácticos tiveram uma pequena fase lag de aproximadamente 2 horas. *L. mali* PR 3.1 apresentou maior velocidade de crescimento ( $\mu=0,56$ ) e também foi a que atingiu maior densidade de células (DO=5,65) após 16 horas de crescimento (Tabela 6). Os demais isolados atingiram a densidade óptica de aproximadamente 1,4 e entraram em fase estacionária após 12 horas de crescimento. O isolado ID 3.1 e *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* ID 8.5 apresentaram comportamento semelhante durante o crescimento, cujos valores de  $\mu$  foram de 0,48 e 0,44 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Este mesmo comportamento foi observado também entre os isolados PD 4.7 e PD 6.9.



**Figura 3.** Curvas de crescimento dos isolados lácticos cultivados em aerobiose a 30 °C. (▲) ID 1.5, (○) ID 3.1, (●) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ID 8.5, (△) *Lactobacillus mali* PR 3.1, (◇) PD 4.7, (□) PD 6.9. Isolados ID e PD, meio D-MRS; isolado PR, meio MRS.

**Tabela 6.** Valores de  $\mu$  obtidos na equação linear durante crescimento dos isolados lácticos cultivadas em aerobiose a 30 °C.

Isolados lácticos	Velocidade específica de crescimento - $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
ID 1.5	0,40
ID 3.1	0,48
ID 8.5	0,44
PR 3.1	0,56
PD 4.7	0,47
PD 6.9	0,50

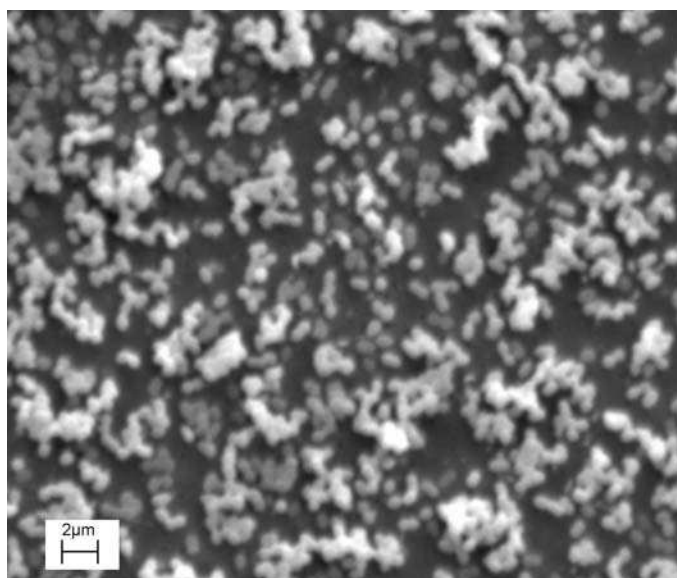
Isolados ID e PD, meio D-MRS; isolado PR, meio MRS.

A seleção do isolado para melhor caracterização da substância inibidora nos estudos posteriores foi feita com base em alguns critérios analisados neste

trabalho como, a resistência da atividade de inibição ao tratamento térmico, estabilidade da substância inibidora em ampla faixa de pH, velocidade de crescimento e amplo espectro de inibição, principalmente sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes*. O isolado PD 6.9 foi selecionado, pois apresentou melhores resultados de inibição dos microrganismos de interesse tanto em meio sólido quanto em meio líquido, além da substância inibidora apresentar outras vantagens importantes como resistência ao calor e estabilidade em ampla faixa de pH.

### 3.7. Análise por microscopia eletrônica

A Figura 4 ilustra a morfologia de células em fase log, do isolado PD 6.9 cultivado em D-MRS a 30 °C. As células são esféricas (cocos) e geralmente se encontram em pares ou formando pequenas cadeias. Esta formação é característica de células cocoides de bactérias lácticas como *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*.



**Figura 4.** Micrografia do isolado PD 6.9 cultivado em D-MRS a 30°C durante 10 horas de cultivo. Aumento de 5.000X.

### 3.8. Identificação do isolado PD 6.9

Com o objetivo de identificar o isolado PD 6.9, uma região do seu DNA foi amplificada por PCR com primers específicos para rDNA 16S de eubactérias. O DNA amplificado foi clonado em vetor TOPO e a região codificadora do gene de rRNA 16S foi seqüenciada (Figura 5). A seqüência da região em estudo, cerca de 890 pb, revelou alta homologia com as seqüências de genes de rRNA 16S de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* LBrl (número de acesso: AY920469) e a identidade entre essas duas seqüências foi de 99% (495/500, razão entre o número de nucleotídeos do isolado PD 6.9 e o de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* LBrl).

```
GCAGCTGGTACGACCCGGATNACTAGTACGGCGCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTCCGAATTCGT
CGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTG
AGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACCGGTGGGGA
ATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACA
CAAGTTTAAAGTTTAAAAGATGCAATGCATCACTCAAAGATGATCCCGGTTGTATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGA
GAAGAACGCTGGTGAGAGCTGAAAAGCTCATCAAGTGACGGNAACTACCCAGCAAAGGGACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGNAATACGTAGGTCCCAGCGCTGTCCGGATCCATCGGGCG
TAACAGCGAGCGCAGGNGGCNCCACTCACGTCTGGCNGTACNCAGGCANGGGGCTCAACCCACT
GGTCACTGGCCACTCGGGGAACAACCTGGGCTACGAACCTCTGGACGTGGCAGGGANCCACNG
AGCAACTGCGCAAACCTCCNATGACGCTACANCCGGCCGCAAACCGCGGCT
ANAGCAATCATCATCGGGACNNGAACCCGGCCTGNCCAAACNCCGGNGCNCACCGGGCCCC
CCGGCCACN
```

**Figura 5.** Seqüência parcial de bases de DNA codificador do rRNA 16S do isolado PD 6.9.

Devido ao número limitado de nucleotídeos seqüenciados, a identificação do isolado PD 6.9 não foi conclusiva, portanto, esta também foi realizada pelo padrão de fermentação de carboidratos. De acordo com o perfil de fermentação de açúcares obtido pelo API 50 CH (Tabela 7), o isolado PD 6.9 foi identificado como *L. lactis* subsp. *lactis* apresentando um alto grau de identidade quando comparado com o banco de dados do programa APILAB (ID = 99,8%).

Este resultado confirma a identificação obtida pela técnica da amplificação da região codificadora de rRNA 16S.

**Tabela 7.** Perfil de fermentação de açúcares produzido pelo isolado PD 6.9 após 72 horas de cultivo em meio CHL (API 50 CH – Biomérieux) a 30°C.

Número da cúpula	Açúcar	Resultado	Número da cúpula	Açúcar	Resultado
0	Controle	-	25	Esculina	+
1	Glicerol	-	26	Salicina	+
2	Eritrol	-	27	Celobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	-
6	D-Xilose	+	31	Sacarose	+
7	L-Xilose	-	32	Trealose	+
8	Adonitol	-	33	Inulina	-
9	$\beta$ -Metil xilosídeo	-	34	Melizitose	-
10	Galactose	+	35	Rafinose	-
11	D-Glicose	+	36	Amidon	+
12	D-Frutose	+	37	Glicogênio	-
13	D-Manose	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbose	-	39	$\beta$ -Gentiobiose	+
15	Raminose	-	40	D-Tiranose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Liose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	Manitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucose	+
20	$\alpha$ -metil D-manosídeo	-	45	D-Arabitól	-
21	$\alpha$ -metil D-glicosídeo	-	46	L-Arabitól	-
22	N-Acetil glicosamina	+	47	Gliconato	+
23	Amigdalina	+	48	2 Ceto-gliconato	-
24	Arbutina	+	49	5 Ceto-gliconato	-

-: Resultado negativo

+: Resultado positivo

Dentre as bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos fermentados, as bactérias do gênero *Lactobacillus* são as mais predominantes e mais freqüentemente isoladas, como *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus plantarum* (HAMMES, 1990; SCHILLINGER e LÜCKE, 1987). Entretanto, espécies de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, as quais são comumente encontradas em produtos de laticínios, têm sido ocasionalmente isoladas de produtos cárneos. RODRÍGUEZ et al. (1995) isolaram duas linhagens de *L. lactis*, BB24 e G18, ambas produtoras de Nisina, de salame fermentado seco Espanhol. DROSINOS et al. (2005) isolaram e caracterizaram 288 bactérias do ácido láctico de salame fermentado Grego, sendo que dessas, 14 linhagens foram identificadas como *L. lactis* subsp. *lactis*. Estes trabalhos mostram que a carne é um ambiente adequado para o crescimento de *Lactococcus*.

Culturas bacteriocinogênicas usadas como *starter* na fermentação de carnes geralmente incluem linhagens de *Lactobacillus* (HUGAS et al., 1995), *Pediococcus* (BHUNIA et al., 1988) e mais recentemente *Lactococcus* (COFFEY et al., 1998). As bactérias lácticas mais promissoras como culturas *starter* ou protetoras são aquelas originadas da microbiota indígena do produto. Estas bactérias são bem adaptadas à carne e são capazes de dominar a microbiota do produto (HAMMES, 1990).

Portanto a bactéria láctica selecionada neste estudo, *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, isolada de salame tipo italiano, apresenta grande chance ser usada como cultura *starter* ou protetora na fermentação de salame para prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos, incluindo *L. monocytogenes*. Esta bactéria parece ser um microrganismo dominante, pois foi obtida de uma diluição de  $10^8$  células/mL e sua população aumentou após 22 dias de fermentação (MACIEL, 1998).

## 4. CONCLUSÃO

Bactérias do ácido láctico isoladas de salame tipo italiano, com atividade antagonista sobre vários microrganismos incluindo, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foram caracterizadas. As substâncias inibidoras produzidas por seis bactérias lácticas podem ser como bacteriocinas, uma vez que a inibição por ácido e peróxido de hidrogênio foi excluída. A natureza protéica das bacteriocinas foi confirmada pela sensibilidade a enzimas proteolíticas, com exceção daquela produzida pelo isolado ID 3.1. As bacteriocinas mantiveram atividade de inibição em ampla faixa de pH e foram estáveis ao calor, pois a atividade não foi perdida a 98°C por 40 minutos.

Todas as bacteriocinas possuem um amplo espectro de inibição e foram ativas contra a maioria das bactérias do ácido láctico testadas, mas não inibiram as linhagens de *Lactococcus lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Analisando a atividade de inibição em meio sólido, a bacteriocina do isolado PD 6.9 apresentou melhor resultado de inibição, principalmente sobre patógenos de origem alimentar como *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *L. monocytogenes*. As bacteriocinas das seis bactérias lácticas inibiram *Micrococcus luteus* e *L. monocytogenes* em meio líquido, enquanto a inibição de *S. aureus* foi observada somente pela bacteriocina do isolado PD 6.9.

Como o objetivo geral deste trabalho foi selecionar isolados para futuramente serem usados como culturas *starter* ou culturas protetoras, visando principalmente à segurança microbiológica, o isolado PD 6.9 identificado como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, foi escolhido para continuação imediata da caracterização de sua bacteriocina. Ele foi selecionado, pois apresentou os melhores resultados de inibição dos microrganismos de interesse tanto em meio sólido quanto em meio líquido, além de sua substância inibidora apresentar outras vantagens importantes como resistência ao calor, estabilidade em ampla faixa de pH e amplo espectro de inibição.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYMERICH, M. T., HOLO, H., HAVARSTEIN, L. S., HUGAS, M., GARRIGA, M., NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new listerial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 1676-1682, 1996.
- AYMERICH, M. T., HUGAS, M., MONFORT, J. M. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Sci. Technol. Int.**, v. 4, n. 3, p. 141-158, 1998.
- BALLA E., DICKS, L. M. T., DU TOIT, M., VAN DER MERWE, M. J., HOLZAPFEL, W. H. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A e enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecium* BFE 1071. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1298-1304, 2000.
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C., RAY, B. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 62, p. 261-268, 1988.
- BISWAS, S. R., RAY, B., JOHNSON, M. C., RAY, B. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin ACH, by *Pediococcus acidilactici*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1265-11267, 1991.
- CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, n.(1-2), p. 131-149, 1999.
- 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.
- CLIVER, D. O., MARTH, E. H. Preservation, sanitation and microbiological specifications for food. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne disease**, Califórnia: Academic Press Inc, 1990. p.85-106.
- COFFEY, A., RYAN, M., ROSS, R. P., HILL, C., ARENDT, E., SCHWARZ, G. Use of a broad host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis*

transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 43, p. 231-235, 1998.

DAESCHEL, A. M. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: HOOVER, D. G., STEENSON, L. R. (Ed). **Bacteriocins of lactic acid bacteria**, Academic Press, Inc., 1993. p. 63-86.

De PAULA, R. A. **Atividade inibidora em bactérias lácticas e produção de bacteriocinas**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 47p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

De MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, E. A medium for the cultivation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains. **Microbiol. Alim. Nutr.**, v. 7, p. 139-143, 1960.

DROSINOS, E. H., MATARAGAS, M., XIRAPHI, N., MOSCHONAS, G., GAITIS, F., METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p. 307-371, 2005.

FERCHICHI, M., FRÈRE, J., MABROUK, K., MANAI, M. Lactococcin MMFII, a class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII isolated from a Tunisian dairy product. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 205, p. 49-55, 2001.

GEORGALAKI, M. D., VAN DE BERGHE, E., KRITIKOS, D., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., KALANTZOPOULOS, G., De VUYST, L., TSAKALIDOU, E. Macedocin, a food grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 88, n. 12, p. 5891-5903, 2002.

HAMMES, W. P. Bacterial starter cultures in food production. **Food Biotechnol.**, v. 4, p. 383-397, 1990.

HAMMES, W. P., HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, v. 49, Suppl. I, SI25- SI38, 1998.

HAMMES, W. P. WEISS, N., HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALOWS, A., TRUPER, H. G., DWORKIN, M. et al. **The prokaryotes**, 2 ed., New York: Springer-Verlag, 1992. v. 2, p.1535-1594.

- HUGAS, M., GARRIGA, M., AYMERICH, T. MONFORT, J. M. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausage by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 79, p. 322-330, 1995.
- HUGAS, M., MONFORT, J. M. Bactericidal starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, p. 547-554, 1997.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23-28, 1990.
- LASH, B. W., MYSLIWIEC, T. H., GOURAMA, H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). **Food Microbiol.**, v. 22, p. 199-204, 2005.
- LEE, N. K., PAIK, H. D. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactobacillus lactis* NK24 isolated from Jeot-gol. **Food Microbiol.**, v.18, p. 17-24, 2001.
- 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.**, v. 57, n. 6, p. 1683-1688, 1991.
- LIU, W., HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2551-2558, 1990.
- LUCKE, F. K. Fermented sausages. In: WOOD, B. J. B. **Microbiology of fermented foods**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1985, v. 2, p. 41-83.
- LUCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.
- MACIEL, J. F. **Atividade antibacteriana de culturas lácticas isoladas de salame tipo italiano processado por fermentação natural**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 52p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MANTOVANI, H. C., HU H., WOROBO, R. W., RUSSEL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, p. 3347-3352, 2002.

- Mc MULLEN, L. M., STILES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **J. Food Protect.**, Suppl., p. 64-71, 1996.
- MESSI, P., BONDI, M., SABI, C., BATTINI, R., MANICARDI, G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 64, p. 193-198, 2001.
- MORAES, C. A. **The genetic relationship of D-xylose metabolism among the lactic acid bacteria.** Cornell: Cornell University, 1995. 143p. These (Doctor in Philosophy), Cornell University, 1995.
- O'SULLIVAN, L. ROSS, R. P., HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, p. 593-604, 2002.
- PAPAMANOLI, E. N., TZANETAKIS, E., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, p. 859-867, 2003.
- RODRÍGUEZ, J. M., CINTAS, L. M., CASAUS P., DODD, H. M. HERNÁNDEZ, P. E., GASSON, M. J. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausage. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 109-115, 1995.
- ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 79, p. 3-16, 2002.
- SCHILINGER, U., LÜCKE, F. K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiol.**, v. 6, p. 199-208, 1987.
- SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trench in Food Sci. Technol.**, v. 7, p. 158-164, 1996.
- STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 331-345, 1996.

- SMITH, J. L., BUCHANAN, R. L., PALUMBO, S. A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. **J. Food Protect.**, v. 46, p. 545-555, 1983.
- TAHIRI, L., DESBIENS, M., BENECH, R., KHEADR, E., LACROIX, C., THIBAUT, S., OUELLET, C., FLISS, I. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 97, n. 2, p. 123-136, 2004.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram - positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.
- TYÖPPÖNEN, S., PETÄJÄ, E., MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 83, n. 3, p. 233-244, 2002.
- UETANABARO, A. P. T. **Seqüência e caracterização de região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** Viçosa, MG. UFV, 1999. 60p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 1999.

## **CAPÍTULO 3**

**Atividade anti-*Listeria* de bacteriocina produzida por  
*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 isolado de salame tipo italiano**

## 1. INTRODUÇÃO

A preservação de alimentos por fermentação é uma técnica antiga e amplamente praticada. Um objetivo importante da fermentação é conservar o alimento, podendo aumentar o seu período de vida e também aumentar o valor nutritivo, garantir segurança microbiológica e produzir alimentos com características diferentes, influenciando assim na sua comercialização (CAPLICE e FITZGERALD, 1999; ROSS et al., 2002). Muitos produtos cárneos fermentados são mantidos em altas temperaturas durante o processamento para assegurar uma rápida fermentação, mas essas temperaturas podem também acentuar o crescimento de bactérias patogênicas. Muitos desses produtos não recebem tratamento térmico e têm como único processamento a fermentação. Embora uma sanitização adequada, higiene e controle da matéria-prima reduzam a contaminação, o ponto forte para controlar a segurança do produto está na formulação e processamento (BACUS e BROWN, 1981).

Quando o processamento não é adequadamente monitorado, pode favorecer a ocorrência e o crescimento de alguns microrganismos como *Staphylococcus aureus* (SMITH et al., 1983) e *Listeria monocytogenes* (FARBER e PETERKIN, 1991). *S. aureus* é uma bactéria halotolerante e hábil para crescer nas condições adversas de salame, porém é um fraco competidor, quando comparada com culturas *starter* usadas em salames fermentados (MARTINS E LUCHESE, 1993). As barreiras presentes na fermentação de salames não são suficientes para prevenir a sobrevivência de *L. monocytogenes* que tem sido freqüentemente isolada de produtos cárneos (FARBER e PETERKIN, 1991; VARABIOFF, 1992). *L. monocytogenes* apresenta-se amplamente difundida na natureza e a sua incidência em alimentos ocorre principalmente devido à sua transferência do ambiente para o alimento durante o processamento (NESBAKKEN et al., 1996). *L. monocytogenes* é um patógeno de origem alimentar oportunista, que infecta principalmente indivíduos susceptíveis como mulheres grávidas, neonatos, crianças, idosos e indivíduos com o sistema

imunológico comprometido. A listeriose humana pode causar meningite, septicemia, abscessos, aborto ou parto prematuro e até a morte do indivíduo (BAHK e MARTH, 1990; TAUXE, 2002). *Listeria* pode sobreviver em alimentos por muito tempo mesmo durante estocagem a 4°C (LAHTI et al., 2001; JACOBSEN et al., 2003). Métodos para prevenir o crescimento de *Listeria* e outros patógenos em produtos cárneos fermentados incluem redução no pH e atividade de água, adição de nitrito e utilização de bactérias do ácido láctico como culturas *starter* (SCHILLINGER et al, 1996; BREDHOLT et al, 2001).

A inibição de microrganismos patogênicos e deteriorados, por culturas *starter*, ocorre por meio de vários mecanismos como, competição por nutrientes e oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias inibitórias como, por exemplo, ácidos orgânicos, acetoína, diacetil, reuterin, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (HUGAS, 1998).

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas extracelulares as quais têm efeito bactericida ou bacteriostático sobre bactérias Gram positivas, incluindo bactérias patogênicas e/ou deterioradoras (O'KEEFFE e HILL, 1999). Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico atuam na membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas, dissipando a força próton-motora através da formação de poros (ABEE et al., 1995). Em todos os casos, a célula produtora exibe imunidade específica à ação de sua própria bacteriocina. A maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico é catiônica, hidrofóbica e inativada por enzimas proteolíticas. Elas são comumente agrupadas em 3 classes e as bacteriocinas das classes I e II são pequenas (menor que 10 kDa), resistentes ao calor e são bastante estudadas como candidatas para aplicação industrial. As bacteriocinas da classe III são proteínas maiores e sensíveis ao calor (KLAENHAMMER, 1993; NES et al., 1996; AYMERICH et al., 1998).

Nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem caracterizada e considerada segura e eficaz para uso em alimentos há mais de 30 anos. Nisina é a única bacteriocina licenciada para uso como aditivo em alimentos, mas outras bacteriocinas apresentam potencial para uso como conservantes em alimentos em particular, pediocina produzida por *Pediococcus*

*acidilactici*. Pediocina é bastante estudada e provavelmente será a segunda bacteriocina de bactéria do ácido láctico usada na indústria alimentícia (AYMERICH et al., 1998; CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Um grande número de outras bacteriocinas de bactérias do ácido láctico está sendo identificado e vários trabalhos relatam a caracterização destas bacteriocinas de produtos cárneos fermentados com capacidade para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores (CAMPANINI et al., 1993; CINTAS et al., 1995; HUGAS et al., 1995; RODRÍGUEZ et al., 1995; BENKERROUM et al., 2003; PAPAMANOLI et al., 2003).

A proposta deste trabalho foi caracterizar a atividade bacteriocinogênica presumida de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* obtida de salame tipo italiano contra *L monocytogenes* e determinar algumas características bioquímicas, modo de ação e a atividade de inibição em meio que simula as condições do salame.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos

A bactéria láctica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, usada neste estudo foi isolada de salame tipo italiano processado por fermentação natural e cultivada a 30 °C por 16 horas em meio D-MRS (HAMMES et al., 1992).

As linhagens de *Listeria* spp. utilizadas como microrganismos indicadores foram obtidas de ambiente de laticínios (REZENDE, 1996).

As linhagens de *Listeria monocytogenes* foram *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* Scott A e as demais foram provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFV, isoladas de alimentos e ambientes de laticínios. Elas foram cultivadas em meio Tryptic Soy Broth (TSB) + 0,6 % de extrato de levedura e incubadas a 37 °C.

As linhagens de *Staphylococcus aureus* utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12600 e 25923, e linhagens isoladas de bovinos com mastite subclínica, foram gentilmente cedidas pela Embrapa Gado de Leite - MG. As linhagens foram cultivadas em meio basal (peptona 10 g/L, glicose 10 g/L, NaCl 5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L, extrato de carne 8 g/L, extrato de levedura 4 g/L) e incubadas a 37 °C.

Todas as culturas foram congeladas em nitrogênio líquido em seus respectivos meios de cultivo com 20% de glicerol e mantidas a -80 °C. No início de cada experimento, as culturas foram estriadas em seus respectivos meios com ágar 1,5% e depois ativadas em caldos.

## **2.2. Obtenção do sobrenadante neutralizado (SN) e do extrato protéico bruto (EB)**

*L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi cultivado em 500 mL de caldo D-MRS a 30 °C por 16 horas e a cultura foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 5 °C e sobrenadante foi obtido. Para obtenção do SN, volumes de 10 mL foram submetidos à correção para pH 6,5 com NaOH 5 M (pH meter accumet® model 15), filtrados em membrana Millipore 0,20 µm e estocados a -20 °C para análises posteriores.

O restante do sobrenadante foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio (Sigma) 60% por 2 horas em gelo. A preparação foi centrifugada a 20.000 g por 30 minutos a 5 °C, o sedimento foi ressuspendido em 2 mL de tampão acetato de sódio 20 mM pH 5, e submetido à diálise. Para diálise utilizou-se membrana de ponto de corte de 1.000 Daltons e a diálise ocorreu contra 2 L do mesmo tampão por 24 horas, com troca de tampão a cada 8 horas. Após a diálise, o EB obtido foi filtrado em membrana Millipore 0,20 µm e estocado a -20 °C para análises posteriores.

## **2.3. Quantificação do extrato protéico bruto (EB)**

A atividade da bacteriocina foi quantificada pelo método de diluição onde diluições seriadas da amostra do EB (200 µL) foram feitas em meio D-MRS com incrementos de 2 vezes e 30 µL de cada diluição foram adicionados em orifícios feitos em placas com 20 mL de ágar contendo aproximadamente 10<sup>5</sup> células/mL da cultura de *L. monocytogenes* 764/93. As placas foram mantidas em geladeira por 12 horas para difusão e posteriormente incubadas a 37 °C para crescimento do microrganismo indicador. A atividade antimicrobiana (expressas em unidade arbitrária por mL – AU/mL) foi calculada a partir da recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição de 5 mm (HOOVER e HARLANDER, 1993).

#### **2.4. Inibição sobre *Listeria* e *S. aureus* em meio sólido**

A atividade de inibição de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 contra linhagens de *Listeria* e *S. aureus* foi determinada pelo método de difusão em ágar com algumas modificações (TAGG et al., 1976), onde 30 µL do sobrenadante (S), sobrenadante neutralizado (SN) e do extrato protéico bruto (EB) foram adicionados em orifícios (5 mm) feitos em placas contendo 20 mL de meio de cultura sólido inoculado com aproximadamente 10<sup>5</sup> células/mL de cada microrganismo indicador. As placas foram mantidas a 4 °C por 12 horas para difusão e posteriormente incubadas em condições ótimas para o crescimento do microrganismo indicador. Após 24 horas de incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido e apresentado como a medida do diâmetro externo do halo de inibição subtraído do diâmetro do orifício.

#### **2.5. Efeito de enzimas proteolíticas e tratamento térmico sobre o extrato protéico bruto (EB)**

O EB foi tratado com Catalase C40 (Sigma) na concentração final de 1 mg/mL e incubado por 1 hora a 37 °C. Após este período de incubação, as enzimas proteolíticas, Proteinase K, Protease (Dispase) de *Bacillus polimyxa*, Papaína e Tripsina (todas Sigma) foram adicionadas na concentração final de 5 mg/mL com o objetivo de determinar a natureza protéica da substância inibidora. Após 2 horas de incubação a 37 °C, a atividade de inibição do EB foi determinada pelo método de difusão em ágar utilizando *L. monocytogenes* 764/93 como bactéria indicadora.

Alíquotas do EB foram submetidas às diferentes tratamentos: 70 °C/30 min; 100 °C/30 min e 121 °C/20 min. A atividade residual foi detectada pelo método de difusão em ágar utilizando *L. monocytogenes* 764/93 como bactéria indicadora. Para controle, foi utilizado o EB dissolvido em tampão acetato de sódio 20 mm, pH 5, sem nenhum tratamento.

## **2.6. Inibição de *L. monocytogenes* 764/93 em meio líquido**

O efeito do EB sobre a viabilidade e crescimento de *L. monocytogenes* 764/93 foi avaliado. *L. monocytogenes* 764/93 foi cultivada em caldo TSB + 0,6% de extrato de levedura durante 12 horas a 37 °C, e alíquotas foram inoculadas no mesmo meio contendo 10, 50 e 100 AU/ml do EB. O controle não continha o EB. As culturas foram incubadas a 37 °C e leituras de DO<sub>630</sub> nm foram realizadas em intervalos de tempos determinados.

O efeito do EB sobre o crescimento de *L. monocytogenes* 764/93 foi medido também na presença de 5 mg/mL de Protease (Dispase) de *Bacillus polymyxa*.

## **2.7. Análise do modo de ação da bacteriocina sobre *L. monocytogenes* 764/93**

O efeito inibidor da bacteriocina foi determinado usando células de *L. monocytogenes* 764/93 em fase estacionária. A cultura da *Listeria* foi crescida por 18 horas em caldo TSB + 0,6% de extrato de levedura e foi centrifugada a 10.000 g, por 15 minutos, a 5 °C. O pellet foi lavado com tampão fosfato citrato 20 mM pH 5 (GERHARDT et al., 1994), centrifugado e ressuspendido no mesmo tampão até DO<sub>630</sub>=1.0, o que equivale a aproximadamente 10<sup>9</sup> células/mL. Em um tubo foram adicionados 100 AU/mL do EB e este foi incubado por 24 horas a 37 °C. Alíquotas de 300 µL foram retiradas em intervalos de tempos determinados e diluições decimais foram realizadas em caldo TSB + 0,6% de extrato de levedura. As amostras diluídas foram incubadas por 24 horas a 37 °C para verificar turvação do meio. No tubo controle não foi adicionado o EB.

### **2.7.1. Análise de *L. monocytogenes* 764/93 por microscopia eletrônica**

As células de *L. monocytogenes* 764/93, controle e tratadas com 100 AU/mL do EB, após 8 horas, foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 5 °C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7 e submetidas novamente à centrifugação. Este processo de lavagem foi realizado por 2 vezes. Após, o concentrado de células foi ressuspensado em 5 mL do mesmo tampão e filtrado em membrana Millipore 0,22 µm. A membrana foi cortada em pedaços de aproximadamente 1 cm x 1 cm e as células fixadas por 16 horas em glutaraldeído 2,5% preparado em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7. O material fixado foi lavado 6 vezes neste mesmo tampão por 10 minutos. A seguir, a desidratação foi realizada submetendo a membrana a uma série de concentrações de etanol da seguinte forma: 30%/10 minutos, 50%/10 minutos, 70%/10 minutos, 80%/10 minutos, 90%/10 minutos, 100%/15 minutos por 2 vezes. A membrana foi seca utilizando o método de secagem em ponto crítico em CO<sub>2</sub> líquido por um período determinado, para retirada de qualquer vestígio de umidade remanescente. Em seguida, a membrana foi colocada em suporte apropriado, coberta com ouro (metalização) e a preparação foi examinada em microscópio eletrônico de varredura modelo Leo 1430 VP e fotografada com aumento de 5.000X.

### **2.8. Inibição de *L. monocytogenes* 764/93 em caldo salame**

#### **2.8.1. Preparo do caldo salame**

Carne de porco sem osso foi obtida de um açougue local. Uma porção de 250 g foi cortada assepticamente em pedaços bem pequenos e triturada com 250 mL de solução salina 0,85% em liquidificador (Walita Beta) até obter uma mistura bem homogênea. A mistura foi filtrada em tecido fino, o volume

completado para 500 mL, e centrifugada por 2 vezes a 10.000 g por 10 minutos a 5 °C. Após, foram adicionados reagentes que são utilizados na fermentação de salame tipo italiano como: glicose 1,0%, NaCl 3,0%, Na NO<sub>2</sub> 120 ppm, NaNO<sub>3</sub> 200 ppm e a solução foi filtrada em papel Whatman n° 1 por 2 vezes. Em seguida, o meio foi filtrado em filtro Millipore 0,45 µm para garantir a esterilidade e estocado a -20 °C.

### **2.8.2. Crescimento e atividade da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em caldo salame**

O caldo salame foi inoculado com 10<sup>7</sup> células de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, incubado a 25 °C sob condições aeróbias, e o crescimento foi acompanhado durante 32 horas. Em intervalos de tempo pré-determinados foram analisadas a contagem de células viáveis, pH e atividade de inibição.

Diluições seriadas da cultura foram feitas em solução salina 0,85% e plaqueadas em ágar D-MRS. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Para a determinação do pH e da atividade de inibição, 1 mL da cultura foi centrifugado a 10.000 g por 5 minutos e o sobrenadante coletado. O pH do sobrenadante foi medido (pH meter accumet<sup>®</sup> modelo 15). Após esta etapa, o sobrenadante foi neutralizado para pH 6,5 com NaOH 5 M, filtrado em membrana Millipore 0,20 µm e a atividade de inibição foi determinada pelo método de difusão em ágar utilizando *L. monocytogenes* 764/93 como microrganismo indicador.

### **2.8.3. Crescimento de *L. monocytogenes* 764/93 em caldo salame**

*L. monocytogenes* 764/93 (10<sup>7</sup> células/mL) foi inoculada no caldo salame e incubada a 25 °C sob condições aeróbias, e o crescimento foi acompanhado

durante 32 horas. Em determinados intervalos de tempo, amostras da cultura foram retiradas e diluídas em solução salina 0,85%. As diluições foram plaqueadas em TSA + 0,6% de extrato de levedura e as placas foram incubadas a 37 °C para contagem de colônias.

#### **2.8.4. Inibição de *L. monocytogenes* 764/93 em caldo salame por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9**

O caldo salame foi inoculado com *L. monocytogenes* 764/93 na densidade de  $10^6$  UFC/mL e *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi adicionado a uma concentração final de  $10^7$  UFC/mL. O co-cultivo foi feito a 25 °C e amostras foram retiradas em intervalos programados para contagem de colônias utilizando a técnica de microgotas e para determinação de pH.

Diluições seriadas do co-cultivo foram feitas em solução salina 0,85% e foram plaqueadas em ágar D-MRS contendo 0,5% de carbonato de cálcio e 0,004 % de púrpura de bromocresol e incubadas 30 °C, para contagem de células viáveis de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9. Ágar TSA + 0,6% de extrato de levedura suplementado com cloreto de lítio 1,5% foi usado para contagem de células viáveis de *L. monocytogenes*.

Para a determinação do pH, 1 mL do co-cultivo foi centrifugado a 10.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o pH medido (pH meter accumet® modelo 15).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Inibição de *Listeria* em meio sólido

Foi avaliada a atividade de inibição do sobrenadante da cultura (S), sobrenadante neutralizado (SN) e extrato bruto protéico (EB) de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre várias linhagens de *Listeria* obtidas de diferentes fontes (Tabela 1). Todas as linhagens de *L. monocytogenes*, com exceção de *L. monocytogenes* ATCC 7644, foram sensíveis aos sobrenadantes e ao EB. O pH do sobrenadante apresentou um valor de 4,12. A atividade inibitória presente do sobrenadante neutralizado indica que a inibição não é devida à produção de ácido. Aumentos nos halos de inibição nos EBs foram verificados e podem ser atribuídos à concentração do composto inibidor quando precipitado com sulfato de amônio (Figura 1). Resultado semelhante foi encontrado por RODRÍGUEZ et al. (1995) quando verificaram a atividade de inibição do sobrenadante e do sobrenadante 20 vezes concentrado de *Lactococcus lactis* BB24 sobre diferentes linhagens de *L. monocytogenes*.

Com relação a outras linhagens de *Listeria*, pode-se verificar que *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 não apresentou atividade de inibição contra *L. grayi* 106 e *L. welshimeri* 109. Mas a atividade de inibição foi verificada tanto no sobrenadante e SN quanto no EB para *L. grayi* 105 e *L. welshimeri* 107. As linhagens *L. innocua* 91 e *L. seeligeri* 113 foram apenas inibidas pelo EB, enquanto as linhagens *L. innocua* 94 e *L. seeligeri* 110 não foram inibidas pelo SN. Pode-se observar que a sensibilidade variou entre as linhagens testadas, sendo que a inibição foi mais efetiva contra *L. monocytogenes*. A capacidade de as bactérias do ácido láctico, isoladas de produtos cárneos fermentados, de produzir bacteriocinas contra *L. monocytogenes* é bem documentada. Exemplos de algumas linhagens bacteriocinogênicas: *Lactococcus lactis* BB24 (RODRÍGUEZ et al., 1995), *Pediococcus acidilactici* (CINTAS et al., 1995),

*Lactobacillus sake* CTC494 (HUGAS et al., 1995), *Enterococcus faecium* P21 (HERRANZ et al., 2001).

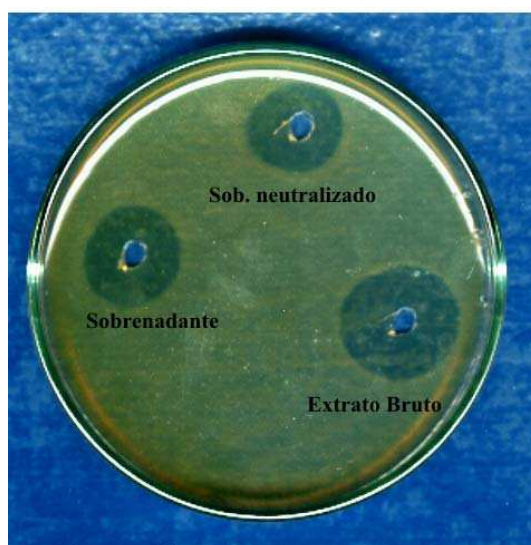
**Tabela 1.** Halos de inibição (mm) de *Listeria* spp. isoladas de alimentos e ambiente de laticínios produzidos pelo sobrenadante (S), sobrenadante neutralizado (SN) e extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9.

Linhagem	Origem	Halos de inibição		
		S	SN	EB
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Humana	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Desconhecida	7	3	10
<i>L. monocytogenes</i> 13/93	Queijo frescal	12	10	20
<i>L. monocytogenes</i> 72/94	Queijo frescal	15	11	20
<i>L. monocytogenes</i> 137/94	Lingüiça frescal	10	6	16
<i>L. monocytogenes</i> 173/94	Salsicha comercial	16	13	19
<i>L. monocytogenes</i> 195/93	Salsicha comercial	11	6	16
<i>L. monocytogenes</i> 210/93	Salsicha comercial	10	7	14
<i>L. monocytogenes</i> 260/94	Queijo frescal	11	9	16
<i>L. monocytogenes</i> 764/93	Carcaça de frango	15	9	22
<i>L. monocytogenes</i> 3999/92	Peixe congelado	12	7	17
<i>L. monocytogenes</i> 13023/94	Peito de frango	8	6	15
<i>L. monocytogenes</i> IP1 - 18	Salame	8	5	12
<i>L. monocytogenes</i> IP2 - 28	Salame	9	8	12
<i>L. monocytogenes</i> IP2 - 40	Salame	9	6	15
<i>L. monocytogenes</i> 73	Laticínios	5	2	10
<i>Listeria innocua</i> 91	Laticínios	-	-	7
<i>L. innocua</i> 94	Laticínios	3	-	7
<i>Listeria grayi</i> 105	Laticínios	3	2	7
<i>L. grayi</i> 106	Laticínios	-	-	-
<i>Listeria welshimeri</i> 107	Laticínios	4	3	8
<i>L. welshimeri</i> 109	Laticínios	-	-	-
<i>Listeria seeligeri</i> 110	Laticínios	5	-	10
<i>L. seeligeri</i> 113	Laticínios	-	-	7

-: Nenhum halo formado

A produção de bacteriocinas por bactérias lácticas, principalmente com atividade anti-*Listeria*, é uma característica importante para selecionar linhagens como culturas *starter*, uma vez que *L. monocytogenes* é um microrganismo

patogênico cujo controle em alimentos é difícil devido a sua natureza ubíqua no ambiente e devido à sua resistência a baixo pH e a alta concentração de NaCl, condições presente em vários tipos de embutidos cárneos (TAUXE, 2002). *L. monocytogenes* 764/93 foi escolhida como microrganismo indicador para o teste de atividade de inibição em meio líquido e em caldo salame, pois apresentou maior sensibilidade quando o EB foi usado.



**Figura 1.** Halos de inibição de *Listeria monocytogenes* 764/93 produzidos pelos sobrenadante (S), sobrenadante neutralizado (SN) e extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9.

### 3.2. Inibição de *S. aureus* em meio sólido

A Tabela 2 mostra a atividade de inibição do sobrenadante, SN e EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre diferentes linhagens de *S. aureus*. Todas as linhagens de *S. aureus* isoladas de bovinos com mastite foram inibidas pelos sobrenadante, SN e EB. Para as linhagens da ATCC, o SN não apresentou nenhum halo de inibição. Os halos de inibição por EB foram maiores do que os

halos obtidos com os sobrenadantes, devido provavelmente ao efeito da concentração do princípio inibidor. CINTAS et al. (1995) obtiveram resultado semelhante quando estudaram a atividade de inibição do sobrenadante e sobrenadante 20 vezes concentrado de *Pediococcus acidilactic* L50 contra diferentes linhagens de *S. aureus* isolados de alimentos.

Algumas linhagens de *S. aureus* são hábeis para produzir toxinas que são os agentes causadores de intoxicação estafilocócica. Uma vez que, a toxina é somente produzida em números elevados de células, *S. aureus* constitui um problema de saúde pública somente após atingir aproximadamente  $10^7$  células por grama de produto alimentício (LÜCKE, 2000). Ele é tolerante às condições de processamento de salame fermentado, mas é um fraco competidor quando se compara com culturas *starter* comumente usadas (METAXOPOULOS et al., 1981; TYÖPPÖNEM et al., 2002). Na indústria de carne, para suprimir o crescimento de *S. aureus*, recomenda-se o uso de bactérias do ácido láctico como culturas *starter* e o rápido abaixamento do pH para valores abaixo de 5,3 (LÜCKE, 2000). SAMESHIMA et al. (1998) verificaram que o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxina durante a fermentação de salame foram inibidos pela adição das culturas *starter* *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Já foi sugerido que o crescimento de *S. aureus* é facilmente prevenido pelos métodos convencionais, portanto nenhum fator de segurança adicional é necessário para a inativação deste microrganismo (LÜCKE, 2000). Entretanto, vale ressaltar que sua presença em salames fermentados já foi detectada por SCHEUSNER e HARMON, (1973) e SMITH et al. (1983), provavelmente como resultado de uma falha na fermentação. Portanto, a seleção de uma cultura *starter* com capacidade de inibir *S. aureus* é de grande importância, pois representa uma barreira útil a mais no processo de conservação. Linhagens de *S. aureus* provenientes de alimentos deverão ser estudadas, bem como outras características necessárias em uma cultura *starter*.

**Tabela 2.** Halos de inibição (mm) de *Staphylococcus aureus*, isolados de bovinos com mastite subclínica, produzidos pelo sobrenadante (S), sobrenadante neutralizado (SN) e extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9.

Linhagem	Origem	Halos de inibição		
		S	SN	EB
<i>Staphylococcus aureus</i> 41	MV Ed. Lop. mat. no 15/Juiz de Fora-MG	9	8	13
<i>S. aureus</i> 75	MV Ed. Lop. mat. n <sup>o</sup> 12/Juiz de Fora-MG	11	10	14
<i>S. aureus</i> 216	MV Ed. Lop. mat. n <sup>o</sup> .103/Juiz de Fora-MG	11	9	13
<i>S. aureus</i> 218	MV Ed. Lop. mat. n <sup>o</sup> .156/Juiz de Fora-MG	10	8	13
<i>S. aureus</i> 226	MV Ed. Lop. mat. n <sup>o</sup> .226/Juiz de Fora-MG	6	5	12
<i>S. aureus</i> 230	MV Ed. Lop. mat. n <sup>o</sup> .121/Juiz de Fora-MG	10	8	13
<i>S. aureus</i> 247	SPLP/ Coronel Pacheco-MG	13	11	15
<i>S. aureus</i> 258	SPLP/ Coronel Pacheco-MG	8	7	11
<i>S. aureus</i> 284	Faz. Três Ilhas / Belmiro Braga, MG	8	7	12
<i>S. aureus</i> 287	Faz. Três Ilhas / Belmiro Braga, MG	7	5	10
<i>S. aureus</i> 347	SPLP/ Coronel Pacheco-MG	9	9	15
<i>S. aureus</i> 701	Faz. Cidreira/ Tabuleiro-MG	9	7	13
<i>S. aureus</i> 707	Faz. Cidreira/ Tabuleiro-MG	10	9	13
<i>S. aureus</i> 795	Faz. Sta. Margarida/ Santos Dumont-MG	7	5	11
<i>S. aureus</i> 806	Faz. Sta. Margarida/ Santos Dumont-MG	8	8	14
<i>S. aureus</i> 1440	Faz. Sta. Mônica/ Paty do Alferes-RJ	8	8	13
<i>S. aureus</i> 1621	Faz. São José/ Ibertioga-MG	10	9	13
<i>S. aureus</i> 2221	Faz. Santa Amélia/ Pequeri-MG	8	6	11
<i>S. aureus</i> 2238	Faz. Santiago/ Leopoldina-MG	7	3	10
<i>S. aureus</i> 2252	Faz. Santiago/ Leopoldina-MG	11	10	14
<i>S. aureus</i> 2309	Faz. Vista Alegre/ Argirita-MG	9	9	13
<i>S. aureus</i> 2314	Faz. Vista Alegre/ Argirita-MG	6	5	12
<i>S. aureus</i> 2389	SPLP/ Coronel Pacheco-MG	9	7	12
<i>S. aureus</i> 2413	SPLP/ Coronel Pacheco-MG	9	7	12
<i>S. aureus</i> 2551	Faz. Três Ilhas / Belmiro Braga, MG	12	10	15
<i>S. aureus</i> 2623	SPLP/ Coronel Pacheco-MG	7	6	11
<i>S. aureus</i> 2633	SPLP/ Coronel Pacheco-MG	9	8	12
<i>S. aureus</i> 2722	Faz. Brasília/ São Pedro dos Ferros-MG	11	11	15
<i>S. aureus</i> 2724	Faz. Brasília/ São Pedro dos Ferros-MG	8	6	12
<i>S. aureus</i> 2727	Faz. Brasília/ São Pedro dos Ferros-MG	8	7	12
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	Fluido pleural	6	-	8
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Isolado clínico	5	-	7

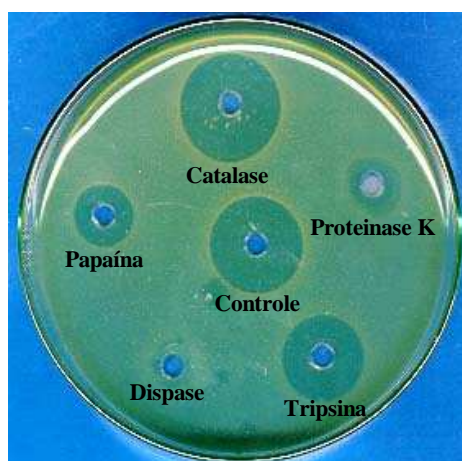
-: Nenhum halo formado

### **3.3. Efeito de enzimas proteolíticas e do tratamento térmico sobre a atividade de inibição do extrato protéico bruto (EB) de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9**

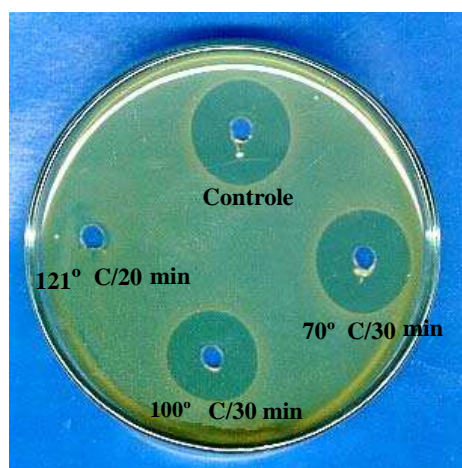
O EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 manteve a atividade de inibição contra *L. monocytogenes* 764/93, mesmo quando tratado com Catalase, eliminando a possibilidade de inibição por peróxido de hidrogênio. Para determinar a natureza protéica da bacteriocina, o efeito de algumas enzimas proteolíticas foi testado. A inibição foi abolida quando o EB foi tratado com protease Dispase (Figura 2). Entretanto, quando tratado com Proteinase K ou com Papaína, observou-se uma redução considerável desta atividade. Ao mesmo tempo Tripsina não exerceu nenhum efeito na atividade de inibição (Figura 2). A sensibilidade diferente do EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 às diferentes enzimas proteolíticas é similar ao resultado apresentado por IVANOVA et al. (1998). Os autores observaram a perda da atividade de inibição da substância inibidora presente no sobrenadante da cultura de *Streptococcus thermophilus* 81 após tratamento com proteinase K e Pronase E. Mas ao mesmo tempo, o tratamento com tripsina, quimotripsina, proteases IV e VII não apresentou efeito. Isto indica que o domínio ativo da bacteriocina não foi afetado por essas enzimas proteolíticas.

A sensibilidade da atividade da bacteriocina ao tratamento térmico foi estudada. A atividade de inibição não foi alterada pelas temperaturas de 70 °C e 100 °C por 30 minutos, mas foi completamente perdida após autoclavagem a 121 °C por 20 minutos (Figure 3). Os resultados da sensibilidade da atividade antimicrobiana de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 ao tratamento térmico mostram que a bacteriocina é resistente ao calor. A resistência ao calor é uma característica comum de bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico (TAGG et al., 1976). Entretanto, bacteriocinas da classe III são consideradas sensíveis ao calor, e alguns autores têm isolado e caracterizado tais bacteriocinas (FRANZ et al., 1998; LEE e PAIK, 2001; MESSI et al., 2001). As bacteriocinas de bactérias lácticas pertencentes as classe I e II geralmente são pequenas,

estáveis ao calor e sensíveis a proteinases. Analisando algumas características da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, como forte atividade anti-*Listeria* e resistência ao calor, este resultado mostra que a atividade antimicrobiana de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 pode ser devida a uma nova bacteriocina da classe II.



**Figura 2.** Efeito da Catalase e proteases sobre o extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre *Listeria monocytogenes* 764/93.



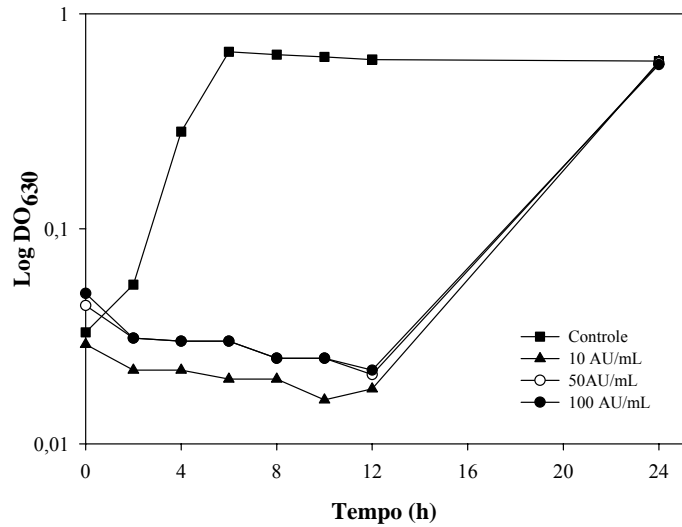
**Figura 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade do extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 verificada sobre *Listeria monocytogenes* 764/93.

### **3.4. Quantificação da atividade do extrato protéico bruto (EB)**

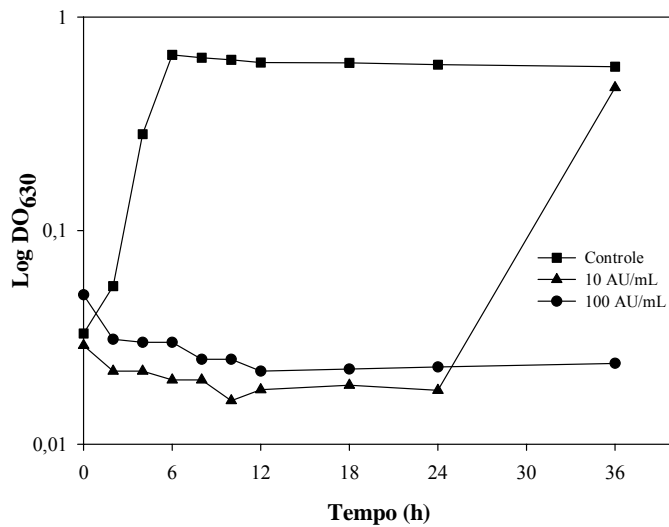
A atividade de inibição de *L. monocytogenes* 764/93 pelo EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, crescido em meio D-MRS a 30°C, foi quantificada. O resultado da atividade de inibição do EB sobre *L. monocytogenes* 764/93, pelo método de diluição, foi de 2.133,33 AU/mL. Esta atividade foi comparativamente bem menor do que a atividade de Bovicina HC5, em pH 2, encontrada por MANTOVANI e RUSSEL (2003) sobre *L. monocytogenes*, a qual foi de 25.600 AU/mL. MEGHROUS et al. (1999) verificaram que a atividade de Pediocina sobre *Listeria ivanovii* HW 28 foi de 16.400 AU/mL.

### **3.5. Inibição de *L. monocytogenes* 764/93 em meio líquido**

O efeito da substância inibidora produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre a viabilidade de *L. monocytogenes* 764/93 está ilustrado nas Figuras 4 e 5. Quando o inóculo inicial de *L. monocytogenes* 764/93 foi de aproximadamente  $10^6$  células/mL observou-se que o crescimento da cultura foi completamente inibido durante 12 horas de incubação quando concentrações de 10, 50 e 100 AU/mL do extrato protéico bruto (EB) foram adicionadas ao meio de cultura. Entretanto, o crescimento foi verificado com 24 horas de cultivo (Figura 4). Quando o inóculo inicial de *L. monocytogenes* 764/93 continha  $10^4$  células/mL e na presença da concentração de 10 AU/mL pode-se observar que o crescimento foi inibido durante 24 horas e após este período, *L. monocytogenes* 764/93 voltou a crescer. Na presença de 100 AU/mL nenhum crescimento foi verificado durante 36 horas de cultivo (Figura 5).



**Figura 4.** Efeito de diferentes concentrações do extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre o inóculo inicial de  $10^6$  células de *Listeria monocytogenes* 764/93 por mL, crescendo em meio TSB + 0,6% de extrato de levedura a 37 °C.



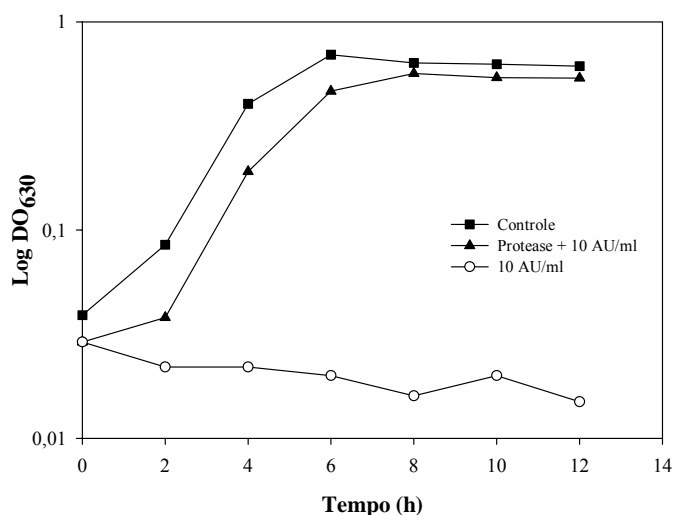
**Figura 5.** Efeito de diferentes concentrações do extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre o inóculo inicial de  $10^4$  células de *Listeria monocytogenes* 764/93 por mL, crescendo em meio TSB + 0,6% de extrato de levedura a 37 °C.

De acordo com esses resultados, ocorreu um aumento na fase lag de *L. monocytogenes* 764/93 quanto tratadas com 10 e 50 AU/mL do EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9. Resultado semelhante foi observado por GARCÍA et al. (2004) que verificaram a inibição de *L. monocytogenes* durante 6 horas de incubação e a retomada de crescimento com 24 horas quando tratada com concentrações de 5 e 10 AU/mL do extrato da bacteriocina Enterocina EJ97 produzida por *Enterococcus faecalis* EJ97. ATRITH et al. (2001) também observaram a inibição de *Listeria grayi* CP 6818 durante 6 horas de cultivo e a retomada do crescimento com 9 horas de cultivo quando tratadas com altas concentrações, como 320 e 1280 AU/mL do extrato bruto de *Lactobacillus plantarum* C19, o qual produz Plantaricina C19, uma bacteriocina da classe IIa.

*L. monocytogenes* é considerada um grande problema de segurança alimentar devido sua habilidade para crescer em temperaturas de refrigeração, tolerância a altas concentrações de NaCl e reduzida  $a_w$  como valores tão baixo quanto 0.90, além de que baixos números podem ser infecciosos para as pessoas susceptíveis. *L. monocytogenes* tem sido isolada de vários alimentos, incluindo salames fermentados (FARBER et al., 1993). O controle de bactérias patogênicas, especialmente *L. monocytogenes*, que são capazes de sobreviver a todas as barreiras da fermentação está na seleção de culturas lácticas *starter* com habilidade para produzir bacteriocinas (CAPLICE e FITZGERALD, 1999) e de culturas lácticas bioprotetoras, em produtos fermentados (TYÖPPÖNEM et al., 2002). Culturas bioprotetoras podem atuar como culturas *starter* no processo de fermentação de salames ou podem apenas proteger o produto sem causar nenhuma mudança em suas características organolépticas (De VUYST e VANDAMME, 1994).

Com o objetivo de determinar se a inibição do EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 contra *L. monocytogenes* 764/93 foi realmente devida à produção de bacteriocina, a protease de *Bacillus polymyxa* (5mg/ml) foi adicionada ao meio de cultivo contendo 10 AU/mL (Figura 6). A adição da Protease aboliu quase completamente a atividade de inibição e *L. monocytogenes* 764/93 cresceu exponencialmente, sugerindo que a inibição foi suspensa pela enzima adicionada.

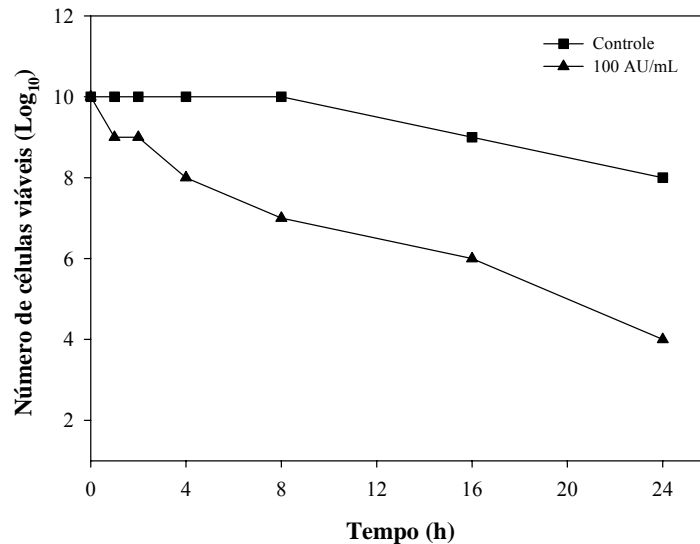
A inibição de  $10^6$  células/mL de *L. monocytogenes* também foi abolida quando Tripsina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionada no início da incubação de co-cultivo de *E. faecalis* e *L. monocytogenes* (GARCÍA et al., 2004). A sensibilidade a uma ou mais proteases de um princípio inibidor é considerado como indicador da natureza protéica desse composto (JACK et al., 1995).



**Figura 6.** Efeito da protease de *Bacillus polymyxa* sobre a atividade do extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 verificado sobre *Listeria monocytogenes* 764/93 crescendo em meio TSB + 0.6% de extrato de levedura a 37 °C.

### 3.6. Modo de ação

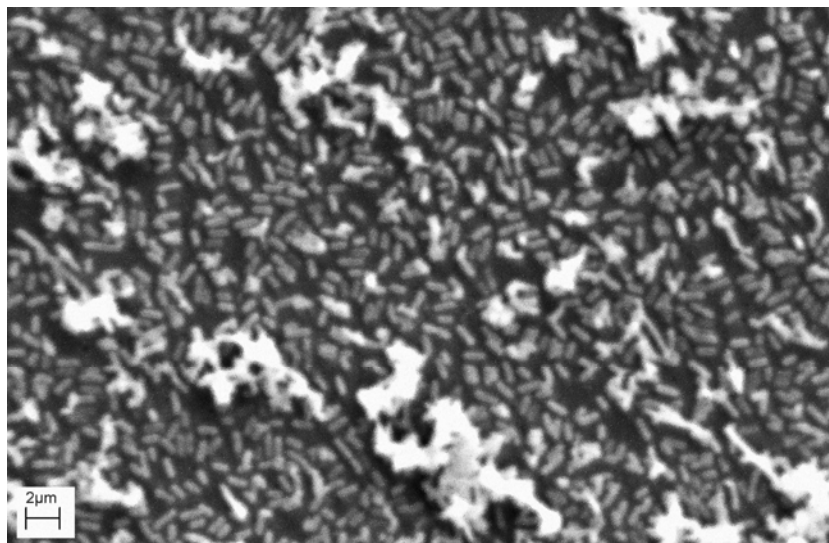
O efeito da substância inibidora de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre a viabilidade de *L. monocytogenes* 764/93 foi determinado e está mostrado na Figura 7. As células de *L. monocytogenes* 764/93 não tratadas com o EB mantiveram a viabilidade após 8 horas de incubação, diminuindo 2 ciclos log após 24 horas. Quando *L. monocytogenes* 764/93 foi exposta a 100 AU/ml do EB observou-se uma rápida redução na viabilidade já nas primeiras horas e o número de células viáveis após 24 horas foi  $10^4$  vezes menor do que o controle. Estes resultados demonstram que a bacteriocina teve um efeito bactericida sobre *L. monocytogenes* 764/93.



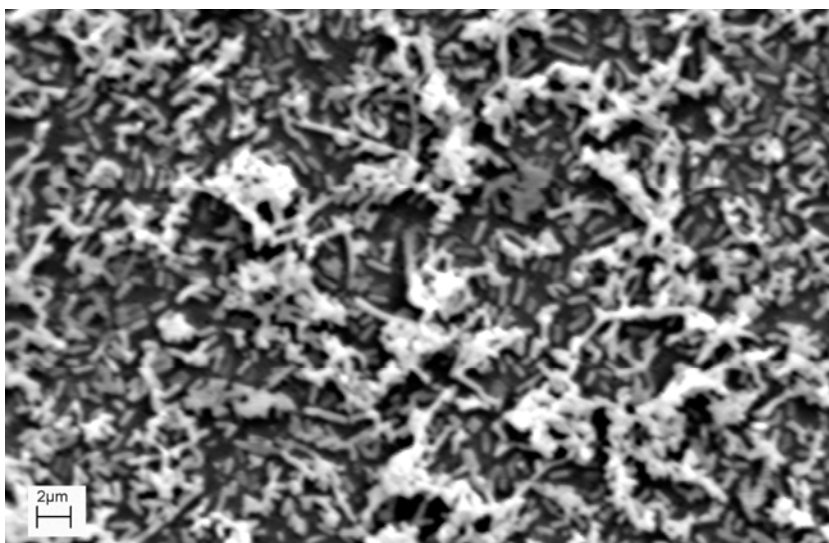
**Figura 7.** Atividade bactericida do extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre *Listeria monocytogenes* 764/93 em tampão fosfato citrato 20 mM, pH 5, a 37 °C.

A Figura 8 ilustra a análise de *L. monocytogenes* 764/93, não tratada e tratada com o EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, após 8 horas de incubação, por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 8A mostra as células de *L. monocytogenes* 764/93 não tratadas com o EB. Após tratamento com 100 AU/mL de EB, não foi possível observar grandes alterações na morfologia das células de *L. monocytogenes* 764/93 em relação às células controle (Figura 8B). Porém, algumas mudanças como a desorganização celular e uma alteração no formato das células são observadas. As células passam a apresentar-se de uma forma mais irregular. Entretanto, para obter mais informações sobre modificações morfológicas, como dano na parede celular ou na membrana e subsequente lise celular, este experimento deverá ser repetido, porém utilizando outra metodologia ou microscópio eletrônico que permita um aumento bem maior do que usado neste estudo. Entretanto, parece óbvia a ação deletéria produzida pelo EB da bacteriocina sobre este patógeno.

**A**



**B**



**Figura 8.** Micrografia eletrônica de *Listeria monocytogenes* 764/93 mantida em tampão fosfato citrato 20 mM, pH 5, a 37 °C por 8 horas. (A) células não tratadas; (B) células tratadas com 100 AU/mL do extrato protéico bruto (EB) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9. A,B = 5.000X.

O modo de ação das bacteriocinas pode ser definido como bactericida ou bacteriostático. As bacteriocinas formam poros na membrana plasmática e conseqüentemente ocorre permeabilização com perda de material intracelular como aminoácidos, potássio, fosfato inorgânico e ATP (MONTVILLE e CHEN, 1998). O efeito bactericida causa a morte celular enquanto o efeito bacteriostático leva apenas a inibição do crescimento celular (TAGG et al., 1976).

O modo de ação bactericida é similar ao modo de ação de algumas bacteriocinas como, Lactococina MMFII produzida por *Lactococcus lactis* MMFII (FERCHICHI et al., 2001) e Bovicina HC5 produzida por *Streptococcus bovis* HC5 (MANTOVANI e RUSSELL, 2003). Algumas bacteriocinas têm ação bacteriostática como, Plantaricina C19 produzida por *Lactobacillus plantarum* C19 (ATRITH et al., 2001) e a bacteriocina produzida por *Streptococcus thermophilus* 81 (IVANOVA et al., 1998). ATRITH et al. (2001) verificaram que o efeito bacteriostático de Plantaricina C19 é consistente com o fato de que não ocorreu dano na membrana celular e nem liberação de K<sup>+</sup> e de material intracelular que absorve luz ultravioleta.

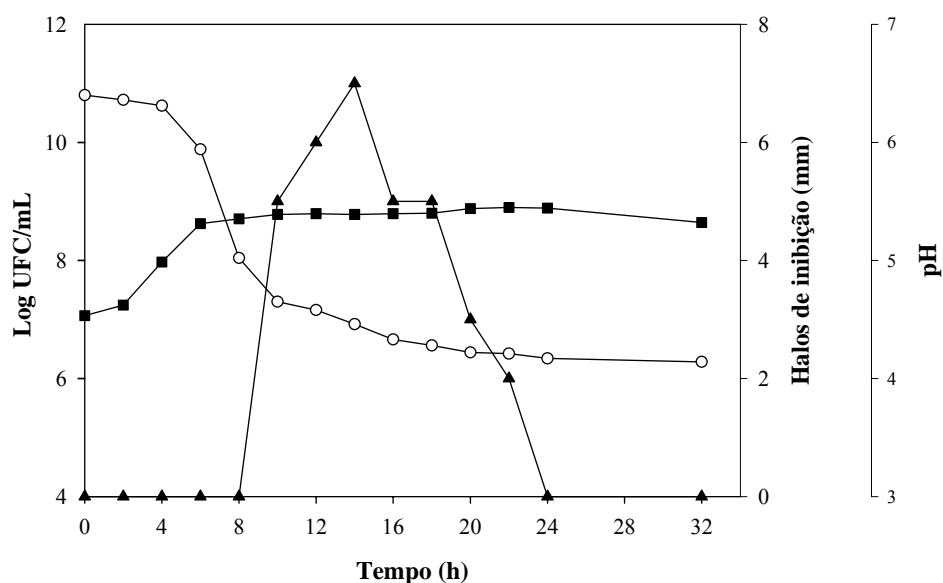
Entretanto, apenas a redução da viabilidade celular fornece pouca informação sobre o modo de ação da bacteriocina. Outros experimentos deverão ser realizados com *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 para estudar mais detalhadamente o modo de ação e verificar se alvo da bacteriocina é a membrana plasmática e se realmente ocorre a formação de poros na membrana e liberação de material intracelular.

### **3.7. Inibição de *L. monocytogenes* 764/93 em caldo de salame**

#### **3.7.1. Crescimento e atividade da bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em caldo salame**

A Figura 9 mostra o crescimento de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em caldo salame a 25 °C. A fase estacionária foi alcançada após aproximadamente 8

horas de crescimento atingindo uma população final de  $10^9$  células/mL. O estudo da atividade da bacteriocina em caldo salame também foi realizado à temperatura de 25 °C sob condições de pH não regulado e está ilustrado na Figura 9. A atividade de inibição foi detectada somente após 8 horas, quando a cultura já se encontrava em fase estacionária e o pico máximo de produção foi com 14 horas de cultivo e a atividade permaneceu no caldo salame até aproximadamente 22 horas. Ocorreu uma rápida redução no pH do meio nas primeiras horas e com 24 horas de cultivo o pH do caldo salame era de aproximadamente 4,2, indicando que *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi capaz de produzir ácido como no meio comercial. A atividade de bacteriocina foi iniciada quando o inóculo atingiu um nível maior, em torno de  $10^9$  células e o valor de pH era de aproximadamente 5.



**Figura 9.** Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 (■), pH (○) e halos de inibição (▲) produzidos pelo sobrenadante neutralizado, obtidos em diferentes estágios de crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em caldo salame a 25 °C, sobre *Listeria monocytogenes* 764/93, pelo método de difusão em ágar.

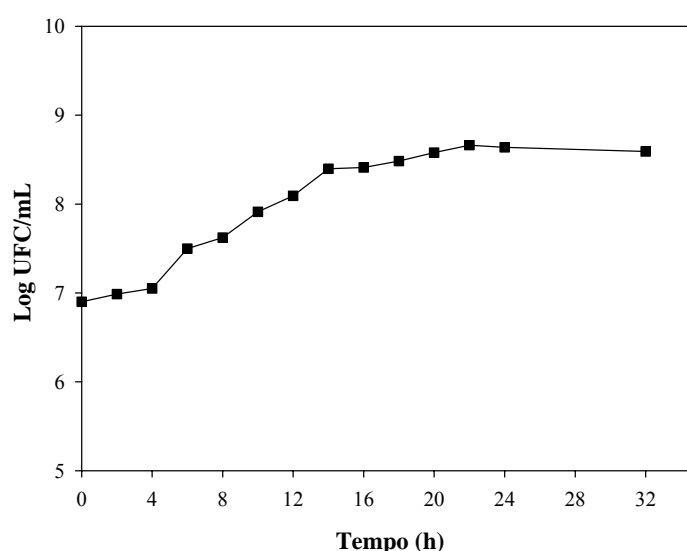
A diminuição da atividade da bacteriocina pode ser devido à degradação da bacteriocina por proteases presentes na carne ou à adsorção da bacteriocina a algum componente do meio durante o crescimento, uma vez que ocorre a precipitação do meio, impedindo que esta seja detectada. HOULIHAN et al (2005) observaram que Bovicina HC5 pode ser inativada por peptidase de *Streptococcus bovis* HC5. VIGNOLO et al. (1996) demonstraram que a inibição de *L. monocytogenes* por Lactocina 705 foi maior quando o caldo de carne foi submetido ao calor para inativar proteases.

A atividade de inibição da bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em caldo salame não foi muito alta e vários fatores podem ter interferido para isto acontecer como, a adição de NaCl e dos reagentes de cura nitrito e nitrato de potássio no caldo salame. A baixa atividade bacteriocinogênica é freqüentemente observada quando uma linhagem produtora de bacteriocina é adicionada ao alimento. LEROY e DE VUYST (1999) verificaram o efeito da adição de NaCl e nitrito de sódio ao meio MRS sobre a produção de bacteriocina de *Lb. sakei* CTC 494, linhagem com potencial para ser usada como cultura *starter* na fermentação de salame. Eles verificaram que o nitrito afetou a produção de bacteriocina porque diminuiu ligeiramente o crescimento celular, enquanto o sal teve efeito mais drástico, pois diminuiu o crescimento celular e a produção de bacteriocina. Experimentos realizados por VIGNOLO et al. (1995) mostraram que boa atividade da bacteriocina Lactocina 705 pode ser detectada com adição de 3% de NaCl e 0,02% de nitrito de sódio ao meio MRS.

Uma vez que *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi obtido de salame fermentado e é uma linhagem bem adaptada a este meio ambiente, esses resultados indicam que *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 é realmente capaz de crescer e produzir bacteriocina antilisterial na temperatura e em sistema que simula as condições de fermentação do salame.

### 3.7.2. Crescimento de *L. monocytogenes* 764/93 em caldo salame

Com o objetivo de verificar o comportamento de *L. monocytogenes* 764/93 em sistema que simula as condições do salame,  $10^7$  células de *L. monocytogenes* 764/93 foram adicionadas ao caldo salame. O crescimento desta linhagem onde o número de células viáveis aumentou de  $10^7$  células para aproximadamente  $10^9$  células dentro de 16 horas de cultivo, mostrou que uma vez presente na mistura de salame, *L. monocytogenes* 764/93 poderá ser capaz de sobreviver e multiplicar (Figura 10).



**Figura 10.** Crescimento de *Listeria monocytogenes* 764/93 em caldo salame a 25 °C.

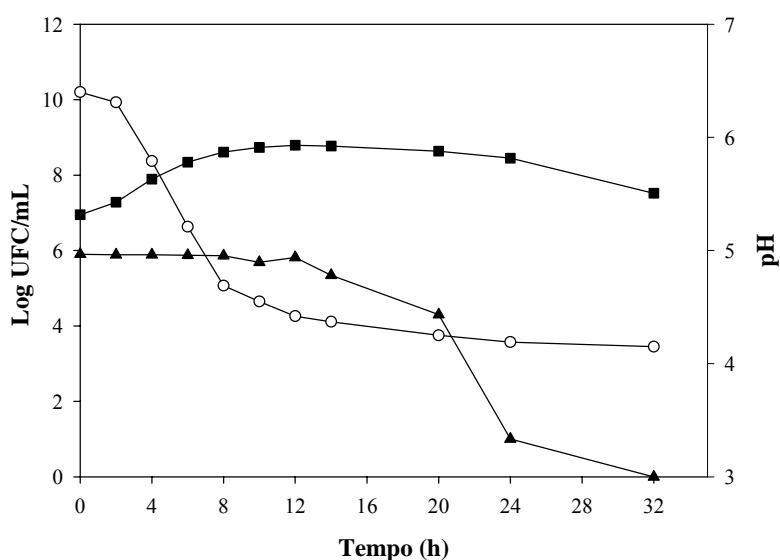
As concentrações de sal (3,0 %) e nitrito (120 ppm) usadas neste estudo, que estão entre as substâncias usadas para controlar o crescimento de bactérias na fermentação de salame, não inibiram o crescimento de *L. monocytogenes* 764/93. Isto indica que outros parâmetros devem ser aplicados para evitar o crescimento desse microrganismo indesejável quando presente em mistura para salame. JUNTILA et al. (1989) concluíram que a adição de nitrito e nitrato nos níveis

permissíveis não promove a eliminação de *L. monocytogenes*. E a atividade antimicrobiana do nitrito só pode ser conseguida com concentrações de NaCl acima de 3,0 % e pH inferior a 5,5 em temperaturas de refrigeração. Temperaturas mais elevadas podem diminuir os efeitos inibitórios do nitrito. Conseqüentemente, as temperaturas de fermentação dos embutidos, em torno de 25 °C, não são consideradas ótimas para o efeito bacteriostático do nitrito. As concentrações de sal e nitrito não podem ser elevadas devido ao fato de causar problemas de saúde e, portanto altos níveis não são permitidos em salames fermentados (LAHTI et al., 2001). O nível mais alto de nitrito de sódio permitido em salame na Europa é de 150 ppm (TYÖPPÖNEN et al., 2003). De acordo com a legislação brasileira nitrito pode ser adicionado na formulação de produtos fermentados como nitrito de sódio na quantidade máxima de 150 mg/kg ou nitrato na forma de nitrato de potássio (300 mg/kg) (Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998-SVS/MS).

A estratégia utilizada no processo de fermentação do salame de adicionar bactérias lácticas *starter* para acelerar a fermentação e causar um rápido abaixamento do pH pode eliminar vários microrganismos patogênicos, mas alguns são capazes de sobreviver, como por exemplo *L. monocytogenes*. O processo de fermentação e maturação do salame pode ser considerado um meio de reduzir, mas não eliminar *Listeria* (JOHNSON et al., 1990). Uma nova solução para diminuir o risco de listeriose causada por salames fermentados seria a introdução de uma cultura láctica *starter* ou uma cultura láctica bioprotetora no processo de fermentação do salame com capacidade de inibir *Listeria* e, possivelmente, outros microrganismos patogênicos. *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 apresenta resultados promissores nesse sentido.

### 3.7.3. Inibição de *L. monocytogenes* 764/93 em co-cultivo com *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em caldo salame

Os resultados obtidos no experimento de co-cultivo de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 e *L. monocytogenes* 7464/93 realizado em sistema que simula as condições do salame na temperatura de 25 °C estão ilustrados na Figura 11. O crescimento de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 não foi afetado pela presença de *L. monocytogenes* 764/93 no meio, comportando-se da mesma maneira quando cultivado como monocultura (Figura 9). *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 atingiu aproximadamente  $10^9$  células e entrou em fase estacionária após aproximadamente 10 horas de incubação.



**Figura 11.** Co-cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 (■) e *Listeria monocytogenes* 764/93 (▲) em caldo salame a 25°C e variação do pH (○).

O crescimento de *L. monocytogenes* 764/93 foi reprimido em cultura mista com *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9. O número de células em cultura pura atingiu  $10^9$  UFC/mL após aproximadamente 18 horas de incubação (Figura 10). Em co-cultivo com *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 o número inicial de  $10^6$  células

foi mantido até aproximadamente 12 horas de cultivo. Após este ponto, coincidentemente com a produção de bacteriocina que teve atividade máxima após 14 horas de cultivo (Figura 9), o número de células viáveis diminuiu gradativamente ao longo do período de incubação. Após 32 horas de incubação o número de células viáveis foi reduzido para menos que 10 UFC/mL equivalente a uma diminuição de 1.000.000 vezes em relação ao número inicial de células. Com 12 horas de cultivo, o pH era de aproximadamente 4,4 e ao final do experimento era de aproximadamente 4,2, portanto o pH não estaria envolvido na inibição de *L. monocytogenes* 764/93.

O efeito inibitório de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sobre *L. monocytogenes* 764/93 foi mostrado em condições que simulam o salame na temperatura de 25°C. *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 cresceu rapidamente suprimindo o crescimento de *L. monocytogenes* 764/93 por 12 horas e uma provável explicação seria a vantagem competitiva de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, pois ele apresenta maior taxa de crescimento e consegue utilizar, de melhor forma, a fonte de energia para crescer. Vários estudos têm mostrado que a microbiota indígena suprime o crescimento de patógenos provavelmente devido à vantagem competitiva para utilização de nutrientes (SAMELIS et al., 1998, VOLD et al., 2000). As bactérias o ácido láctico têm sido historicamente exploradas na fermentação de alimentos, principalmente devido a sua natureza competitiva (McMULLEN e STILES, 1996).

A evidência da produção de bacteriocina por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em caldo salame parece ser outro método para controlar o crescimento de *L. monocytogenes* 764/93 durante o co-cultivo. Os resultados indicam que a diminuição gradativa do número de células viáveis pode estar associada com a produção de bacteriocina. A inoculação de um número de células viáveis de *L. monocytogenes* maior do que é encontrado contaminando naturalmente o alimento foi utilizada como margem de segurança. O fato de a atividade da bacteriocina ter sido reduzida no caldo salame não afetou a inibição de *L. monocytogenes* 764/93.

A inibição de *L. monocytogenes* 764/93 em caldo salame provavelmente não foi devida ao pH, pois *L. monocytogenes* é capaz de multiplicar na faixa de pH de 4,1 a 9,6. *L. monocytogenes* é considerada um grande problema de segurança alimentar devido sua habilidade para crescer em temperaturas de refrigeração, tolerância a altas concentrações de NaCl, reduzida atividade de água como valores tão baixo quanto 0,90 e ampla faixa de pH (FARBER et al., 1993).

A adição de bactérias do ácido láctico bacteriocinogênicas em salames fermentados com atividade contra *L. monocytogenes* tem sido muito investigada. A utilização de *P. acidilactici* JD1-23, *P. acidilactici* PAC 1.0, *L. sake* CTC494 e *L. plantarum* MCS como agentes fermentadores resultou na diminuição do número de células viáveis de *L. monocytogenes* (BERRY et al., 1990, FOEGEDING et al., 1992, CAMPANINI et al., 1993, HUGAS et al., 1995). TYÖPPÖNEM et al., 2003 verificaram que *L. monocytogenes* foi totalmente eliminada de salame fermentado seco quando foram adicionadas culturas lácticas como *Lb. rhamnosus* LC 705, *Lb. rhamnosus* E-97800, *Lb. plantarum* ALC01C (cultura bioprotetora comercializada para ser efetiva contra *L. monocytogenes*) e *P. pentosaceus* RM2000 (cultura *starter* comercial). Este efeito também foi verificado por LAHTI et al. (2001) quando adicionaram no processamento do salame fermentado seco linhagens bacteriocinogênicas de *P. acidilactici* PA-2 e *L. bavaricus* MI-401. A aplicação de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M, como cultura protetora e produtora de bacteriocina em salame fermentado merguez, resultou na redução do crescimento de *L. monocytogenes* (BENKERROUM et al., 2003).

As bacteriocinas de bactérias do ácido láctico não devem ser vistas como o principal meio de conservação de alimentos. A boa higiene na criação e no abate dos animais e as boas práticas durante o processamento são os fatores chaves para prevenir a contaminação da carne por patógenos (LAHTI et al., 2001). O uso de bactérias do ácido láctico competitivas e bacteriocinogênicas na conservação de alimentos de modo geral pode ser considerado apenas mais uma barreira adicional aliada às boas práticas de processamento (HUGAS, 1998, O'KEEFFE e HILL, 1999).

## 4. CONCLUSÃO

*L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 obtido de salame tipo italiano, processado por fermentação natural, possui atividade antagonista contra linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de várias fontes e também contra várias linhagens de *S. aureus* obtidos de casos de mastite bovina subclínica.

A atividade de inibição não pode ser atribuída à produção de ácido ou de peróxido de hidrogênio, pois mesmo após a neutralização do sobrenadante e tratamento com catalase a inibição permaneceu. A substância inibidora foi inativada por enzimas proteolíticas, é resistente ao calor e tem ação bactericida contra *L. monocytogenes*, portanto pode ser considerada uma bacteriocina. Considerando a característica marcante da atividade anti-*Listerial* e resistência ao calor, podemos posicionar esta bacteriocina na classe II (< 10 kDa, estáveis ao calor, sensíveis a proteases, capacidade de formar agregados), particularmente na classe IIa onde se incluem as semelhantes às Pediocinas que possuem forte atividade antilisterial.

*L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi capaz de crescer e produzir bacteriocina em meio que simulou as condições do salame. Isto sugere que, sendo uma bactéria láctica da microbiota de salame fermentado, *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 poderá ser utilizado como cultura *starter* ou protetora para controlar microrganismos patogênicos, principalmente *L. monocytogenes*, na fermentação de salames e garantir a segurança do produto. Estudos ainda serão necessários para verificar a atividade de inibição *in situ* e para analisar se a adição de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 não afeta as propriedades sensoriais do produto fermentado e não seja capaz de inibir crescimento de outras culturas *starter* geralmente utilizadas. A utilização de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 como cultura *starter* visando a uma possível inibição de *L. monocytogenes* *in situ* na fermentação de salames poderá vir a ser de interesse biotecnológico para permitir maior segurança no consumo destes produtos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATRIH, A., REKHIF, N., MOIR, A. J. G., LEBRIHI, A., LEFEBVRE, G. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 68, p. 93-104, 2001.
- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 28, p. 169-185, 1995.
- AYMERICH, M. T., HUGAS, M., MONFORT, J. M. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Sci. Technol. Int.**, v. 4, n. 3, p. 141-158, 1998.
- BACUS, J. N., BROWN, W., L. Use of microbial cultures: meat products. **Food Technol.**, v. 35, n. 1, p. 74-78, 1981.
- BAHK, J., MARTH, E. H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne disease**, Califórnia: Academic Press Inc., 1990. p. 247-257.
- BERRY, E. LIEWEN, M., MANDIGO, R. HUTKINS, R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. **J. Food Prot.**, v. 53, p. 194-197, 1990.
- BENKERROUM, N., DAOUDI, A., KAMAL, M. Behavior of *Listeria monocytogenes* in raw sausage (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective culture. **Meat Science**, v. 63, p. 479-484, 2003.
- BREDHOLT, S., NESBAKKEN, T. AND HOLCK, A. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-package meats. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 66, p. 191-196, 2001.
- CAMPANINI, M., PEDRAZZONI, I., BARBUTI, S., BALDINI, P. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially

contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 20, p. 169-175, 1993.

CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, n.(1-2), p. 131-149, 1999.

CINTAS, L. M., RODRÍGUEZ, J. M., FERNÁNDEZ, M. F., SLETTEN, K., NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E., HOLO, H. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2643-2648, 1995.

De PAULA, R. A. **Atividade inibidora em bactérias lácticas e produção de bacteriocinas.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 47p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

De VUYST, L., VANDAMME, E. J. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* strain: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De VUYST, L., VANDAMME, E. J. (Ed). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application**, London: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 151-221.

FARBER, J., PETERKIN, P. *Listeria monocytogenes*, a food pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476-511, 1991.

FARBER, J. M., DAKEY, E., HOLLEY, R., USBORNE, W. R. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of uncooked German, American and Italian style fermented sausage. **Food Microbiol.**, v. 10, p. 123-132, 1993.

FAYE, T., LANCSRUD, T., NES, I. F., HOLO, H. Biochemical and genetic characterization of Propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoeni*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n.10, p. 4230-4236, 2000.

FERCHICHI, M., FRÈRE, J., MABROUK, K., MANAI, M. Lactococcin MMFII, a class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII isolated from a Tunisian dairy product. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 205, p. 49-55, 2001.

FOEGEDING, P. THOMAS, A., PILKINGTON, D. KLAENHAMMER, T. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin

- during dry fermented sausage production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 884-890, 1992.
- FRANZ, C. M. A. P., DU TOIT, M., OLASUPO, N. A., SCHILLINGER, U., HOLZAPPEL, W. H. Plantaricin D, a bacteriocin-produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 ready-to-eat salad. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 231-235, 1998.
- GARCÍA, M. T., CANAMERO, M. M., LUCAS, R., OMAR, N. O., PULIDO, R. P., GÁLVEZ, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 90, p. 161-170, 2004.
- GERHARDT, P. MURRAY, R. G. E., WOOD, W. A. KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington, D. C.: American Society Microbiology, 1994. p. 512-554.
- HAMMES, W. P., WEISS, N., HOLZAPPEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALOWS, A., TRUPER, H. G., DWORKIN, M. et al. **The prokaryotes**, 2 ed., New York: Springer-Verlag, 1992. v. 2, p. 1535-1594.
- HERRANZ, C., CASAUS, P., MUKHOPADHYAY, S., MARTÍNEZ, J. M., RODRÍGUEZ, J. M. NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E., CINTAS, L. M. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 115-131, 2001.
- HOULIHAN, A. J., MANTOVANI, H. C., RUSSEL, J. B. Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 231, p. 27-32, 2004.
- HOOVER, D. G., HARLANDER, S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In. HOOVER, D. G., STEENSON, L. R. (Eds.). **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. California: Academic Press Inc., 1993. p. 23-39.
- HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 29, suppl. 1, p. s139-150, 1998.

- HUGAS, M., GARRIGA, M., AYMERICH, T., MONFORT, J. M. Inhibition of *Listeria* in dry sausage by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. **J. Appl. Microbiol.**, v. 79, p. 322-330, 1995.
- 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.
- JACOBSEN, T., BUDDE, B. B., KOCH, A. G. Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 242-249, 2003.
- JACK, R. W., TAGG, J. R. RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.
- JAY, J. M. Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. **Meat Science**, v. 43, p. S59-S66, 1996a.
- JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, p. 209-214, 1996b.
- JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P., CASSES, 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.
- JUNTILA, J., HIRN, J., HILL, P., NURMI, E. Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacturing of fermented sausage. **J. Food Prot.**, v.52, p. 158-161, 1989.
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 39-86, 1993.
- LAHTI, E., JOHANSSON, T., HONKANEN-BUZALSKI, T., HILL, P. AND NURMI, E. Survival and detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 75-85, 2001.
- LEE, N. K., PAIK, H. D. Partial characterization of lactacin NK 24 a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK 24 isolated from Jeot-gal. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 17-24, 2001

- LUCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.
- LEROY, F, DE VUYST, L. The presence of SALT and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 12, p. 5350-5356, 1999.
- MACIEL, J. F. **Atividade antibacteriana de culturas lácticas isoladas de salame tipo italiano processado por fermentação natural**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MANTOVANI, H.C., RUSSEL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 89, p. 77-83, 2003.
- MARTINS, J., LUCHESE, R. Lactic acid fermentations of meat in Brazil. In: FOO, E. L., GRIFFIN, H. G., MÖLLBY, R., HEDÉN, C. G. **The Lactic Acid Bacteria**. England: Horizon Scientific Press, 1993, p. 43-46.
- McMULLEN, L. M., STILES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **J. Food Prot.**, Suppl., p. 64-71, 1996.
- MEGHROUS, J., LACROIX, C., SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. **Food Microbiol.**, v. 16, p. 105-114, 1999.
- MESSI, P., BONDI, M., SABIA, C., BATTINI, R., MANICARDI, G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 64, p. 193-198, 2001.
- METAXOPOULOS, J., GENIGEORGIS, C., FANELLI, M. J., FRANTI, C., COSMA, E. Production of italian dry salami: effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 863-871, 1981.

- MONTVILLE, T. J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 511-519, 1998.
- NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRURBERG, M. B., EIJSINK, V., HOLO, H. R. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 113-128, 1996.
- NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G., CAUGANT, D. A. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. **Food Microbiol.**, v. 31, p. 161-171, 1996.
- O'KEEFFE T., HILL, C. Bacteriocins potential in food preservation. <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/bacteriocins.doc> -1999.
- PAPAMONOLI, E., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotics properties. **Meat Science**, v. 65, p. 859-867, 2003.
- REZENDE, P. R. **Caracterização de *Listeria monocytogenes* por análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 53p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- RODRÍGUEZ, J. M., CINTAS, L. M., CASAUS P., DODD, H. M. HERNÁNDEZ, P. E., GASSON, M. J. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausage. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 109-115, 1995.
- ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 79, p. 3-16, 2002.
- SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., VLASSI, M., PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 44, p. 69-82, 1998.
- SAMESHIMA, T., MAGOME, C., TAKESHITA, K., ARIHARA, K., ITOH, M., KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 41, p. 1-7, 1998.

- SCHEUSNER, D. L., HARMON, L. G. Growth and enterotoxin production by various strains *Staphylococcus aureus* in selected foods. **J. Food Science**, v. 38, p. 474-476, 1973.
- SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trench in Food Sci.Technol.**, v. 7, p. 158-164, 1996.
- SMITH, J. L., BUCHANAN, R. L., PALUMBO, S. A. Effects of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. **J. Food Prot.**, v. 46, p. 545-555, 1983.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.
- TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 78, p. 31-41, 2002.
- TYÖPPÖNEN, S., PETÄJÄ, E., MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 83, n. 3, p. 233-244, 2002.
- VARABIOFF, Y. Incidence of *Listeria* in small goods. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 14, p. 167-169, 1992.
- VIGNOLO, G. M., KAIRUZ, M. N., RUIZ HOLGADO, A. A. P., OLIVER, G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 5-10, 1995.
- VIGNOLO, G.; PALACIOS, J.; FADDA, S.; KAIRUS, M. R.; HOLGADO, R. A., OLIVER G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 29, p. 397-402, 1996.
- VOLD, L., HOLCK, A., WASTESON, Y., NISSEN, H. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* 0157:H7 in ground beef. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, p. 219-225, 2000.

## **CAPÍTULO 4**

**Purificação parcial e caracterização de bacteriocina de  
*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 isolado de salame tipo italiano**

## 1. INTRODUÇÃO

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas extracelulares com variado espectro de atividade produzidos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e capazes de inibir vários microrganismos deterioradores e patogênicos. Em todos os casos, a célula produtora apresenta imunidade específica à ação de sua própria bacteriocina (O'KEEFFE e HILL, 1999). Muitas bactérias do ácido láctico produzem bacteriocinas com amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas (KLAENHAMMER, 1988).

KLAENHAMMER (1993) agrupou as bacteriocinas de bactérias do ácido láctico em 4 classes com base em suas características químicas, estruturais e funcionais. Bacteriocinas da classe I, denominadas lantibióticos, são menores que 5 kDa, contêm aminoácidos incomuns, tais como lantionina e metilantionina, resultantes de modificação pós-tradução. Nisina é a principal representante desta classe (AYMERICH et al., 1998). A classe II compreende pequenas bacteriocinas com massa molecular abaixo de 10 kDa, resistentes ao calor e que não contêm aminoácidos modificados pós-tradução. É dividida em 3 subclasses a, b e c. A classe IIa compreende bacteriocinas com forte similaridade na seqüência de aminoácidos, particularmente na parte N-terminal (YGNGVxC) e com atividade antilisterial. Este grupo contém cerca de 16 bacteriocinas, sendo que Pediocina PA-1 foi a primeira a ser identificada e vem sendo mais bem estudada. Bacteriocinas da classe IIb dependem de 2 peptídeos com atividade complementar para atividade ótima ou para inibir bactérias sensíveis. Bacteriocinas pertencentes à classe IIc incluem aquelas que são secretadas pelo sistema de transporte *sec*-dependente (CLEVELAND et al., 2001). Na classe IId estão agrupadas as bacteriocinas que não se incluem em nenhum sub-grupo anterior (CINTAS et al., 2001). Bacteriocinas da classe III são constituídas de proteínas grandes, com peso molecular acima de 30 kDa e sensíveis ao calor. Nesta classe incluem-se Helveticina J e Enterolisina (O'SULLIVAN et al.,

2002). A quarta classe é formada por bacteriocinas constituídas de uma mistura indefinida de proteínas, lipídeos e carboidratos (STILES, 1996).

Como a maioria das bacteriocinas tem baixo peso molecular, o alvo principal é a membrana citoplasmática das células sensíveis. Na membrana citoplasmática elas são capazes de ligar-se a receptores específicos ou não, inserir-se na membrana e formar agregados, resultando na formação de poros, por onde a célula perde material intracelular (ABEE et al., 1995, MONTVILLE e CHEN, 1998; MOLL et al., 1999, ENNAHAR et al., 2000).

Bactérias Gram-positivas diferem quanto à sensibilidade as bacteriocinas devido a diferenças na composição e na fluidez da membrana. Bactérias Gram-negativas são protegidas pela membrana externa, a qual previne bacteriocinas e a maioria de compostos com peso molecular acima de 600 Daltons de alcançarem a membrana citoplasmática (ABEE et al., 1995).

Os genes para produção de bacteriocinas estão geralmente organizados em operons nos quais o gene estrutural codifica a pré-bacteriocina; segue-se o gene de imunidade, cujo produto confere proteção à célula produtora contra sua própria bacteriocina; os genes que codificam proteínas de transporte e outro que codifica uma proteína acessória essencial para a externalização da bacteriocina completam o operon. Para a expressão de algumas bacteriocinas, há necessidade de genes adicionais relacionados à regulação da transcrição e à modificação pós-tradução. Várias revisões tratam da organização genética desses operons (NES et al., 1996; ENNAHAR et al., 2000; CLEVELAND et al., 2001; McAULIFFE et al., 2001; GARNEAU et al., 2002; CHEN e HOOVER, 2003).

A maioria das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus* pertence à classe I e à classe IIb. Atualmente, a bacteriocina Lactococina MMFII produzida por *Lactococcus lactis* MMFII é a única que pertence à classe IIa (FERCHICHI et al., 2001). Entre as bacteriocinas de *Lactococcus*, nisina é a mais bem caracterizada e apresenta atividade inibidora contra muitas bactérias do ácido láctico e bactérias Gram-positivas como *Clostridium* e *Bacillus* (DAESCHEL, 1989; DESMAZEAUD, 1996). Nisina é produzida por *L. lactis*, tem peso molecular de 3777 Da, é codificada em um transposon de 68 Kbp, em plasmídeos

de algumas espécies e no cromossomo de outras (AYMERICH et al., 1998). Nisina é a única bacteriocina considerada GRAS (Generally Recognized As Safe) para uso direto em alimentos; é considerada não tóxica e de natureza não alergênica (FEDERAL REGISTER, 1988). Tem longa história de uso em alimentos em pelo menos 48 países, e foi aprovada como ingrediente de preservação em queijos frescos e processados, alimentos enlatados, vegetais processados e alimentos para bebês, dentre outros, sendo mais estável em alimentos de acidez mais alta. Os níveis de nisina usados variam de 2,5 a 100 mg/Kg (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). A legislação brasileira permite o uso de nisina em queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/Kg (Portaria DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996). Em produtos cárneos, o uso de nisina não tem tido muito sucesso devido à sua baixa solubilidade, distribuição desigual e falta de estabilidade (AYMERICH et al., 1998).

Outras bacteriocinas de bactérias do ácido láctico com possível aplicação em alimentos têm sido avaliadas, tais como pediocina produzida por linhagens de *Pediococcus acidilactici* (STILES, 1996; MONTIVILLE e CHEN, 1998; CLEVELAND et al., 2001).

Uma alternativa à introdução da bacteriocina purificada em alimentos é o uso de bactérias lácticas bacteriocinogênicas as quais produzam bacteriocinas *in situ* que, juntamente com outras técnicas de conservação, poderão prolongar a vida de prateleira de produtos alimentícios e também garantir segurança microbiológica (SCHILLINGER et al., 1996; AYMERICH et al., 1998; O'SULLIVAN et al., 2002).

Quando uma substância inibidora é classificada como uma nova bacteriocina é de grande importância realizar sua caracterização. A caracterização depende da purificação e determinação da seqüência de aminoácidos do peptídeo e/ou seqüência de nucleotídeos correspondente ao gene estrutural (SCHILLINGER e HOLZAPFEL, 1996; CAROLISSEN-MACKAY et al., 1997).

Neste trabalho foram estudados o isolamento e caracterização parcial da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos

A bactéria láctica produtora de bacteriocina, *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, usada neste estudo foi isolada de salame tipo italiano processado por fermentação natural e cultivada a 30 °C por 16 horas em meio D-MRS (HAMMES et al., 1992).

O microrganismo indicador *Micrococcus luteus* ATCC 10240 usado para os testes de atividade de inibição foi cultivado em meio básico (peptona 10 g/L, glicose 10 g/L, NaCl 5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L, extrato de carne 8 g/L, extrato de levedura 4 g/L) e incubado em Incubator Shaker Series 25 D New Brunswick, a 30 °C por 18 horas a 180 rpm/minutos.

### 2.2. Crescimento e produção de bacteriocina por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9

Para estudar a relação entre o crescimento de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 e sua atividade bacteriocinogênica, 7 mL de uma cultura ativa foram inoculados em 350 mL de meio D-MRS e incubados a 30 °C. O crescimento foi acompanhado durante 48 horas e em intervalos de tempo pré-determinados alguns parâmetros foram analisados como: contagem de células viáveis, pH e atividade de inibição.

Para a contagem de células viáveis, diluições seriadas da cultura foram feitas em solução salina 0,85% e plaqueadas em ágar D-MRS. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Para a determinação do pH e da atividade da bacteriocina, 5 mL da cultura foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos e o sobrenadante coletado. O pH do sobrenadante foi verificado em pH meter accumet<sup>®</sup> modelo 15. Após

esta etapa, o sobrenadante foi neutralizado para pH 6,5 com NaOH 5 M, filtrado em membrana Millipore 0,20 µm e a atividade presente no sobrenadante foi quantificada.

### **2.3. Quantificação da atividade da bacteriocina**

A atividade da bacteriocina foi quantificada pelo método de diluição onde diluições seriadas das amostras (200 µL) foram feitas em meio D-MRS com incrementos de 2 vezes e 30 µL de cada diluição foram adicionados em orifícios feitos em placas com 20 mL de ágar contendo aproximadamente  $10^5$  células/mL de *M. luteus* ATCC 10240. As placas foram mantidas em geladeira por 12 horas para difusão e posteriormente incubadas a 37 °C para crescimento do microrganismo indicador. A atividade antimicrobiana (expressas em unidade arbitrária por mL – AU/mL) foi calculada a partir da recíproca de maior diluição que apresentou halo de inibição de 5 mm (HOOVER e HARLANDER, 1993).

### **2.4. Obtenção do extrato protéico bruto (EB)**

*L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi cultivado em caldo D-MRS a 30 °C por 16 horas e a cultura foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 5 °C e o sobrenadante foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio 60% (Sigma) por 2 horas em gelo. A preparação foi centrifugada a 20.000 g por 30 minutos a 5 °C, o sedimento foi ressuspensionado em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5 e submetido à diálise. Para diálise utilizou-se membrana de ponto de corte de 1.000 Daltons e a diálise ocorreu contra 2 L do mesmo tampão por 24 horas, com troca de tampão a cada 8 horas.

## **2.5. Efeito do pH sobre a atividade da bacteriocina**

O efeito do pH sobre a estabilidade da bacteriocina do EB foi avaliado ajustando-se com HCl ou NaOH, 3 mL do EB para valores de pH que variaram de 2 a 11. As amostras foram filtradas em membrana Millipore 0,20 µm e incubadas a 4 °C por 2 horas. A atividade da bacteriocina foi quantificada em cada amostra pelo método de diluição (HOOVER e HARLANDER, 1993) utilizando *M. luteus* ATCC 10240 como microrganismo indicador.

## **2.6. Estabilidade físico-química da atividade do extrato protéico bruto (EB)**

Para verificar a estabilidade físico-química da bacteriocina, amostras do EB foram ajustadas para pH 5 em tampão acetato de sódio 20 mM antes de cada tratamento. Os tratamentos utilizados foram: tratamento térmico, liofilização, congelamento/descongelamento e temperatura de estocagem.

Para verificar a estabilidade ao calor, alíquotas do EB foram submetidas às temperaturas de 80 °C por 2 horas, 98 °C por 30 minutos ou 121 °C por 20 minutos.

O efeito da liofilização também foi verificado liofilizando 1 mL do EB por 24 horas em liofilizador (Modelo VR-1, HETO Lab equipment A/S Dinamarca).

Para verificar a estabilidade da bacteriocina ao tratamento de congelamento /descongelamento utilizou-se 1 mL do EB o qual foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em gelo. Este procedimento repetiu-se por 5 vezes e em cada etapa de descongelamento a atividade da bacteriocina foi quantificada.

A sensibilidade do EB a diferentes temperaturas de estocagem foi avaliada. Alíquotas de 1 mL do EB foram estocadas a -80 °C, -20 °C, 5 °C e à temperatura ambiente por 6 meses. A atividade da bacteriocina foi quantificada a cada 2 meses.

Após cada tratamento, a atividade da bacteriocina foi quantificada em cada amostra pelo método de diluição (HOOVER e HARLANDER, 1993) utilizando *M. luteus* ATCC 10240 como microrganismo indicador.

## **2.7. Purificação da bacteriocina**

A purificação da bacteriocina foi realizada usando procedimentos esquematizados na Figura 1. Em todas as etapas de purificação os produtos do fracionamento foram analisados por espectrofotometria ( $A_{280}$  nm). Foi determinada a concentração total de proteínas pelo método de Bradford e a atividade foi medida pelo método de diluição (HOOVER e HARLANDER, 1993) utilizando *M. luteus* ATCC 10240 como microrganismo indicador.

### **2.7.1. Preparo da amostra e fracionamento com sulfato de amônio**

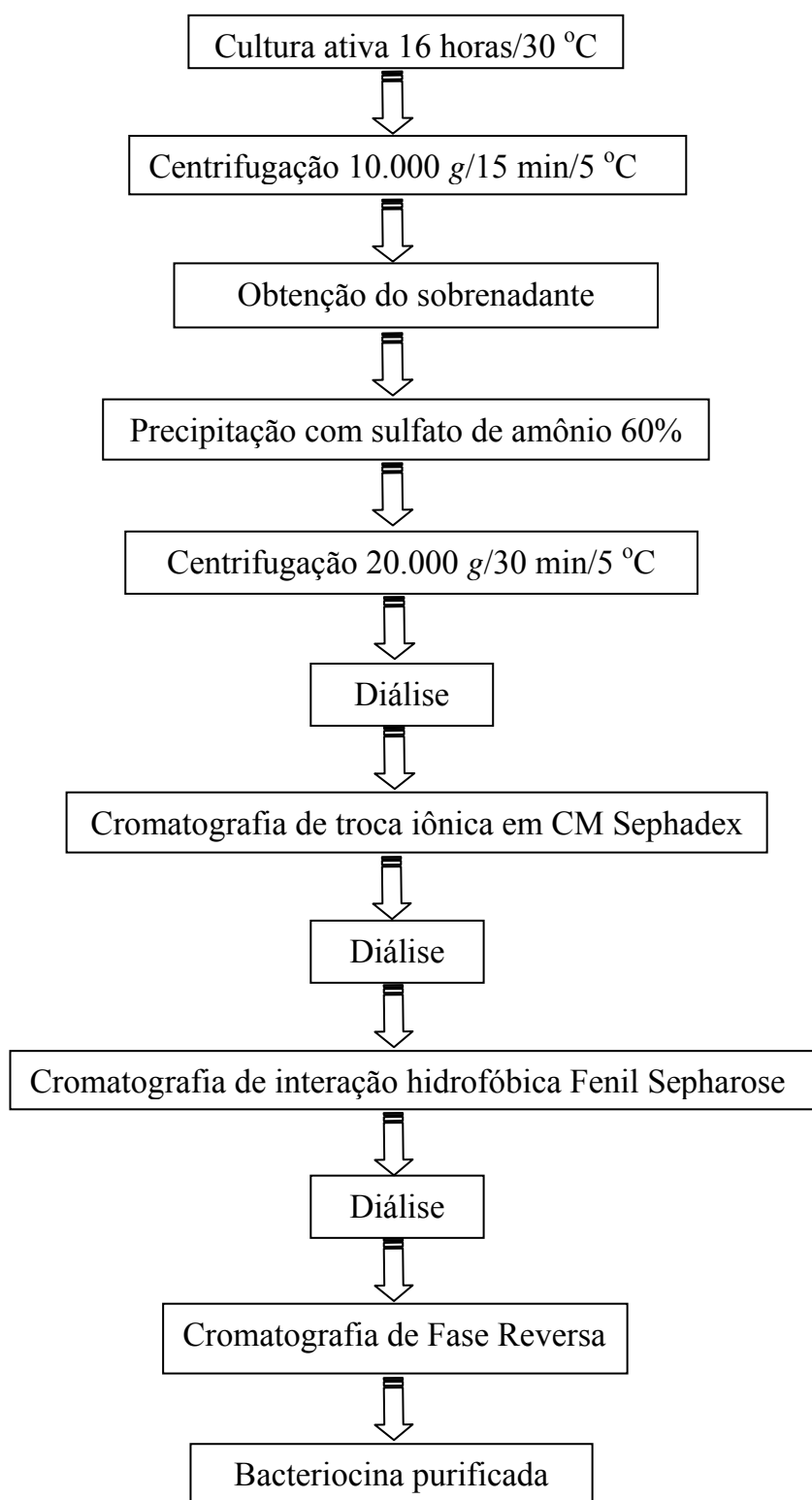
*L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi cultivado em 500 mL de caldo D-MRS a 30 °C por 16 horas, foi realizada a centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 5 °C e o sobrenadante foi coletado. As proteínas presentes no sobrenadante foram submetidas ao fracionamento com sulfato de amônio 60% (Sigma) por 2 horas em gelo. Após o fracionamento, a preparação foi centrifugada a 20.000 g por 30 minutos a 5 °C; o sedimento foi ressuspendido em 100 mL de tampão acetato sódico 20 mM pH 5, e submetido à diálise. Para diálise utilizou-se membrana de ponto de corte de 1.000 Daltons e a diálise ocorreu contra 2 L do mesmo tampão por 24 horas, com troca de tampão a cada 8 horas. Após diálise, a solução de proteínas foi aplicada em coluna de troca iônica.

### **2.7.2. Separação em coluna de troca iônica**

A amostra obtida após fracionamento com sulfato de amônio foi submetida à cromatografia de troca iônica. Foram aplicados 10 mL em coluna (10,0 cm x 3,0 cm) de Carboxi Metil C-50 Sephadex (Pharmacia) equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5. As proteínas foram eluídas a 8 °C a um fluxo de 40 mL/hora com gradiente linear crescente formado com 250 mL do tampão acetato de sódio 20 mM pH 5 e 250 mL do mesmo tampão contendo NaCl 1 M e frações de 3 mL foram coletadas. As frações eluídas que inibiram o microrganismo indicador foram agrupadas, dialisadas contra água desionizada e liofilizadas.

### **2.7.3. Separação em coluna de interação hidrofóbica**

As soluções de proteínas, eluídas da coluna de troca iônica, foram ressuspensas em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5, contendo sulfato de amônio 1 M e 6 mL foram aplicados em coluna de Fenil Sepharose (equilibrada com o mesmo tampão em que a amostra foi ressuspensa). A eluição ocorreu a um fluxo de 40 mL/hora, a 8 °C, com gradiente linear decrescente formado com 50 mL do tampão acetato de sódio 20 mM pH 5 contendo sulfato de amônio 1 M e 50 mL do tampão acetato de sódio 20 mM pH 5, e frações de 1 mL foram coletadas. As frações que inibiram o microrganismo indicador foram agrupadas, dialisadas contra tampão acetato de sódio 20 mM pH 5, liofilizadas e ressuspensas em 7 mL do mesmo tampão.



**Figura 1.** Esquema das etapas de purificação da bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9.

#### **2.7.4. Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase-reversa**

As frações com atividade bacteriocinogênica obtidas da coluna de interação hidrofóbica foram submetidas à cromatografia de fase reversa em coluna C18 Shimadzu Shim-pack CLS ODS (4,6 mm x 25 cm) equilibrada com a solução A (ácido trifluoracético 0,1% v/v em água desionizada) e lavada 3 vezes com a solução B (acetonitrila 100% + ácido trifluoracético 0,1%). Cinco aplicações de 200 µL da fração ativa foram injetadas na coluna e a bacteriocina foi eluída com gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrila + TFA 0,1% num fluxo de 1 mL/min. Utilizou-se o seguinte programa: 0 a 10 minutos solução A, 40 minutos solução B (gradiente de 0-100%). As frações eluídas foram monitoradas no comprimento de onda de 280 nm, coletadas manualmente, liofilizadas e testadas quanto à atividade antimicrobiana. A atividade de inibição foi determinada pelo método de difusão em ágar segundo TAGG et al. (1976) com algumas modificações utilizando *M. luteus* ATCC 10240 como microrganismo indicador. As frações ativas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

#### **2.8. Determinação do teor de proteína**

O teor de proteína na amostra foi quantificado pelo método de Bradford conforme descrito por DANIELS et al. (1994). Volumes de 0 a 100 µL das amostras foram misturados com 2,5 mL do reagente de Bradford (1X) e a absorvância foi determinada a 595 nm. Uma curva padrão foi construída com concentrações de 0 a 100 µg de albumina sérica bovina (BSA).

Para o preparo do reagente de Bradford cinco vezes concentrado (5X), dissolveram-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95% e adicionaram-se 100 mL de ácido fosfórico 85%. A mistura foi deixada sob agitação e, após solubilização, o volume foi completado para 200 mL e a mistura foi filtrada em papel Whatman nº 1.

## **2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada conforme descrito por ALFENAS et al. (1998), tendo sido preparados o gel concentrador de 5% e o gel separador de 20%. Os géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30% (p/v), tampão Tris/HCl 1.5 mol/L, pH 8.8 para o gel separador e tampão Tris/HCl 0.5 mol/l, pH 6.8, para o gel concentrador, persulfato de amônio 10% (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) e, N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). As amostras submetidas à eletroforese foram adicionadas ao tampão da amostra desnaturante 2 vezes concentrado (2,5 mL de Tris/HCl 0,5 M pH 6,8, 2 mL de SDS 10%, 2 mL de glicerol, 500 µL de β-mercaptoetanol e 400 µL de azul de bromofenol 2%, água desionizada q.s.p 10 mL), fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel. O marcador de massa molecular utilizado foi de ampla faixa, de 10 a 220 kDa, da Invitrogen. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, a 120 V, por 4 horas.

## **2.10. Coloração do gel de eletroforese**

As proteínas presentes no gel foram reveladas por dois métodos: Coomassie Blue R-250 ou por prata. A coloração por Coomassie foi feita submetendo o gel à solução corante (Coomassie Blue R-250 0,025%, etanol 50%, ácido acético 10%,) por 16 horas e em seguida o gel foi transferido para a solução descorante (etanol 25%, ácido acético 10%) até a visualização das bandas de proteínas. A coloração por prata foi realizada conforme procedimento descrito por LAEMMLI (1970). Após corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução pré-fixadora I (etanol 50%, ácido acético 7,5%) por 1 hora, em seguida foi transferido para a solução pré-fixadora II (etanol 5%, ácido acético 7,5%) por 30 minutos. O gel foi lavado com água destilada por dez minutos e transferido para a solução fixadora (glutaraldeído 10%) por 30 minutos. Em

seguida, o gel foi lavado exaustivamente com água destilada durante 1 hora, com troca da água destilada a cada 5 minutos. Posteriormente, o gel foi submetido à solução de prata amoniacal por 20 minutos. A solução de prata amoniacal foi preparada da seguinte forma: solução A -15 mL de NaOH 0,36% (p/v) e 0,5 mL de hidróxido de amônio; solução B - 0,3 g de AgNO<sub>3</sub> em 5 mL de água destilada. A solução B foi titulada na solução A e o volume completado para 50 mL. Em seguida, o gel foi novamente lavado durante 25 minutos, com troca de água a cada 5 minutos. Após, o gel foi tratado com a solução reveladora (50 µL de ácido nítrico 2,3 mol/L, 250 µL de formaldeído 38% em 200 mL de água desionizada) até visualização das bandas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 1%.

### **2.11. Atividade em gel de poliacrilamida**

A atividade da bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi determinada em gel de poliacrilamida. Após corrida eletroforética, metade do gel foi corado e outra metade foi usada para verificar a atividade. O gel foi fixado (50% etanol, 7,5% ácido acético) por 1 hora, e em seguida, foi lavado com água desionizada por 1 hora. Posteriormente, o gel foi colocado em placa estéril e coberto com uma sobrecamada de ágar 1,5% contendo aproximadamente 10<sup>5</sup> células de *M. luteus* por mL. A placa foi incubada a 4 °C por 5 horas para difusão, e incubada a 30 °C.

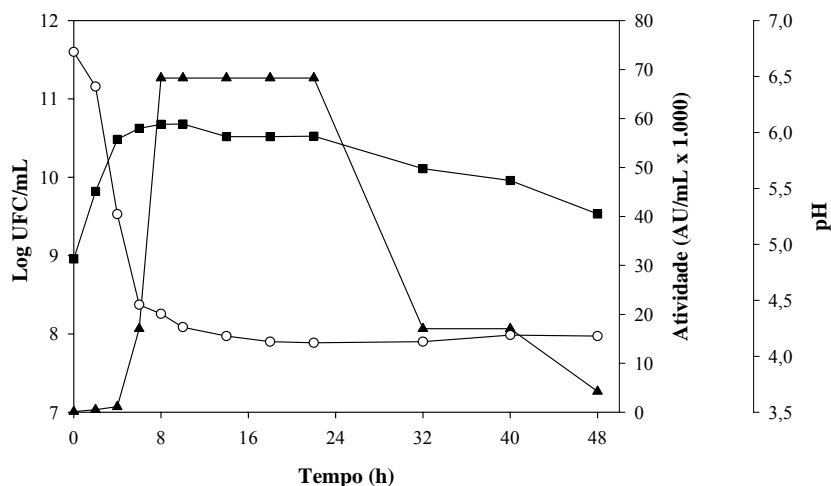
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Crescimento de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 e produção de bacteriocina

O crescimento de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 e a produção de bacteriocina em meio D-MRS 2% está mostrado na Figura 2. *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 cresce satisfatoriamente neste meio a 30 °C atingindo o nível máximo de células viáveis,  $6,7 \times 10^9$  UFC/mL, após 8 horas de crescimento. Após este tempo, o número de células viáveis permaneceu estável,  $3,3 \times 10^9$ , até 24 horas, e após este período diminuiu 1 ciclo log até 48 horas em cultivo.

A produção de bacteriocina provavelmente começou no final da fase log, sendo detectada após 4 horas de crescimento (aproximadamente 1.000 AU/mL) e alcançou a atividade máxima de aproximadamente 68.000 AU/mL após 8 horas de crescimento, o qual corresponde a fase estacionária e com pH baixo do meio, em torno de 4,3. A atividade permaneceu estável na fase estacionária até 24 horas, porém houve um declínio na atividade após 32 horas de cultivo sendo que com 48 horas a atividade diminuiu para aproximadamente 4.000 AU/mL.

Estes resultados sugerem que a produção de bacteriocina por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 pode não está associada com o aumento da biomassa celular e a bacteriocina pode não ser essencial para o crescimento. Muitas bacteriocinas de bactérias do ácido láctico são produzidas como metabólito secundário, tais como Leucocina S produzida por *Leuconostoc mesenteroides* OX (LEWUS et al., 1991) e Lactocina 705 produzida por *Lactobacillus casei* CRL 705 (VIGNOLO et al., 1995).



**Figura 2.** Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 (■), variação do pH (○) e atividade da bacteriocina (▲) em D-MRS a 30 °C.

A atividade da bacteriocina alcançou o nível máximo na fase estacionária e nenhuma perda da atividade foi observada durante essa fase. Em algumas bactérias lácticas a atividade da bacteriocina é detectada no início da fase de crescimento, em outras a atividade é detectada apenas no final (McMULLEN e STILES, 1996). A diminuição da atividade da bacteriocina após a fase estacionária de crescimento do microrganismo produtor tem sido verificada e este decréscimo na atividade pode ser atribuído a vários mecanismos, como agregação da proteína, degradação por proteases específicas e não específicas e a adsorção da bacteriocina às células da cultura bacteriocinogênica (PARENTE e RICCIARDI, 1999).

### 3.2. Atividade em diferentes valores de pH

A bacteriocina presente no EB reteve atividade após exposição a 4 °C, por 2 horas, em ampla faixa de pH (Tabela 1). A atividade foi mais alta em condições ácidas do que em condições básicas. A atividade inibitória máxima foi demonstrada em pH 2. Na faixa de pH de 3 a 5, a atividade diminuiu 50%, mas

em valores de pH mais básicos, a redução foi bem mais drástica, variando de 93 a 99,9%.

Bacteriocinas diferem bastante com respeito à sensibilidade ao pH. Muitas delas são consideradas mais ativas em valores de pH mais ácido do que alcalino (TAGG et al., 1976) como é o caso da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 que foi mais ativa em valores de pH entre 2 e 5. A estabilidade dessa bacteriocina se assemelha ao da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* F1, a qual exibiu alta atividade inibitória na faixa de pH de 2 a 6, mas perdeu grande parte da atividade na faixa de pH de 8 a 12 (ONGUBANWO et al., 2003). Nisina é mais ativa em condições ácidas, porém é praticamente instável em valores de pH alcalinos e próximos da neutralidade (De VUYST e VANDAME, 1994).

**Tabela 1.** Atividade do extrato protéico bruto (EB) da bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em valores de pH de 2 a 11 e determinada sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

Valores de pH	Atividade da bacteriocina (AU/mL)
2	$2,18 \times 10^5$
3	$1,09 \times 10^5$
4	$1,09 \times 10^5$
5	$1,09 \times 10^5$
6	$1,36 \times 10^4$
7	$1,7 \times 10^3$
8	$3,4 \times 10^3$
9	$6,8 \times 10^3$
10	$3,4 \times 10^3$
11	$8,5 \times 10^2$

AU/mL: Unidades Arbitrárias por mililitro corresponde à recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição de 5 mm.

### 3.3. Estabilidade físico-química da atividade da bacteriocina

#### 3.3.1. Efeito do tratamento térmico

A Tabela 2 mostra a sensibilidade da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 ao tratamento térmico. A atividade inibitória não foi alterada por nenhum dos tratamentos térmicos utilizados.

Estes resultados sugerem que a bacteriocina é resistente ao calor. A resistência ao calor é uma característica comum entre bacteriocinas de bactérias do ácido láctico (TAGG et al., 1976). Estabilidade a altas temperaturas é de grande conveniência para as bacteriocinas usadas como conservantes em alimentos que passam por processo de aquecimento durante o processamento (MITEVA et al., 1998).

A maioria das bacteriocinas sensíveis ao calor pertence à classe III, que são bacteriocinas grandes com peso molecular maior que 30 kDa. Entretanto, alguns autores têm encontrado bacteriocinas pequenas e instáveis ao calor, como Lactococina 972 produzida por *Lactococcus lactis* (MARTINÉZ et al., 1996) e uma bacteriocina produzida por *Streptococcus thermophilus* 81 (IVANOVA et al., 1998).

**Tabela 2.** Atividade do extrato protéico bruto (EB) da bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 submetido a diferentes tratamentos térmicos e determinada sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

Tratamento térmico	Atividade da bacteriocina (AU/mL)
Controle	$1,09 \times 10^5$
80 °C/2 horas	$1,09 \times 10^5$
98 °C/30 minutos	$1,09 \times 10^5$
121 °C/ 20 minutos	$1,09 \times 10^5$

pH das amostras foi ajustado para 5.0

AU/mL: Unidades Arbitrárias por mililitro corresponde à recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição de 5 mm.

### 3.3.2. Liofilização e congelamento/descongelamento

O EB de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi submetido à liofilização e ao processo de congelamento/descongelamento (Tabela 3). Nenhuma atividade de inibição foi perdida, em relação ao controle, quando o EB foi submetido ao processo de liofilização. O efeito de congelar e descongelar, realizado por até 5 vezes, não afetou a atividade da bacteriocina presente no EB, o que demonstra sua estabilidade ante essas condições. FAYE et al. (2000) e HERRANZ et al. (2001) também observaram que a atividade inibitória das bacteriocinas, Propionicina T1 e as Enterocinas A e B, não foi perdida após liofilização e após a ação de congelar e descongelar.

**Tabela 3.** Atividade do extrato protéico bruto (EB) da bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, submetido a liofilização e ao congelamento e descongelamento, determinada sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

<b>Tratamento</b>	<b>Atividade da bacteriocina (AU/mL)</b>
Controle	$1,09 \times 10^5$
Liofilização	$1,09 \times 10^5$
Congelar/descongelar 1X	$1,09 \times 10^5$
Congelar/descongelar 2X	$1,09 \times 10^5$
Congelar/descongelar 3X	$1,09 \times 10^5$
Congelar/descongelar 4X	$1,09 \times 10^5$
Congelar/descongelar 5X	$1,09 \times 10^5$

pH das amostras foi ajustado para 5.0

AU/mL: Unidades Arbitrárias por mililitro corresponde à recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição de 5 mm.

### 3.3.3. Temperatura de armazenagem

A Tabela 4 mostra a influência da temperatura de armazenagem sobre a atividade da bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 durante um período de 6 meses. A armazenagem da substância na temperatura ambiente mostrou que grande perda da atividade (96,8%) ocorreu logo nos 2 primeiros meses e no final de 6 meses apenas 0,02% da atividade permaneceram no EB. Na temperatura de 5 °C, 87,5% da atividade foi perdida após 2 meses de armazenagem e após 6 meses de armazenagem 3,12% da atividade residual foi encontrada. A armazenagem da bacteriocina nas temperaturas de -20 °C e -80 °C por até 6 meses não afetou a atividade de inibição. Estes resultados diferem dos resultados encontrados com outras bacteriocinas. IVANOVA et al. (1998) verificaram que a atividade da bacteriocina produzida por *Streptococcus thermophilus* 81 não foi afetada quando foi armazenada na temperatura de 4 °C por 2 meses. Resultado semelhante também foi encontrado por MITEVA et al. (1998) quando utilizaram a bacteriocina produzida por *L. delbrueckii* 1043. Porém, os resultados encontrados nos experimentos realizados com temperatura de congelamento estão de acordo com FAYE et al. (2000) e HERRANZ et al. (2001), os quais verificaram que bacteriocinas armazenadas a -20 °C não perderam a atividade de inibição. Estes resultados indicam que as temperaturas de -20 °C ou -80 °C são adequadas para preservação da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 e que grande perda da atividade ocorreu na presença da temperatura ambiente e a 5°C.

A presença da bacteriocina durante a armazenagem do produto é também muito importante. Quando bacteriocinas purificadas são adicionadas em alimentos, freqüentemente ocorre perda da atividade durante armazenagem do produto (McMULLEN e STILES, 1996). NIELSON et al. (1990) verificaram que a adição da bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici*, obtido de produto comercial Lactacel 110, permaneceu ativa em carnes, após 28 dias, armazenadas em temperatura de 5°C. Porém, quando a bacteriocina Pediocina AcH/PA foi adicionada em peito de frango e este foi armazenado a 5 °C, uma

grande perda de sua atividade foi detectada (> 98%) após 7 dias (DEGNAN e LUCHANSKY, 1992).

**Tabela 4.** Atividade do extrato protéico bruto (EB) da bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 após 6 meses de armazenagem em diferentes temperaturas determinada sobre *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

Temperatura	Atividade da bacteriocina (AU/mL)			
	Antes da armazenagem	2 meses	4 meses	6 meses
Temp. ambiente*	$1,09 \times 10^5$	$3,4 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$
5 °C	$1,09 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$
- 20 °C	$1,09 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$
- 80 °C	$1,09 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$

\* Temperatura ambiente variou de 23 a 27 °C

### 3.4. Purificação da bacteriocina

A bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi purificada de uma cultura cultivada por 16 horas em meio D-MRS a 30 °C e os resultados estão resumidos na Tabela 5.

O primeiro passo do protocolo de purificação foi concentrar a bacteriocina por precipitação das proteínas do sobrenadante da cultura com sulfato de amônio 60%. Este passo permitiu um aumento de 1,8 vezes na atividade específica com um rendimento de 73,7% da atividade presente no sobrenadante da cultura. Com procedimento similar GEORGALAKI et al. (2002) obtiveram um rendimento de 52,7% e um aumento de 2,1 vezes na atividade de Macedocina, bacteriocina produzida por *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. Entretanto, AYMERICH et al. (2000) em processo semelhante utilizado para a purificação de Sakacina K, produzida por *Lactobacillus casei* CTC 494, obtiveram uma purificação de 35 vezes, com uma taxa de recuperação da atividade de 155%.

**Tabela 5.** Purificação da bacteriocina produzida por *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em meio D-MRS a 30 °C.

Etapa da purificação	Volume (mL)	Prot. Total <sup>a</sup> (mg)	Ativ. Total <sup>b</sup> (AU)	Ativ. Específica <sup>c</sup> (AU/mg prot.)	Fator de purificação <sup>d</sup>	Rendimento (%)
Sobrenadante	500	7.750,0	4.266.500,0	550,5	1,0	100
Fracionamento com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	3.460,0	3.143.300,0	908,5	1,8	73,7
CM-Sephadex						
Fração CM1	6	27,0	118,5	4,4	0,008	0,0028
Fração CM2	30	109,8	127.980,0	1.165,6	2,1	3,0
Fenil Sepharose	7	6,51	59.731,0	9.175,3	16,7	1,4
HPLC-Fase reversa	1	0,38	1.066,67	2.807,03	5,1	0,025

<sup>a</sup> Proteína total é o teor de proteína multiplicada pelo volume.

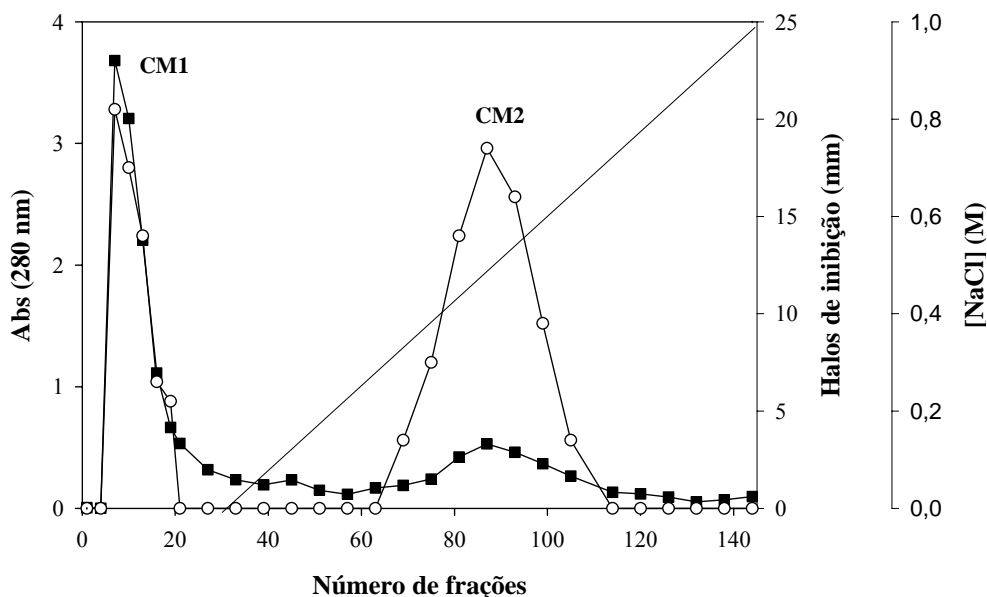
<sup>b</sup> Atividade total é o número de unidades arbitrárias de atividade no volume.

<sup>c</sup> Atividade específica é a unidade de bacteriocina dividida pelo teor de proteína.

<sup>d</sup> Fator de purificação é a atividade específica em relação ao sobrenadante da cultura.

O material obtido com precipitação por sulfato de amônio foi dialisado e submetido à cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna de CM-Sephadex. A Figura 3 mostra o perfil de eluição da cromatografia de troca iônica. As frações que constituem cada pico protéico com atividade foram reunidas e denominadas CM1 e CM2, respectivamente. Em seguida elas foram dialisadas para eliminar o sal, liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Nesta etapa, a fração CM1 apresentou um baixo rendimento de 0,0028%. Na fração CM2 a amostra foi purificada 2,1 vezes, com um rendimento de 3 % da atividade (Tabela 5). Resultados obtidos por HERRANZ et al. (2001) durante purificação de Enterocinas A e B, produzidas por *Enterococcus faecium* P21, também apresentaram baixa taxa de recuperação da atividade. Os autores encontraram apenas 6% da atividade presente nas amostras eluídas da coluna de troca iônica SP-Sepharose, embora a atividade específica tenha aumentado 110 vezes. Em outro estudo, AYMERICH et al. (2000) obtiveram um rendimento de 269% e um

aumento de 2.629 vezes na atividade específica no processo de purificação de Sakacina K de *L. casei* CTC494.

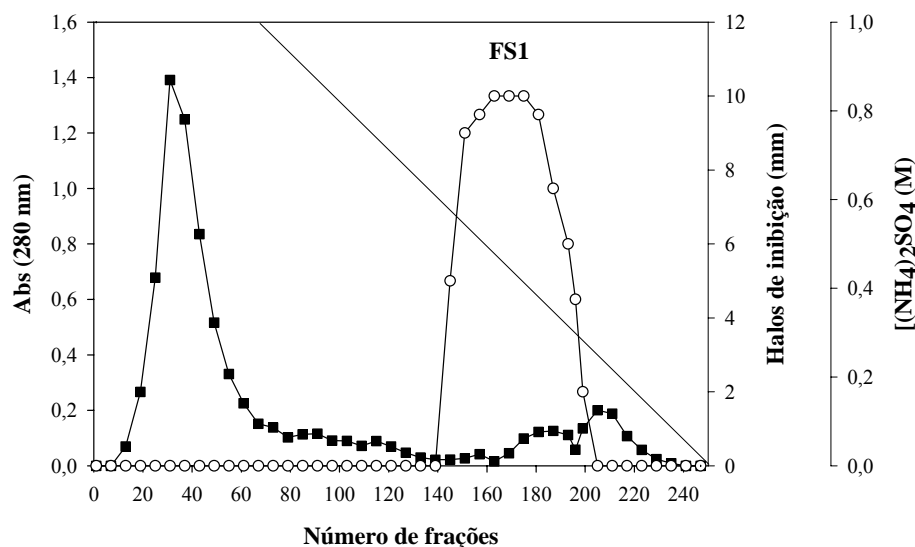


**Figura 3.** Perfil de eluição de bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 em coluna de troca iônica CM-Sephadex. (■) Absorvância 280 nm; (○) Halos de inibição, (—) Gradiente linear de NaCl (0 —1 M), CM1 e CM2 são frações com atividade de inibição.

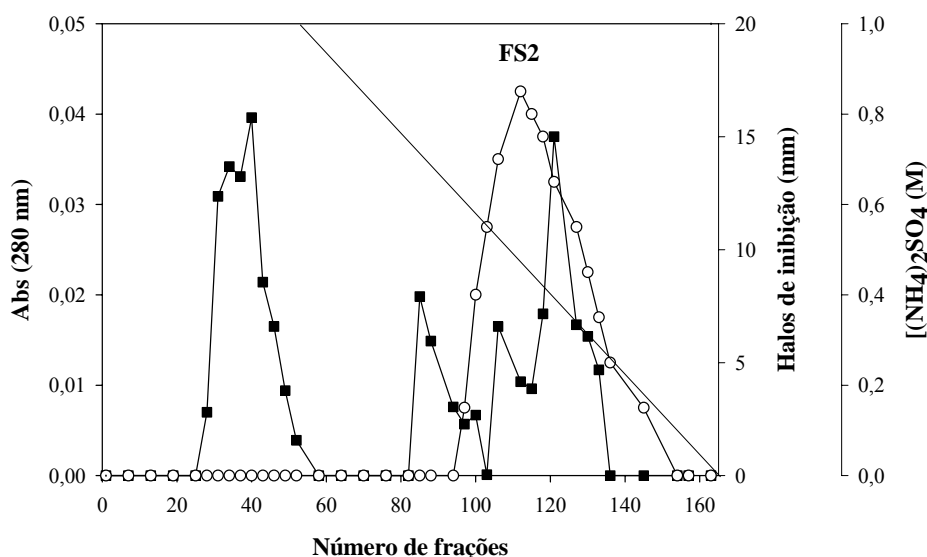
As frações com atividade, CM1 e CM2, obtidas após eluição em coluna de troca iônica, foram submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica.

A Figura 4 mostra o perfil de eluição da fração CM1, mostrando um grande pico protéico sem atividade de inibição e um pico menor mas com alta atividade. As frações desse pico menor foram reunidas e denominada FS1.

Quando a fração CM2 foi aplicada na coluna de interação hidrofóbica, observou-se um pico protéico com nenhuma atividade de inibição e um pico protéico, eluído no gradiente decrescente, com alta atividade de inibição (Figura 5). As frações com atividade foram agrupadas e denominada FS2.



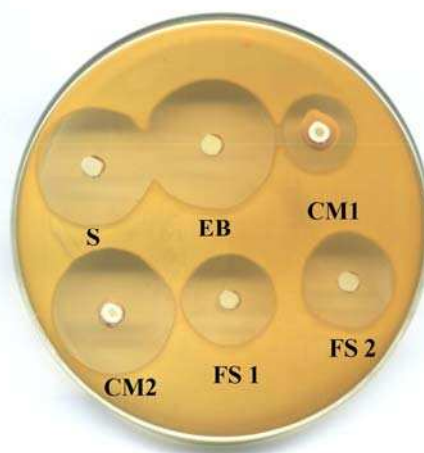
**Figura 4.** Perfil de eluição da fração CM1 proveniente da cromatografia de troca iônica contendo bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, em coluna de interação hidrofóbica Fenil Sepharose. (■) Absorvância 280 nm; (○) Halos de inibição; (—) Gradiente decrescente de sulfato de amônio (1 – 0 M); FS1 – fração com atividade.



**Figura 5.** Perfil de eluição da fração CM2 proveniente da cromatografia de troca iônica contendo bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, em coluna de interação hidrofóbica Fenil Sepharose: (■) Absorvância 280 nm; (○) Halos de inibição; (—) Gradiente decrescente de sulfato de amônio (1 – 0 M); FS2 – fração com atividade.

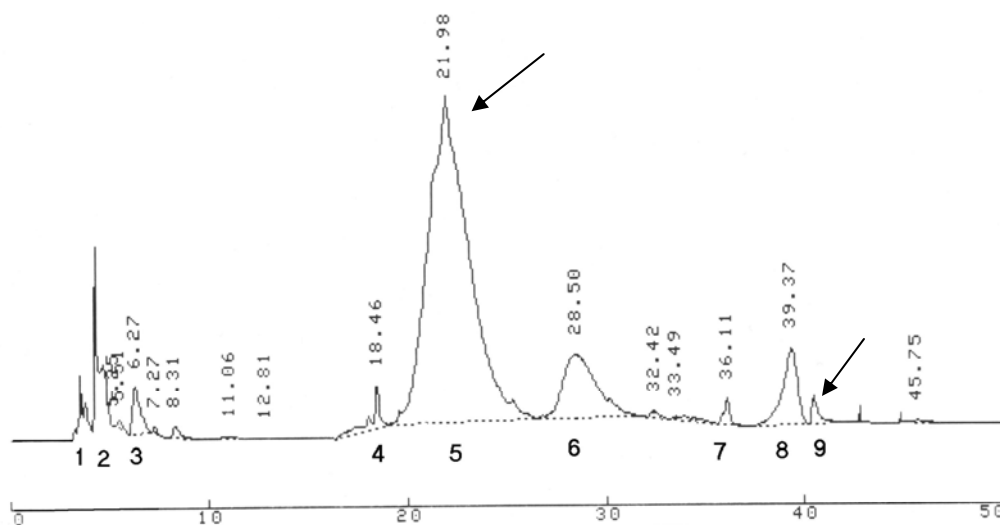
O perfil de eluição semelhante das amostras com atividade de inibição, CM1 e CM2, sugere tratar-se de substâncias com comportamento hidrofóbico semelhante, por isto as frações com atividade de inibição após cromatografia de interação hidrofóbica foram agrupadas numa única fração. A fração apresentou um rendimento de 1,4% da atividade e um aumento de 16,7 vezes na atividade de inibição (Tabela 5). Uma baixa taxa de recuperação da atividade também foi verificada por HERRANZ et al. (2001) quando utilizaram coluna de interação hidrofóbica para purificar Enterocina A e B de *Enterococcus faecium* P21. Os autores verificaram um aumento de 64 vezes na atividade específica e um rendimento da atividade de 5%.

Durante todo o processo de purificação da bacteriocina, a atividade de inibição das frações foi verificada, em cada etapa, sobre *M. luteus* ATCC 10240, utilizado como microrganismo indicador (Figura 6).

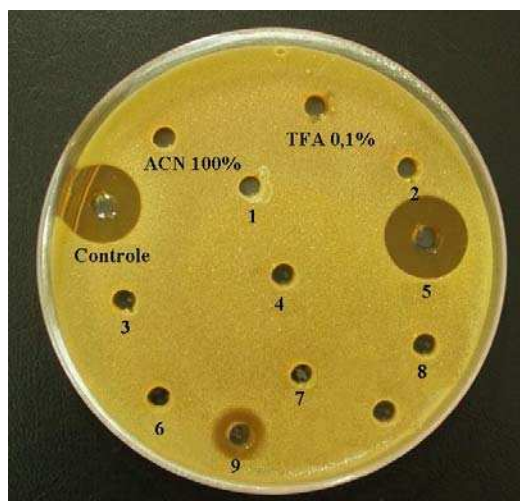


**Figura 6.** Halos de inibição de *Micrococcus luteus* ATCC 10240 produzidos pelas frações obtidas durante purificação de bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9. Foram aplicados 30  $\mu$ L de cada fração. S-Sobrenadante da cultura, EB-Extrato protéico bruto obtido após fracionamento com sulfato de amônio 60% e diálise, CM1 e CM2 frações obtidas após coluna de troca iônica Carboxi Metil sephadex, FS1- fração obtida após coluna de interação hidrofóbica Fenil Sepharose resultante da fração CM1, FS2- fração obtida após coluna de interação hidrofóbica Fenil Sepharose resultante da fração CM2.

As frações com atividade obtidas após cromatografia de interação hidrofóbica, FS1 e FS2, foram agrupadas e submetidas à HPLC-fase reversa. O perfil de eluição está ilustrado na Figura 7 e a eluição resultou em duas frações com atividade, as quais estão indicadas pelas setas. A fração 5 foi eluída com a proporção de aproximadamente 35% de acetonitrila e a fração 9 com aproximadamente 80%. Após este passo, a atividade específica diminuiu 5,1 vezes e apenas 0,025% da atividade inicial foi recuperada (Tabela 5). Esta baixa taxa de recuperação da atividade pode ser devida à produção de duas frações com atividade de inibição (Figura 8). Os valores encontrados para HPLC-fase reversa na Tabela 5 foram calculados somente para a fração 5, pois o halo de inibição produzido pela fração 9 foi muito pequeno impossibilitando o cálculo de sua atividade pelo método de diluição utilizado neste estudo.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico a 280 nm das amostras FS1 e FS2 agrupadas provenientes da cromatografia de interação hidrofóbica contendo bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, em coluna C18 de HPLC- fase reversa. A eluição foi feita em gradiente linear de 0 a 100% (10 minutos: ácido trifluoracético-TFA 0,1%, 40 minutos: acetonitrila100% + TFA 0,1%). Números de 1 a 9 representam picos protéicos.

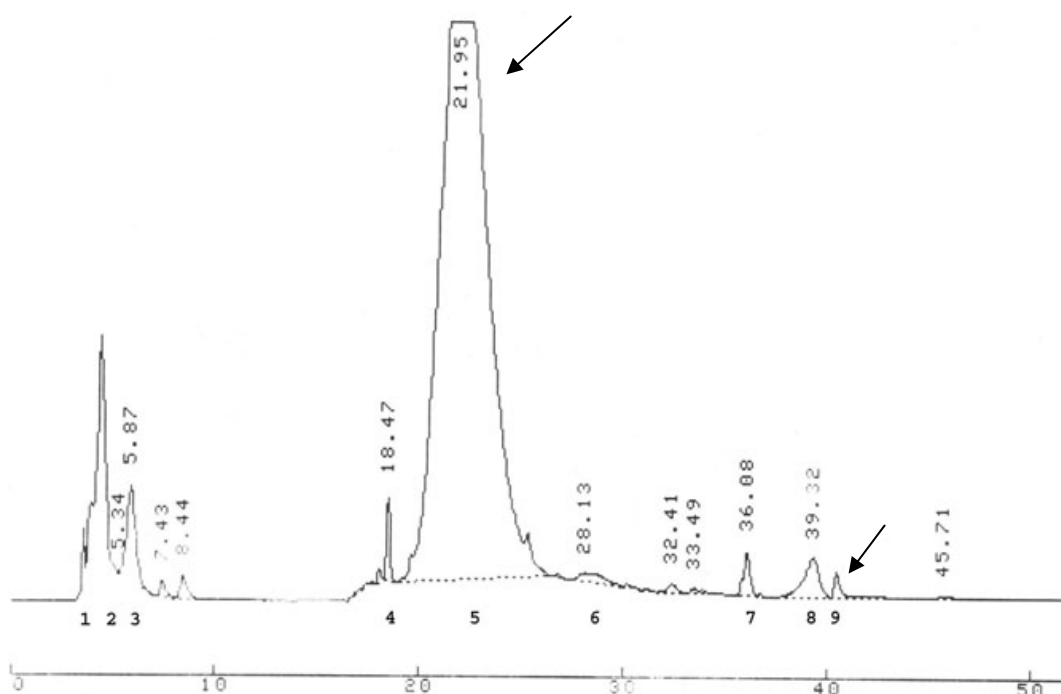


**Figura 8.** Halos de inibição de *Micrococcus luteus* ATCC 10240 produzidos pelas frações obtidas durante purificação da bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 após cromatografia de fase reversa. Números de 1 a 9: picos protéicos referentes ao cromatograma de HPLC-fase reversa; Controle: amostra resultante da cromatografia de interação hidrofóbica (frações FS 1 e FS 2 reunidas); TFA: Ácido Trifluoracético 0,1%; ACN: Acetonitrila 100%.

A obtenção de duas frações com atividade sugere que são formas diferentes do mesmo peptídeo, que estariam formando agregados e durante a eluição se separaram em função da hidrofobicidade diferente. Outra hipótese poderia ser que estas duas frações representam dois peptídeos distintos, sendo que um deles possui maior atividade de inibição verificada sobre *M. luteus* ATCC 10240.

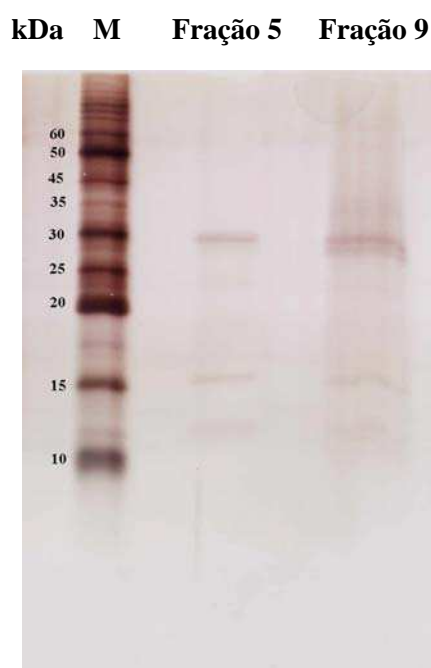
Para verificar se os dois prováveis peptídeos estariam em frações diferentes ou na mesma fração, somente a fração FS2 obtida da cromatografia de interação hidrofóbica foi aplicada no HPLC-fase reversa e novamente observaram-se duas frações com atividade que estão indicadas pelas setas (Figura 9). Este resultado indica que as frações CM1 e CM2 obtidas na cromatografia de troca iônica não são diferentes. A fração CM1 apresenta carga negativa uma vez que não ligou na coluna Carboxi-Metil e uma provável explicação seria o fato de que alguns monômeros da bacteriocina poderiam estar fortemente ligados às

outras proteínas ou substâncias de carga negativa presentes na amostra que foi submetida à coluna. E na fração CM2 a bacteriocina estaria formando aglomerados. Algumas bacteriocinas são tipicamente produzidas como grandes complexos formando agregados de 30 a 300 kDa. Estes agregados podem mascarar parcialmente ou completamente a atividade antimicrobiana da bacteriocina durante purificação e também induzir erros na determinação do peso molecular (CINTAS et al., 2001).



**Figura 9.** Perfil cromatográfico a 280 nm da amostra FS1 proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica contendo bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, após coluna C18 de HPLC- fase reversa. A eluição foi feita em gradiente linear de 0 a 100% (10 minutos: ácido trifluoracético-TFA 0,1%, 40 minutos: acetonitrila 100% + TFA 0,1%). Números de 1 a 9 representam picos protéicos.

As frações com atividade de inibição obtidas após cromatografia de fase reversa foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para visualização da pureza e para estimar a massa molecular. O gel foi corado por dois métodos, por Comassie Blue e por prata. A coloração por Comassie Blue não revelou nenhuma banda protéica. O gel corado com prata revelou bandas de proteínas de massas moleculares próximas a 15 e 30 kDa para a fração 5 e para a fração 9. O perfil de migração das proteínas presentes nessas frações está apresentado na Figura 10.



**Figura 10.** Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 20%) das frações obtidas após HPLC-fase reversa durante purificação de bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, com coloração por prata. M: marcador de massa molecular; Fração 5 e 9: picos protéicos com atividade de inibição obtidos após HPLC-fase reversa.

Estas bandas de proteínas poderiam ser de outras proteínas contaminantes que não foram eliminadas durante o processo de purificação. Outra especulação seria novamente a indicação de que a bacteriocina se encontra

agregada (talvez na forma de dímeros ou multímeros) e as condições desnaturantes do gel não foram suficientes para conseguir formas monoméricas da bacteriocina. Ou então poderia ser resultado de uma degradação irreversível. Uma outra possibilidade seria o fato de que a bacteriocina pode ser muito pequena e ter saído do gel durante corrida eletroforética.

Problemas com a visualização de bacteriocinas após SDS-PAGE têm sido relatados. Lacticina 481, lantibiótico de 17 kDa, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481 e a bacteriocina produzida por *S. thermophilus* 81 (IVANOVA et al., 1998) não puderam ser detectadas em gel de poliacrilamida após coloração com Coomassie Blue ou com prata (PIARD et al., 1992). Lactacina F, produzida por *Lactobacillus acidophilus*, pode somente ser detectada por coloração por prata e não por Coomassie Blue (BAREFOOT e KLAENHAMMER, 1984). Peptídeos pequenos e hidrofóbicos como bacteriocinas parecem difundir para fora do gel durante o processo de coloração se não forem devidamente fixadas (CAROLISSEN-MACKAY et al., 1997). A visualização da banda protéica em gel de poliacrilamida de Leucocina A-UAL 187, produzida por *Leuconostoc gelidum*, somente foi possível após substituir o fixador geralmente utilizado (aceto-metanol) por um fixador mais ativo, por exemplo, formaldeído (HASTINGS et al., 1991). Bovicina HC5, produzida por *Streptococcus bovis* HC5 não pode ser visualizada depois de corada por prata. Entretanto, ela reagiu com o corante Coomassie após fixação com glutaraldeído 5% (MANTOVANI et al., 2002).

Devido à impossibilidade de identificar a bacteriocina e de estimar sua massa molecular em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), outro método foi realizado. Utilizou-se o método de atividade em gel verificada sobre *M. luteus*. Este método também não acrescentou nenhuma informação uma vez que não foi detectada nenhuma zona de inibição produzida sobre o microrganismo indicador. A atividade em gel apresenta algumas dificuldades como por exemplo, o microrganismo indicador pode ser sensível ao SDS ou o SDS pode inibir a atividade da bacteriocina (CAROLISSEN-MACKAY et al., 1997). Este método foi usado com sucesso para identificação de algumas bacteriocinas como,

Mesenterocina Y105 produzida por *Leuconostoc mesenteroides* (HÉCHARD et al., 1992) e Bavaricina A produzida por *Lactobacillus bavaricus* (LARSEN et al., 1993).

A purificação da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 resultou em grande perda da atividade pelo protocolo utilizado neste estudo. Um dos parâmetros que pode ter interferido na purificação foi o meio de cultivo utilizado. A bactéria láctica foi cultivada em meio complexo (D-MRS), o qual contém significantes quantidades de peptídeos que podem afetar a purificação. BAREFOOT e KLAENHAMMER (1984) relataram que o alto conteúdo de peptídeos presentes em meio MRS, inicialmente usado para purificação de Lactacina B, interferiu no processo de purificação. Portanto, para o sucesso da purificação da bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 sugere-se testar outros protocolos de purificação que resultem numa maior recuperação da atividade e um aumento na atividade específica. O meio de cultivo utilizado para crescimento e purificação da bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 deverá ser substituído por outro meio menos rico, mas em que ainda ocorra a produção de bacteriocina em grande quantidade.

A determinação da seqüência de aminoácidos da bacteriocina para comparação com outras bacteriocinas conhecidas e disponíveis no banco de dados não foi possível, uma vez que não se obteve a bacteriocina totalmente purificada. Porém, com os resultados obtidos pelo processo de purificação e caracterização da bacteriocina pode-se deduzir que a bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 é pequena, com capacidade de formar agregados, estável ao calor e ampla faixa de pH, catiônica e hidrofóbica.

## 4. CONCLUSÃO

A atividade da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9, em meio D-MRS, surge no final da fase logarítmica de crescimento e é máxima na fase estacionária, portanto pode ser considerada um metabólito secundário. A bacteriocina foi ativa em ampla faixa de pH de 2 a 11 e reteve maior atividade em pH 2. É estável ao calor uma vez que a atividade não foi perdida sob condições de esterilização, 121 °C por 20 minutos. A atividade não foi perdida durante os processos de liofilização e congelamento/descongelamento. Estas são características importantes quando considera-se a bacteriocina purificada como conservante alimentar. As temperaturas de -20 °C ou -80 °C são adequadas para preservação da bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9.

A purificação foi realizada utilizando fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e de interação hidrofóbica, e HPLC-fase reversa. Grande perda de atividade da bacteriocina foi observada especialmente após cromatografia de troca iônica e somente 0,025% da atividade inicial foi recuperada após HPLC-fase reversa. Recomenda-se elaborar outros protocolos de purificação que resultem numa maior recuperação da atividade e maior atividade específica. Propriedades peculiares desse peptídeo devem ser investigadas.

Não foi possível estimar a massa molecular, pois a bacteriocina não corou em gel de poliacrilamida nem por Coomassie e nem por prata. Para determinação por espectrometria de massa, a amostra teria que está totalmente purificada, o que não foi possível certificar por meio de gel de poliacrilamida. A localização da bacteriocina em gel de atividade também não foi conseguida, pois não se observou nenhuma zona de inibição sobre o microrganismo indicador. Os resultados obtidos com a purificação indicam que a bacteriocina é pequena, catiônica, hidrofóbica e com capacidade de formar agregados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 28, p. 169-185, 1995.
- ALFENAS, A. C., DUSI, A., ZERBINI, F. M. J., ROBINSON, I. P., MICALES, J. A., OLIVEIRA, J. R., DIAS, L. A. S., SCORTICHINI, M., BONDE, M. R., ALONSO, S. K., JUNCHAS, T. G., BRUNE, W. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG:UFV, 1998. 574p.
- AYMERICH, M. T., HUGAS, M., MONFORT, J. M. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Science and Technol. Int.**, v. 4, n. 3, p. 141-158, 1998.
- AYMERICH, M. T., GARRIGA, M., MONFORT, J. M., NES, I., HUGAS, M. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. **Food Microbiol.**, v. 17, p. 33-45, 2000.
- BAREFOOT, S. F., KLAENHAMMER, T. R. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 26, p. 328-334, 1984.
- BOGOVIC-MATIJASIC, B., ROGELJ, I., NES, I. F., HOLO, H. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 606-612, 1998.
- CAROLISSEN-MACKAY, V., ARENDSE, G., HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 34, p. 1-16, 1997.
- CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, n. (1-2), p. 131-149, 1999.
- CINTAS, L. M., CASAUS, M. P., HERRANZ, C. NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Sci Tech. Int.**, v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.

- CHEN, H., HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety**, v. 2, p. 82-100, 2003.
- 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.
- DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technol.**, v. 43, n. 1, p. 164-167, 1989.
- DANIELS, L. HANSON, R. S., PHILLIPS, J. A. Chemical analysis. (Ed). In: GERHARDT, P. MURRAY, R. G. E., WOOD, W. A. KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington, D. C.: American Society Microbiology, 1994. p. 512-554.
- DEGNAN, A. J., LUCHANSKY, J. B. Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome-encapsulated pediocin AcH. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 552-554, 1992.
- DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. In: **International Symposium of Lactic Acid Bacteria**, San Miguel de Tucumán, Argentina, 7-11 October, 1996.
- De VUYST, L., VANDAMME, E. J. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* strain: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De VUYST, L., VANDAMME, E. J. (Ed). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application**, London: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 151-221.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. Classe IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 85-106, 2000.
- FEDERAL REGISTER. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Fed. Regist.** 54, 11247-11251.
- FERCHICHI, M., FRÈRE, J., MABROUK, K., MANAI, M. Lactococcin MMFII, a class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII isolated from a Tunisian dairy product. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 205, p. 49-55, 2001.

- GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 84, p. 577-592, 2002.
- FAYE, T., LANCSRUD, T., NES, I. F., HOLO, H. Biochemical and genetic characterization of Propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoeni*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n.10, p. 4230-4236, 2000.
- GEORGALAKI, M. D., VAN DE BERGHE, E., KRITIKOS, D., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., KALANTZOPOULOS, G., DE VUYST, L., TSAKALIDOU, E. Mucedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 88, n. 12, p. 5891-5903, 2002.
- HAMMES, W. P., WEISS, N., HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALOWS, A., TRUPER, H. G., DWORKIN, M. et al. **The prokaryotes**, 2 ed., New York: Springer-Verlag, 1992. v. 2, p. 1535-1594.
- HASTING, J. W., SAILER, M., JOHNSON, K., ROY, K. L., VEDERAS, J. C., STILES, M. E. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 173, p. 7491-7500, 1991.
- HÉCHARD, Y., DÉRIJARD, B., LETELLIER, F., CENATIEMPO, Y. Characterization and purification of mesenterocin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, p. 2715-2720, 1992.
- HERRANZ, C., CASAUS, P., MUKHOPADHYAY, S., MARTÍNEZ, J. M., RODRÍGUEZ, J. M. NES, I. F., HERNÁNDEZ, P. E., CINTAS, L. M. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 115-131, 2001.
- HOOVER, D. G., HARLANDER, S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In. HOOVER, D. G., STEENSON, L. R. (Eds.). **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. California: Academic Press Inc., 1993. p. 23-39.

- 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.
- KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochemie**, v. 70, p. 337-349, 1988.
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics for bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 39-86, 1993.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARSEN, A. G., VOGENSEN, F. K., JOSEPHSEN, J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1410. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, p. 113-122, 1993.
- LEWUS, C., KAISER, A., MONTVILLE, T. Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.
- MANTOVANI, H. C., HU, H., WOROBO, R. W., RUSSEL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiol.**, v. 148, p. 3347-3352, 2002.
- MARTINÉZ, B., SUAREZ, J. E., RODRIGUEZ, A. Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. **Microbiol.**, UK 142, p. 2393-2398, 1996.
- McAULIFFE, O., ROSS, R. P., HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 285-308, 2001.
- McMULLEN, L. M., STILES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **J. Food Protect. Suppl.**, p. 64-71, 1996.
- MONTVILLE, T. J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 511-519, 1998.

- MOLL, G. N., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 185-198, 1999.
- MITEVA, V., IVANOVA, I., BUDAKOV, I., PANTEV, A., STEFANOVA, T., DANOVA, S., MONCHEVA, P., MITEV, V., DOUSSET, X., BOYAVAL, P. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043. **J. Appl. Microbiol.**, v. 85, p. 603-614, 1998.
- NES, I. F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRURBERG, M. B., EIJSINK, V., HOLO, H. R. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 113-128, 1996.
- NIELSON, J. W., DICKSON, J. S., CROUSE, J. D. Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2142-2145, 1990.
- O'KEEFFE T., HILL, C. Bacteriocins potential in food preservation. <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/bacteriocins.doc> -1999.
- OGUNBANWO, S. T., SANNI, A. I., ONILUDE, A. A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **African J. of Biotechnol.**, v. 2, n. 8, p. 219-227, 2003.
- O'SULLIVAN, L. ROSS, R. P., HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, p. 593-604, 2002.
- PARENTE, E., RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 628-638, 1999.
- PIARD, J-C., MURIANA, P. M., DESMAZEAUD, M. J., KLAENHAMMER, T. R. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 279-284, 1992.
- ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 79, p. 3-16, 2002.

- SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W. H. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 33, p. iii-v, 1996.
- SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trench in Food Sci. Technol.**, v. 7, p. 158-164, 1996.
- STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Ant. van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 331-345, 1996.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.
- VIGNOLO, M. G., KALRUZ, M. N., AIDA, A. P., de HOLDAGO, R., OLIVIER, G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 5-10, 1995.