

# BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

CLÁUDIA MORENO ROSA \*  
BERNADETTE D.G.M. FRANCO \*\*

\* Professora Doutora do Departamento de Saúde da UNINOVE

\*\* Professora Doutora do Departamento de Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental-USP

## Resumo

Mudanças no estilo de vida dos consumidores têm aumentado a procura por novos tipos de alimento, como os refrigerados de preparo fácil (*ready to eat*), os naturais (sem adição de conservantes químicos) e os nutritivos (SILLS-LEVY, 1989; REINECCIUS, 1989). Alguns patógenos alimentares psicrotóxicos – por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Aeromonas hydrophila* (LECHOWICH, 1988; MOTLAGH *et al.*, 1991) – emergiram devido ao aumento do consumo de produtos refrigerados. Como conseqüência, observa-se o interesse por novas tecnologias que aumentem o tempo de vida útil desses produtos e também confirmem segurança microbiológica a eles. Pesquisas com bacteriocinas de bactérias lácticas têm-se expandido nos últimos anos, por causa de sua utilização como bioconservantes alimentares. Sabendo-se que bactérias lácticas ocorrem naturalmente em muitos alimentos fermentados, suas bacteriocinas podem ser facilmente aceitas como aditivos alimentares pelas autoridades da saúde e pelos consumidores (GONZALEZ *et al.*, 1996). Essa revisão tem como objetivo destacar os recentes avanços tecnológicos no estudo dessas bacteriocinas.

**Palavras-chave:** bacteriocina; *Listeria monocytogenes*; bactéria láctica.

## PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS

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

As proteínas e os peptídios antimicrobianos, ribossomicamente sintetizados e secretados por bactérias, são denominadas bacteriocinas (KAISER e MONTVILLE, 1993; NES *et al.*, 1996; CINTAS *et al.*, 1997). O estudo das bacteriocinas começou em 1925, com a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli*. Os estudos estavam centrados apenas nos organismos *Gram*-negativos; entretanto, estas bactérias associavam-se negativamente aos alimentos, ou seja, a sua presença não era desejável. Felizmente, o trabalho com colicinas permitiu o desenvolvimento de métodos de detecção e isolamento de outras classes de bacteriocinas. (LEWUS, 1991)

## Abstract

Changes in consumer lifestyle have created a great demand for products such as “ready to eat” refrigerated food, fresh food (without adding chemical preservatives) and more nutritious food as well. (SILLS-LEVY, 1989; REINECCIUS, 1989). Some psychrotrophic food pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Aeromonas hydrophila* have been emerging because of the increase in the demand for these products (LECHOWICH, 1988; MOTLAGH *et al.*, 1991). Consequently this demand has brought up great interest in new technologies that will be able to both extend shelf life and enhance the microbiological safety of these products. Researches on bacteriocins from lactic acid bacteria have expanded exponentially for the last few years, because of their potential use as natural food preservative. It is assumed that since lactic acid bacteria happen naturally in many food fermentation, their bacteriocins are going to be easily accepted as food additives by healthy authorities and mainly by consumers (GONZALES *et al.*, 1996).

**Key words:** bacteriocins; *Listeria monocytogenes*; lactic acid bacteria.

## BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

Bactérias lácticas são cocos ou bastonetes *Gram*-positivos, não esporogênicos, fermentadores, produtores de ácido láctico como resultado final da fermentação de carboidratos, e apresentam metabolismo e características fisiológicas semelhantes (AXELSSON, 1993). Muitas espécies de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), utilizadas na produção de alimentos fermentados, têm apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo as do mesmo gênero e/ou patógenos. (McMULLEN e STILES, 1996)

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

Nos últimos anos, além da utilização de bactérias lácticas como probióticos, estuda-se também sua aplicação como conservantes em alimentos. Contudo, devido à grande importância econômica das bactérias lácticas para a indústria de fermentação, os estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular desses micror-

ganismos tiveram um avanço significativo, o que levou à detecção de outros compostos que ocasionam o fenômeno da antibiose, como as bacteriocinas (DAVIDSON e HOOVER, 1993). A importância econômica das bactérias lácticas na preservação de alimentos continua estimulando a exploração de bacteriocinas para o uso como conservantes de alimentos. (LEWUS *et al.*, 1991; BAREFOOT e NETTLES, 1993)

Até 1995, mais de 100 bacteriocinas de bactérias lácticas foram identificadas (CHEN *et al.*, 1997). Elas são, em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, que apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado, características anfipáticas; variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e às suas propriedades bioquímicas. (KAISER e MONTVILLE, 1996; VERHEUL *et al.*, 1997)

Segundo BRUNO e MONTVILLE (1994) e EIJSSINK *et al.* (1996), as bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas e exibem propriedades antimicrobianas contra espécies intimamente relacionadas com o organismo produtor. Algumas dessas propriedades são mencionadas abaixo:

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

A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem caracterizada atualmente. Descoberta nos anos 20 e classificada como um antibiótico (apresenta aminoácidos modificados como lantionina e b lantionina) de 34 aminoácidos e peso molecular de 3500 Da (monômero), ela inibe a multiplicação de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes*. É a única bacteriocina produzida comercialmente e legalizada para utilização em alimentos. (STEVENS *et al.*, 1991; GARCERÁ *et al.*, 1993; NETTLES e BAREFOOT, 1993, VERHEUL *et al.*, 1997)

## CLASSIFICAÇÃO

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

**Tabela 1. Classificação das bacteriocinas.**

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

Fonte: CLEVELAND *et al.* (2001)

## BIOSSÍNTESE

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

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

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

## SISTEMA DE IMUNIDADE DO PRODUTOR DE BACTERIOCINA

Os produtores de bacteriocina desenvolveram um sistema de proteção contra suas próprias bacteriocinas, de-

nominado imunidade: cada bacteriocina apresenta a sua própria proteína que lhe confere imunidade, e esta é expressa concomitantemente com a bacteriocina. As proteínas de imunidade apresentam 51 a 150 aminoácidos e, surpreendentemente, não apresentam homologia significativa entre si, enquanto as bacteriocinas apresentam 38 a 55% de similaridade (ABEE *et al.*, 1995; AYMERICH *et al.*, 1996). Essas proteínas permanecem intracelular e se ligam a proteínas de membrana da célula produtora, impedindo a atuação da bacteriocina. (QUADRI *et al.*, 1995)

### MODO DE AÇÃO

Os estudos sobre o mecanismo de alguns lantibióticos e pequenos peptídios termoestáveis revelam que a ação das bacteriocinas ocorre na membrana citoplasmática (MONTVILLE e CHEN, 1998). Dependendo de sua concentração, as bacteriocinas são bactericidas ou bacteriostáticas e atuam permeabilizando as membranas de células sensíveis por meio da formação de poros, o que causa desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato. A consequência da formação de poros é a dissipação da força protônica (PMF), que está envolvida diretamente com a síntese de ATP, fosforilação de proteínas, síntese e rotação dos flagelos, transporte de proteínas etc. (BRUNO e MONTVILLE, 1994). Com a dissipação da força protônica, 98,9% de ATP é hidrolisado, na tentativa de manutenção da PMF. O transporte ativo de aminoácidos cessa e os aminoácidos de reserva são liberados da célula pelos poros formados. Esse distúrbio primário talvez gere outras desordens como lise celular. (GARCERÁ *et al.*, 1993)

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

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

As bacteriocinas da classe II não contêm aminoácidos modificados e, dependendo do gradiente elétrico, estas interagem com receptores para se inserirem na membrana citoplasmática. Entretanto, recentemente, foi demonstrado que

a bacteriocina pediocina PA-1 pode funcionar na ausência de um receptor de proteína. Estas bacteriocinas apresentam uma seqüência comum de aminoácidos YGNGV (Tirosina-Glicina-Asn-Glicina-Valina), provavelmente responsável pela aderência às células sensíveis. (MOLL *et al.*, 1999; ENNAHAR *et al.*, 2000)

Dois mecanismos alternativos foram propostos para descrever detalhadamente os passos que envolvem a permeabilidade da membrana por peptídios líticos com características anfipáticas (Figura 1). Esses mecanismos diferem quanto à forma de inserção da bacteriocina na membrana da célula-alvo. No modelo *Barrel stove*, a bacteriocina se liga como monômero na membrana citoplasmática, insere-se na bicamada lipídica, e os monômeros inseridos agregam-se lateralmente para formar o poro. Estudos utilizando probes fluorescentes mostram que a parte C-terminal da molécula da nisina penetra na porção hidrofóbica da membrana citoplasmática (MARTIN *et al.*, 1996). Outros estudos indicam que a parte C-terminal é responsável pela ligação da molécula na membrana das células sensíveis, e a penetração na camada lipídica é realizada pela parte N-terminal.

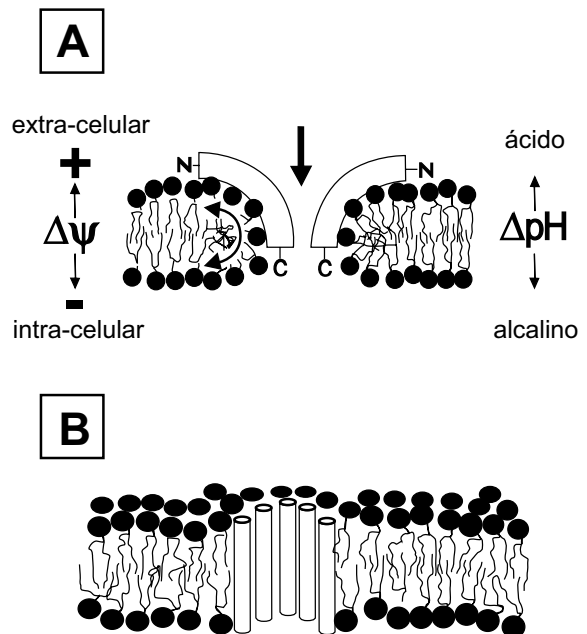


Figura 1. Modelos de formação de poros em membrana citoplasmática de células sensíveis: Wedge-like (A), Barrel-stave (B) (MOLL *et al.*, 1999).

No modelo *Wedge*, a formação de poro é causada por uma atuação local da bicamada lipídica que ocorre quando há ligação das moléculas de bacteriocina: esta é puxada para dentro da membrana pela força protônica (PMF), e sua orientação em relação aos lipídios de cabeça não se altera, pois o peptídeo não entra em contato com a parte hidrofóbica da membrana. (BRUNO e MONTVILLE, 1993)

Segundo MOLL *et al.*, (1999), bacteriocinas da classe I formam poros instáveis, de acordo com o modelo *Wedge*, enquanto bacteriocinas da Classe II aumentam a permeabilidade da membrana pela formação de um poro segundo o modelo *Barrel stave*.

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

### DIFERENÇAS ENTRE BACTERIOCINAS E ANTI-BIÓTICOS

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

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

A tabela 2 apresenta as principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.

### ASPECTOS LEGAIS DO USO DE BACTERIOCINAS

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

Estudos toxicológicos realizados com nisina demonstraram que a sua ingestão não tem efeitos tóxicos para o organismo humano, sendo reportada uma DL50 de 6950 mg/Kg similar ao sal, quando administrada oralmente. A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê do Codex Alimentarius da FAO (Food and

**Tabela 2. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.**

Características	Antibióticos	Bacteriocina
Modo de produção	Sintetizados por enzimas	Síntese Ribossomal
Fase de produção	Metabolismo secundário	Metabolismo primário
Mecanismo de ação	Diversos	Membrana citoplasmática
Aplicação clínica	Sim	Não
Resistência microbiana	Foram encontradas cepas resistentes	Foram encontradas cepas resistentes
Ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano	Não são digeridos	São digeridas

Agriculture Organization) como GRAS (Generally Regarded As Safe), e de uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano na inibição do desenvolvimento pós-germinativo de esporos e formação de toxina por *Clostridium botulinum* em queijos fundidos pasteurizados. Seu uso foi aprovado em 47 países (MORENO, 1995); no Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde (Portaria no 6, 1990), para ser utilizada em preparados à base de queijos fundidos e em queijos fundidos, numa dose máxima de 12,5 mg/Kg. A mesma dose de nisina foi liberada pelo DETEN (Departamento de Técnicas Normativas) do Ministério da Saúde para requeijão (Portaria no 34/1992) e queijo pasteurizado (Portaria no 29/1996) (ABIA, 1996). Em 1998, a Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento, aprovou o uso de nisina em solução de 200 ppm (0,02%) para o emprego em superfícies externas de embutidos, mais especificamente de salchichas de todo tipo. A Tabela 3 apresenta alguns países que permitem o uso de nisina.

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

**Tabela 3. Exemplos de países que permitem o uso de nisina**

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

Fonte: CLEVELAND *et al.* (2001)

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

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

## CONCLUSÃO

Bactérias lácticas têm sido empregadas em alimentos há séculos, especialmente no leite e em produtos de carne. Além da atividade antimicrobiana do ácido láctico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e diacetil, essas bactérias também produzem bacteriocinas, as quais inibem o crescimento de patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes* e *Clostridium*. Usando culturas iniciadoras produtoras de bacteriocinas, ou adicionando bacteriocinas purificadas aos alimentos, é possível reprimir o crescimento de alguns patógenos ou deteriorantes alimentares e, assim, aumentar a segurança microbiológica e o tempo de vida útil do produto. Assumindo-se que bactérias lácticas ocorrem naturalmente em muitos alimentos fermentados, suas bacteriocinas podem ser facilmente aceitas como bioconservantes pelas autoridades da saúde e pelos consumidores.

## 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.*, Amsterdam, v.28, n.2, p.169-85, 1995.
- AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. (eds) *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993, p.1-63.
- AXELSSON, L.T., HOLCK, A. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v. 177, p. 2125-2137, 1995.
- AYMERICH, 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 antilisterial bacteriocinin the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, p.1676-1682, 1996.
- BAREFOOT, S. F., NETTLES, C.G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J Dairy Sci.* v.76, n.8, p.2366-79, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Revisão n.6 do compendio da legislação de alimentos*: atos do Ministério da Saúde. São Paulo: ABIA, 1996. v.1, p.3.31.
- BREUKINK, E., WIEDEMANN, I., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O.P., SAHL, H.G., KRIJFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science.* v.228, p.2361-2364, 1999.
- BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.59, n.9, p. 3003-3010, 1993.
- CHEN, Y. AND MONTVILLE, T.J. Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Bacteriol.* 79, 684-690, 1995.

- CHEN, Y., LUDESCHER, R.D., MONTVILLE, T.J. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.12, p.4770-4777, 1997.
- CHIKINDAS, M.L.; GARCIA-GARCERA, M.L., DRIESSEN A.J.M.; LEDEBOER, A.M.; NISSENMEYER, J. NES IF, ABEE, T.; KONINGS, W.V. AND VENENA, G.N. Pediocin PA-1 a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3577-3584, 1993.
- CHIKINDAS, M.L., MONTVILLE, T.J. Bacteriocins: perspectives for application as a food preservative (in press).
- CINTAS, L.M., CASAUS, P., HAVARSTEIN, L.S., HERNÁNDEZ, P.E., NES, I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel serotype-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.11, p.4321-4330, 1997.
- DAVIDSON, P.M., HOOVER, D.G. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. p.127-159.
- DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, Chicago, v. 44, n.11, p.100-117, 1990.
- DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. *Cerela*, n.8, p.38-43, 1997.
- EIJSSINK, V.G.H., BRURBERG, M.B., MIDDELLHOVEN, P.H., NES, I.F. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.178, n.8, p.2232-2237, 1996.
- ENNAHAR S., SASHIHARA T., SONOMOTO K., ISHIZAKI A.. Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* v.24, n.1. p.85-106, 2000.
- GARCERÁ, M.J.G., ELFERINK, M.G.L., DRIESSEN, A.J.M., KONINGS, W.N. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin: role of proton motive force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v.212, p.417-422, 1993.
- GONZÁLEZ, B., GLAASKER, E., KUNJI, E.R.S., DRIESSEN, A.J.M., SUÁREZ, J.E., KONINGS, W.N. Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, n.8, p.2701-2709, 1996.
- HÜHNE, K., AXELSSON, L., HOLCK, A., KRÖCKEL, L. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lactobacillus sake* strains. *Microbiology*. v.142, p.1437-1448, 1996.
- JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.59, n.2, p.171-200, 1995.
- KAISER, A. L. AND MONTVILLE, T.J. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 75, 536-540, 1993.
- KAISER, A. L. AND MONTVILLE, T.J. Purification of the bacteriocin MN and characterization of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipids Vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(12):4529-4535, 1996.
- KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, v.70, p.337-349, 1988.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, n.12, p.39-85, 1993.
- LECHOWICH, R.V. Microbiological challenges of refrigerated foods. *Food Technol.*, Chicago, n.12, p.84-86, 1988.
- LEWUS, C.B., KAISER, A., MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.
- MARTIN, I., RUYSSCHAERT, J.M., SANDERS, D., GIFFARD, C.J. Interaction of the lantibiotic nisin with membrane revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *Eur. J. Biochem. Oxford*, v.239, p.156-164, 1996.
- McMULLEN, L.M., STILES, M.E. Potential for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, Ames, suppl., p.64-71, 1996.
- MOLL, G.N., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.76, p.185-198, 1999.
- MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.50, p.511-519, 1998.
- MORENO, I. Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de *Lactococcus* e sua utilização no procedimento de queijo Minas Frescal. São Paulo, 1995. (Tese de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP).
- MOTLAGH, A.M., JOHNSON, M.C., RAY, B. Viability loss of foodborne by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.11, p.873-878, 1991.
- NES, I.F., DIEP, D.P., HAVARSTEIN, L.S., BRURBERG, M.B., EIJSINK, V., HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.60, p.113-128, 1996.
- POST, R.C. Regulatory perspective of USDA on the use of antimicrobial and inhibitors in foods. *J. Food Prot. Supp.*, Ames, p.78-81, 1996.

- QUADRI, L.E.N., SAILER, M., TEREbizNIK, M.R., ROY, K.L., VEDERAS, J.C., STILES, M.E. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of the canobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.177, p.1144-1151, 1995.
- REINECCIUS, G.A. Flavor and nutritional concerns relating to the quality of refrigerated foods. *Food Technol.*, Chicago, n.1, p.84-89, 1989.
- RICHARDSON, D. Probiotics and products innovation. *Nutrition and Food Science.*, London, n.4, p.27-33, 1996.
- RUHR, E., SAHL, H.G. Mode of action of peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.27, p.841-845, 1985.
- SAHL, H.G., KORDEL, M., BENZ, R. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.*, v.149, p.120-124, 1987.
- SILLS-LEVY, E. U.S. Food trends leading to the year 2000. *Food Technol.*, Chicago, n.4, p.128-132, 1989.
- STEVENS, K.A., SHELDON, B.W., KLAPES, N.A., KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of Salmonella and others Gram negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.12, p.3613-3615, 1991.
- VERHEUL, A., RUSSELL, N.J., HOF, R.V., ROMBOUTS, F.M., ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.9, p.3451-3457, 1997.