

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização de bacteriocinas produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.)

Fabício Luiz Tulini

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização de bacteriocinas produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Fabrício Luiz Tulini

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Ribeirão Preto
2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãs, familiares e amigos que me apoiaram nessa etapa de minha vida.

Aos amigos de laboratório Bruna, Eliane, Fernanda, Lizziane, Juliana, Marina, Otávio e as técnicas Vanessa e Aline por todo auxílio, apoio e momentos de alegria. Agradeço também à Maria Aparecida e Therezinha pela agradável convivência.

À Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis pela orientação e confiança depositada no meu trabalho.

Ao Laboratório de Toxinas Animais da FCFRP-USP, em especial à Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga, e à Msc. Karla de Castro Figueiredo Bordon pela valiosa colaboração e disponibilidade em ajudar com a purificação e caracterização das bacteriocinas (CLAE e sequenciamento de N-terminal)

Ao *Department of Chemistry* da *University of Alberta* (Edmonton, Canada), em especial ao Prof. Dr. John Christopher Vederas e seus alunos, Christopher Lohans e Clarissa Sit, e a técnica especialista Jing Zheng pela imensa colaboração na caracterização das bacteriocinas por espectrometria de massas (MALDI-TOF e LC-MS/MS).

Ao Laboratório de Processos Farmacêuticos da FCFRP-USP, em especial ao Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira, à Dra. Cláudia Regina Fernandes de Souza e ao técnico Msc. Marcelo Luís Lombardi Martinez pela agradável convivência e auxílio na preparação de amostras.

À Médica Veterinária Renata Andresa Camilli pela grandiosa colaboração no envio de amostras ao exterior.

A todos os funcionários do serviço de Pós-graduação da FCFRP-USP por estarem sempre dispostos quando solicitados, e aos professores do programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pelos conselhos e ensinamentos passados durante o curso.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela disponibilização de suas instalações para a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. 135385/2009-1) pela concessão de bolsa de estudos no início do curso, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão de bolsa de estudos (Proc. 2009/10530-1) e auxílio regular à pesquisa (Proc. 2009/11134-2).

RESUMO

TULINI, F. L. **Caracterização de bacteriocinas produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.)**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O aumento na demanda por alimentos saudáveis e minimamente processados impulsiona a busca por novos agentes antimicrobianos. As bacteriocinas são peptídeos produzidos via ribossomo por algumas espécies de bactérias, podendo ser usadas na conservação e garantia da inocuidade de alimentos, não apresentando as possíveis ações tóxicas de conservadores clássicos amplamente utilizados na indústria alimentícia. *Carnobacterium maltaromaticum* C2 foi isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.), e apresenta grande capacidade de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, demonstrando seu potencial para aplicação na bioconservação de alimentos. Em estudos anteriores, foi demonstrado que essa linhagem bacteriana produz compostos antimicrobianos de origem proteica. Neste trabalho, foram avaliados aspectos gerais da produção de bacteriocinas por *C. maltaromaticum* C2, assim como sua purificação e caracterização. *C. maltaromaticum* C2 produz bacteriocinas entre 5 e 25°C, com ótimo entre 20 e 25°C. Do mesmo modo, a produção desses compostos foi maior em caldo APT (*All purpose Tween*), entretanto para as etapas de purificação foram utilizados o caldo BHI (*Brain heart infusion*) e CAA (*Casamino acids*), por causarem menos interferência no processo. *Lactobacillus sakei* e *L. monocytogenes* foram inibidos pelas bacteriocinas parcialmente purificadas produzidas por *C. maltaromaticum* C2, e seus peptídeos antimicrobianos apresentaram moderada estabilidade térmica quando expostos a 100°C por 30 minutos. Foram utilizadas duas técnicas para extração e purificação das bacteriocinas, a técnica de adsorção-dessorção às células produtoras, e a purificação com a resina XAD-16, baseada em interações hidrofílicas e hidrofóbicas com os peptídeos, seguida de extração em fase sólida, sendo que este último processo de purificação resultou em um extrato com alto teor de pureza, como observado durante as análises por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa. Com o auxílio de técnicas de espectrometria de massas, foi detectado nos extratos obtidos a presença das carnobacteriocinas BM1 e B1, assim como o peptídeo antimicrobiano CbnX. Este trabalho é pioneiro na purificação de CbnX, pois anteriormente havia somente a descrição de seu gene, mas não havia sido descrita a purificação do peptídeo. Neste sentido, a linhagem estudada é única até o momento e poderá favorecer estudos de expressão gênica de bacteriocinas, bem como a otimização de processos de bioconservação.

Palavras-chave: bacteriocinas, *Carnobacterium*, carnobacteriocinas, purificação, *Listeria* sp.

ABSTRACT

TULINI, F. L. **Characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolated from Brazilian smoked fish (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.).** 2011. 103f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The high demand for healthy and minimally processed foods has increased the search for new antimicrobial agents. Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides produced by some bacteria, and are useful for biopreservation and food safety, without the possible toxic effects of classical preservatives widely used in food industry. *Carnobacterium maltaromaticum* C2 was isolated from Brazilian smoked fish (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.), and it inhibits *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. In previous studies, it was demonstrated that this bacterial strain produces bacteriocins. In this study, general aspects of the production of bacteriocins by *C. maltaromaticum* C2 were evaluated, as well as their purification and characterization. *C. maltaromaticum* C2 produces bacteriocins between 5 and 25°C, with the optimum incubation temperature between 20 and 25°C. Similarly, the production of these compounds was higher in APT (All-purpose Tween) broth. However, for the purification steps, BHI (Brain heart infusion) broth and CAA (Casamino acids) broth were used due to their low interference with the processes. *Lactobacillus sakei* and *L. monocytogenes* were inhibited by the partially purified bacteriocins produced *C. maltaromaticum* C2, and their antimicrobial peptides showed moderate thermal stability when tested at 100°C by 30 minutes. Two techniques for extraction and purification of the antimicrobial peptides were used, the adsorption-desorption of bacteriocins to the producer cells, and the purification with XAD-16 resin, based on hydrophilic and hydrophobic interactions with the peptides, followed by a step of solid phase extraction. The latter resulted in an extract with high purity, as observed by the analysis with reverse-phase high performance liquid chromatography. With mass spectrometry techniques, carnobacteriocins BM1 and B1 were detected, as well as the antimicrobial peptide CbnX. This is an innovative work because the purification of CbnX had never been reported, except its gene. In this respect, this *C. maltaromaticum* strain is unique until this moment, and may promote researches on gene expression, as well the optimization of biopreservation processes.

Keywords: bacteriocins, *Carnobacterium*, carnobacteriocins, purification, *Listeria* sp.

RESUMEN

TULINI, F. L. **Caracterización de bacteriocinas producidas por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, aislado de pescado ahumado brasileño (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.)**. 2011. 103f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

El aumento de la demanda de alimentos sanos y mínimamente procesados impulsa la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Las bacteriocinas son péptidos producidos a través de los ribosomas por algunas especies de bacterias, que pueden ser utilizados en la conservación y seguridad alimentaria, sin las posibles acciones tóxicas de los clásicos conservadores utilizados en la industria alimentaria. *Carnobacterium maltaromaticum* C2 fue aislado de pescado ahumado brasileño (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.), y muestra una gran habilidad para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, lo que demuestra su potencial de aplicación en la conservación de alimentos. En estudios anteriores, se ha demostrado que esta cepa bacteriana produce proteínas antimicrobianas. En este estudio, se evaluaron aspectos generales de la producción de bacteriocinas por *C. maltaromaticum* C2, así como su purificación y caracterización. *C. maltaromaticum* C2 produce bacteriocinas entre 5 y 25°C, con óptimo entre 20 y 25°C. Del mismo modo, la producción de estos compuestos fue mayor en caldo APT (*All purpose Tween*), sin embargo, para las etapas de purificación se utilizaron caldo infusión cerebro corazón y caldo CAA (*Casamino acids*) debido a que causan una menor interferencia en el proceso. *Lactobacillus sakei* y *L. monocytogenes* fueron inhibidos por las bacteriocinas parcialmente purificadas producidas por *C. maltaromaticum* C2, y sus péptidos antimicrobianos mostraron estabilidad térmica moderada cuando se exponen a 100°C durante 30 minutos. Se han utilizado dos técnicas de extracción y purificación de bacteriocinas, la técnica de adsorción-desorción de bacteriocinas en las células productoras, basadas en la adsorción y desorción de péptidos en las células productoras, y la purificación con la resina XAD-16, sobre la base de las interacciones hidrofílicas y hidrofóbicas con péptidos, seguido por la extracción en fase sólida. Este último proceso de purificación resultó en un extracto de alta pureza, según lo observado durante el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia en columna de fase inversa. Con la ayuda de las técnicas de espectrometría de masas, se detectó en los extractos la presencia de las carnobacteriocinas BM1 y B1, así como el péptido antimicrobiano CbnX. Este trabajo es pionero en la purificación de CbnX porque antes sólo había la descripción de su gene, pero no se había descrito la purificación de lo péptido. En este sentido, esta cepa es única hasta el momento y puede contribuir con los estudios de la expresión génica de bacteriocinas, así como la optimización de procesos para la conservación de alimentos.

Palabras clave: bacteriocinas, *Carnobacterium*, purificación, carnobacteriocinas, *Listeria* sp.

A humanidade explora há muito tempo o potencial das bactérias lácticas na produção de alimentos em função da sua habilidade de conferir características sensoriais desejáveis a alimentos fermentados, além de inibir a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Este grupo de bactérias é de importância econômica na indústria de alimentos e predomina na microbiota natural de muitos produtos como, por exemplo, leite, carnes, vegetais, e cereais (STILES; HOLZAPFEL, 1997).

A atividade inibitória de bactérias lácticas ocorre em função do aumento da acidez, competição por substratos, além da produção de compostos antimicrobianos tais como peróxido de hidrogênio, diacetil e peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas (PARENTE; RICCIARDI, 1999).

Existe grande interesse na utilização de bacteriocinas na conservação e garantia da inocuidade de alimentos, pois estes compostos não apresentam potencial tóxico como alguns conservadores clássicos, uma vez que são degradados por enzimas digestivas (SIT; VEDERAS, 2008). As bacteriocinas apresentam potencial para aplicação em alimentos minimamente processados, visando a atender a demanda por alimentos saudáveis, inócuos e prontos para o consumo (CLEVELAND et al., 2001).

Atualmente, os pescados minimamente processados são produtos bastante apreciados pelo valor nutricional, pelo sabor e pela maior vida de prateleira em relação ao produto fresco (SONODA et al., 2000). Entretanto, há relatos do envolvimento deste tipo de alimento na transmissão da bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* (FARBER, 2000), estimulando estudos sobre bacteriocinas com atividade antilisteriana para aplicação em pescados, como parte de estratégias de bioconservação, que consiste em explorar a capacidade dos microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir microrganismos que são indesejáveis, quer sejam deteriorantes, quer sejam prejudiciais à saúde (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO et al., 2003).

A bactéria láctica *Carnobacterium piscicola* C2 (atualmente renomeada *C. maltaromaticum* C2), produtora de bacteriocina, foi isolada por Alves et al. (2005) a partir de surubim defumado minimamente processado embalado a vácuo. Essa bactéria apresenta potencial de bioconservação de pescados, pela inibição de *L. monocytogenes* e, no presente trabalho, serão caracterizadas bacteriocinas produzidas por *C. maltaromaticum* C2.

1.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria amplamente distribuída na natureza e transmitida por alimentos crus ou prontos para consumo, podendo causar infecção assintomática ou sintomatologia branda em adultos saudáveis. Entretanto, esse microrganismo pode causar sérios problemas à saúde de pessoas imunodeprimidas, mulheres no período de gestação (e seus fetos) e crianças. A listeriose possui um longo período de incubação, sendo que as pessoas infectadas podem não apresentar sintomas, apresentar gastroenterite ou nos casos mais graves pode ocorrer meningite, septicemia e outras infecções no sistema nervoso central. Em grávidas, a listeriose pode causar aborto espontâneo, nascimento prematuro ou morte fetal (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

L. monocytogenes causa grande preocupação para as indústrias de alimentos, devido à sua capacidade de sobreviver em condições adversas como baixo pH, altas concentrações de cloreto de sódio e baixas temperaturas (NAGHMOUCHI et al., 2007). A capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar em temperatura de refrigeração mostra a necessidade do controle desse microrganismo pelo emprego da tecnologia dos obstáculos em que as bacteriocinas podem desempenhar um papel importante (AZUMA et al., 2007).

1.2 Bactérias lácticas (BAL)

As BAL são um grupo filogeneticamente diverso de bactérias Gram-positivas, catalase negativas, desprovidas de citocromos, ácido-tolerantes, não formadoras de esporos, anaeróbias e aerotolerantes. As BAL são estritamente fermentativas, possuindo em comum a capacidade de produzir ácido láctico, e compreendem diferentes membros da ordem Lactobacillales. Podem ser divididas em bacilos (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (todos os outros gêneros) (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007; AXELSSON, 1993).

As linhagens pertencentes ao gênero *Carnobacterium* foram inicialmente isoladas de produtos cárneos e denominadas como “lactobacilos não-acidúricos”, mas diferentemente de lactobacilos, não eram capazes de crescer em ágar acetato (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Espécies do gênero *Carnobacterium* são comumente isoladas de alimentos e de ambiente, principalmente de locais onde predominam baixas temperaturas como, por exemplo, lagos polares e geleiras. *C. divergens* e *C.*

maltaromaticum são as espécies mais frequentemente isoladas, ocorrendo geralmente em produtos lácteos, carnes, peixes e camarões (LEISNER et al., 2007).

A espécie *Carnobacterium maltaromaticum* surgiu da reclassificação das espécies *Carnobacterium piscicola* e *Lactobacillus maltaromicus*, com base em estudos de RAPD (*randomic amplified polymorphic DNA*) e espaçamento intergênico de regiões 16S-23S do rDNA (Mora et al., 2003). Atualmente, o gênero *Carnobacterium* é composto por 9 espécies: *C. alterfunditum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. inhibens*, *C. maltaromaticum*, *C. mobile*, *C. pleistocenium* e *C. viridans* (LEISNER et al., 2007).

Os relatos de isolamento de linhagens do gênero *Carnobacterium* são escassos na América Latina, mas *C. piscicola* L103 já foi isolado no Chile a partir de carne embalada a vácuo (SCHÖBITZ et al., 2003) e *C. piscicola* C2 (atualmente *C. maltaromaticum* C2) foi isolado no Brasil, a partir de peixe surubim refrigerado minimamente processado (ALVES et al., 2005).

C. maltaromaticum pode ocorrer como patógeno oportunista, causando infecções crônicas em peixes com a saúde debilitada (MICHEL et al., 2007). Entretanto, *C. maltaromaticum*, *C. divergens* e *C. inhibens* têm sido relatados como microrganismos residentes do trato gastrintestinal de trutas e salmonídeos, exercendo função inibitória da multiplicação de algumas bactérias e fungos, prevenindo danos causados por esses patógenos (YU et al., 2008).

Vários estudos já foram realizados com bacteriocinas produzidas por espécies do gênero *Carnobacterium*, mostrando seu grande potencial para utilização como bioconservador em alimentos (KHOUITI; SIMON, 1997; SCHÖBITZ et al., 2003; STOFFELS et al., 1992). Recentemente, o uso de *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 produtor de bacteriocinas foi aprovado nos EUA e Canadá para aplicação na conservação de produtos cárneos (MARTIN-VISSCHER et al., 2011).

No Brasil, Alves et al. (2005) avaliaram o potencial de *C. maltaromaticum* C2 para inibição de *L. monocytogenes* em pescado, sendo detectada a produção de bacteriocina em caldo de salmão defumado e caldo de surubim defumado. No mesmo trabalho, também foi observada uma redução na multiplicação de *L. monocytogenes* em caldos de peixe. Entretanto, *C. maltaromaticum* C2 teve a multiplicação lenta a 10°C em homogeneizado de surubim defumado.

Reis et al. (2011) verificaram que *C. maltaromaticum* C2, em conjunto com extratos de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), quando adicionados em

homogeneizado de surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) apresentou redução na população de *L. monocytogenes* nas amostras incubas a 5°C por 35 dias. Esses dados demonstraram que a utilização de *C. maltaromaticum* C2 e seus peptídeos antimicrobianos em pescado pode ser uma boa alternativa para a garantia da inocuidade deste tipo de alimento.

1.3 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados via ribossomo, produzidas por bactérias como uma estratégia de defesa (OSCARIZ; PISABARRO, 2001), e representam uma alternativa interessante aos conservadores tradicionais de alimentos por apresentarem boa segurança, sendo destruídas por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal (GUINANE et al., 2005; ABRIOUEL et al., 2003).

Possuem em geral pequeno espectro de ação, inibindo espécies relacionadas à linhagem produtora, a qual possui imunidade à bacteriocina produzida. Muitas bacteriocinas podem ser isoladas a partir de alimentos como carne e laticínios, visto que estes contêm naturalmente bactérias lácticas. Esse fato sugere que a humanidade vem consumindo esses peptídeos há séculos, o que indica a segurança de seu uso como bioconservador em alimentos (CLEVELAND et al., 2001).

A nisina é uma bacteriocina produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* e tem seu uso em alimentos aprovado em mais de 40 países, sendo utilizada como conservador alimentar há mais de 50 anos (CLEVELAND et al., 2001).

Apesar de várias propostas para a classificação das diferentes bacteriocinas conhecidas, devido à heterogeneidade destes compostos, ainda não há um consenso sobre o assunto (COTTER; HILL; ROSS, 2005). Um esquema de classificação foi proposto por Cotter, Hill e Ross (2005) no qual as bacteriocinas foram divididas nas classes I, II e III.

Por esta classificação, na classe I (lantibióticos) ficaram compreendidas as bacteriocinas que passam por intensa modificação pós-traducional (DRIDER et al., 2006), apresentando aminoácidos modificados como a lantionina, metil-lantionina, deidroalanina, deidrobutirina, entre outros, sendo que essas modificações contribuem não só para a estrutura e função da bacteriocina, mas também para a sua maior resistência à proteólise e oxidação (FIELD et al., 2010; ROSS; VEDERAS, 2011). Essa classe pode ainda ser subdividida em grupo A, contendo peptídeos alongados e carregados positivamente e o grupo B, contendo peptídeos globulares

sem carga (NES; YOON; DIEP, 2007). Dentro do grupo A, existem os peptídeos que tem atividade isoladamente, e os compostos de dois peptídeos que têm atividade sinérgica (ROSS; VEDERAS, 2011). Os lantibióticos podem interferir na síntese da parede celular e formar poros, podendo ser auxiliados ou não por alvos celulares específicos, como por exemplo, o lipídio II da membrana de bactérias (CHATTERJEE et al., 2005). Entretanto, alguns lantibióticos globulares como a mesardicina atuam apenas inibindo a síntese de peptídeoglicanos (NES; YOON; DIEP, 2007).

Na classe II ficaram agrupadas as bacteriocinas que são termoestáveis, com massa molecular menor que 10kDa e nenhum aminoácido modificado, e que geralmente têm sua ação por meio do aumento da permeabilidade da membrana da célula alvo. Foram também propostas quatro subclasses: (i) a classe IIa, que agrupa os peptídeos que tem ação bactericida pela quebra de integridade da membrana citoplasmática; (ii) a classe IIb, que agrupa complexos formadores de poros, compostos por dois peptídeos; (iii) a classe IIc, que agrupa as bacteriocinas que têm suas extremidades N-terminal e C-terminal covalentemente ligadas, formando uma estrutura cíclica; (iv) a classe IId, que agrupa as bacteriocinas que não se encaixam nos outros subgrupos (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A classe III (bacteriolisinas) agrupa bacteriocinas termossensíveis, com massa molecular maior que 30kDa. Essas bacteriocinas possuem uma estrutura que contém vários domínios com funções de translocação, ligação a receptor e morte celular. O mecanismo de ação dessa classe de bacteriocinas se dá pela lise das células por meio da catálise da hidrólise da parede celular (COTTER, HILL e ROSS, 2005).

A Figura 1 apresenta o modo de ação das três classes de bacteriocinas citadas anteriormente, como proposto por Cotter, Hill e Ross (2005).

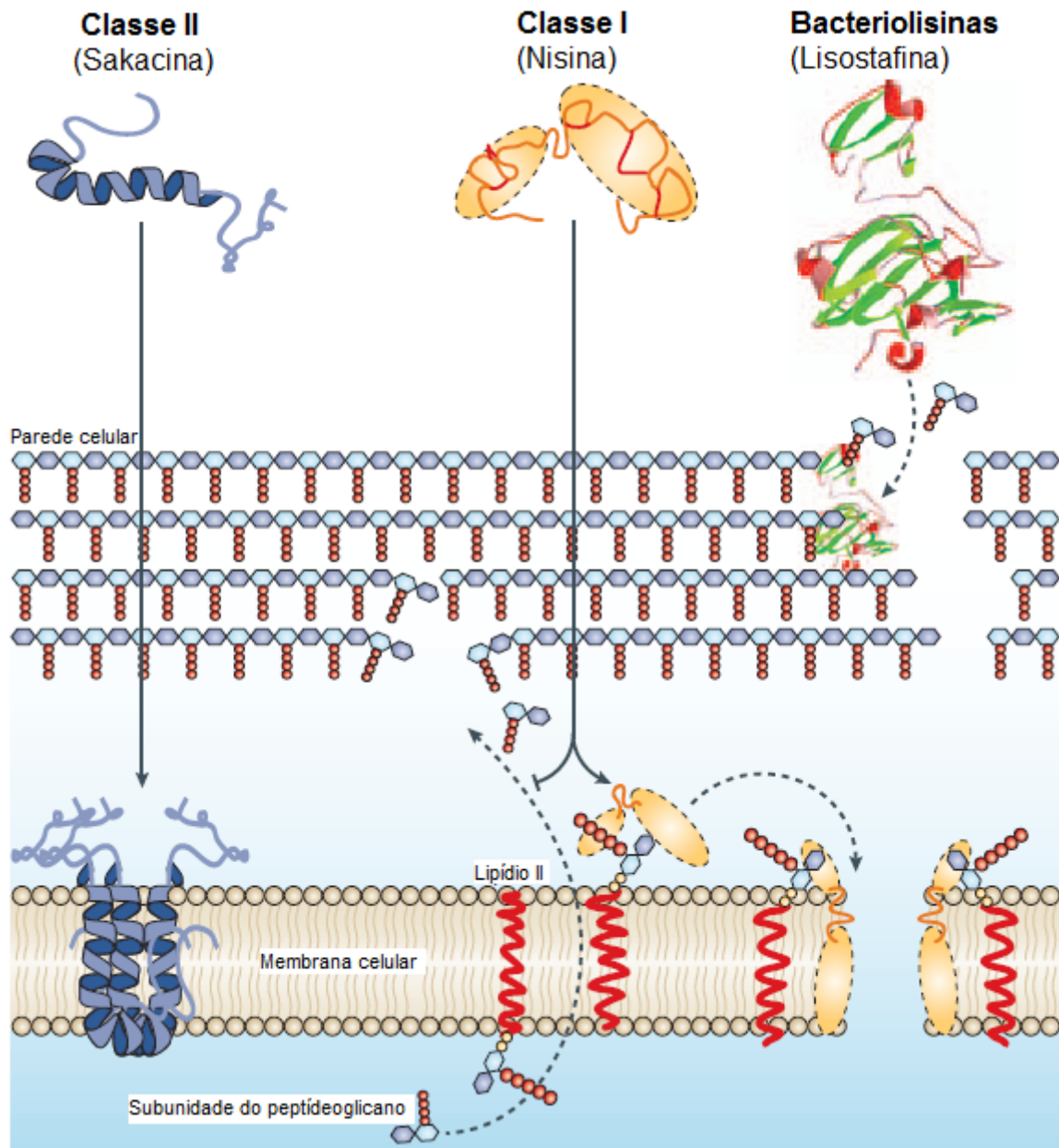


Figura 1. Modo de ação de bacteriocinas das classes I, II e III (modificado de Cotter, Hill e Ross, 2005).

Muitas bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são produzidas como pré-peptídeos, os quais são separados de uma sequência líder para formar uma molécula biologicamente ativa (JACK; TAGG; RAY, 1995). A maioria dos pré-peptídeos das bacteriocinas não-lantibióticas possuem dois resíduos de glicina na região de clivagem, e esta característica direciona a excreção destes peptídeos por meio de transportadores ligantes de ATP. A grande família de transportadores ligantes de ATP está presente em células Gram-positivas e Gram-negativas, direcionando a excreção de substâncias como, por exemplo, antibióticos, substâncias não-proteicas e peptídeos (CINTAS et al., 2001). Além de auxiliar no

transporte para o exterior da célula, a sequência líder mantém a bacteriocina no meio intracelular de forma biologicamente inativa, protegendo a célula produtora dos efeitos tóxicos desses peptídeos (SHPAKOV, 2009).

Os genes responsáveis pela produção de bacteriocinas ativas geralmente estão localizados em *clusters* de *operons*, sendo que estes podem estar no cromossomo, plasmídeo ou em um *transposon*. As células produtoras também possuem os genes responsáveis pela síntese de proteínas que atuam na ativação e transporte das bacteriocinas, assim como na imunidade e na regulação da produção (CLEVELAND et al., 2001). Recentemente foi sequenciado o genoma de *Carnobacterium* sp. 17-4, isolado de água do mar congelada, fornecendo dados que podem auxiliar na elucidação dos mecanismos relacionados à produção de bacteriocinas por espécies desse gênero (VOGET et al., 2011).

Segundo Sit e Vederas (2008), as bacteriocinas podem servir como base para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, contribuindo para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos. Nesse contexto, Rihakova et al. (2010) avaliaram a atividade *in vivo* da bacteriocina divercina V41, produzida por expressão heteróloga em *E. coli* e suas formas variantes com trocas em alguns resíduos de aminoácidos, no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* administrada por via endovenosa em camundongos. A forma não modificada da divercina V41 foi eficaz no controle da multiplicação do patógeno em 80% dos animais avaliados, entretanto as variantes estruturais dessa bacteriocina apresentaram uma atividade reduzida. A estabilidade e atividade *in vivo* desse peptídeo mostrou seu potencial para uso como coadjuvante de agentes antibióticos no tratamento de infecções por *L. monocytogenes*.

A maioria das bacteriocinas é altamente catiônica em pH 7, sendo esta uma característica comum entre lantibióticos e não-lantibióticos. A carga líquida das bacteriocinas faz com que estas moléculas tenham alta atividade antibacteriana em pH ácido (<5), conforme as condições do *habitat* da bactéria produtora. Esta maior atividade pode ser explicada por diversos eventos que ocorrem em pH baixo: (i) ocorre menor agregação entre peptídeos hidrofílicos, com maior disponibilidade destes para ação na célula sensível; (ii) há menores quantidades de bacteriocinas aderidas à parede das células produtoras; (iii) as bacteriocinas hidrofílicas podem passar mais facilmente por regiões hidrofílicas da membrana de células sensíveis;

(iv) a interação de não-lantibióticos com sítios alvo da membrana da célula sensível poder ser inibida em pH elevado (JACK; TAGG; RAY, 1995).

1.4 Bacteriocinas produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum*

Já foram descritas na literatura bacteriocinas produzidas por diferentes linhagens de *C. maltaromaticum* pertencentes às classes dos lantibióticos, classe IIa e das bacteriocinas cíclicas, de acordo com a classificação proposta por Cotter, Hill e Ross (2005). A carnocina U149, produzida por *C. maltaromaticum* U149, foi classificada como um lantibiótico (STOFFELS et al., 1992). Quadri et al. (1994) classificaram as carnobacteriocinas BM1 e B2, produzidas por *C. maltaromaticum* LV17B, como pertencentes à classe IIa. A piscicolina 126 (JACK et al., 1996) produzida por *C. maltaromaticum* JG126, isolado de presunto, e a piscicocina CS526 (YAMAZAKI et al., 2005) produzida por *C. maltaromaticum* CS526, isolado de surimi, foram classificadas também como de classe IIa. Em 2008, Martin-Visscher et al. descreveram a carnociclina A, produzida por *C. maltaromaticum* UAL307 isolado de carne de porco, a primeira bacteriocina cíclica produzida por uma espécie de *Carnobacterium*.

As bacteriocinas produzidas por diferentes linhagens de *C. maltaromaticum*, estão apresentadas na Tabela 1, e as sequências de aminoácidos de algumas dessas bacteriocinas estão representadas na Tabela 2.

Tabela 1. Principais bacteriocinas de *Carnobacterium maltaromaticum* já descritas

Bacteriocina	Classe ⁽¹⁾	Massa (Da)	Referência
carnocina U149	I (lantibiótico)	4635	Stoffels et al., 1992
carnobacteriocina BM1	IIa	4524	Quadri et al., 1994
carnobacteriocina B1 ⁽²⁾	IIa	4540	Quadri et al., 1994
carnobacteriocina B2	IIa	4969	Quadri et al., 1994
piscicolina 126 (Piscicocina V1a)	IIa	4416	Jack et al., 1996
piscicocina CS526	IIa	4430	Yamazaki et al., 2005
carnociclina A	IIc (cíclica)	5862	Martin-Visscher et al., 2008

⁽¹⁾ Segundo classificação proposta por Cotter, Hill e Ross (2005)

⁽²⁾ Forma oxidada da carnobacteriocina BM1.

Tabela 2. Sequência de aminoácidos de algumas bacteriocinas produzidas por diferentes linhagens de *Carnobacterium maltaromaticum*, com destaque em negrito para as sequências consenso da classe IIa⁽¹⁾

Bacteriocina	Sequência e posição ⁽²⁾				
	1	11	21	31	41
carnobacteriocina BM1	AIS YGNGV YCN	KEKCWVNKAE	NKQAITGIVI	GGWASSLAGM	GH
carnobacteriocina B2	V NYGNGV SCS	KTKCSVNWGQ	AFQERYTAGI	NSFVSGVASG	AGSIGRRP
piscicolina126	K YYGNGV SCN	KNGCTVDWSK	AIGIIGNNAA	ANLTTGGAAG	WNKG
pisciocina CS526	K YYGNGL SXN	KKGXTVDWGT	AIGIIGNNAA	ANXATGGAAG	XNK

⁽¹⁾ Yamazaki et al., 2005 (modificado).

⁽²⁾ "X" indica resíduos não identificados*.

A produção de carnobacteriocina BM1 por diferentes linhagens de *C. maltaromaticum* já foi descrita em *C. maltaromaticum* LV17B, *C. maltaromaticum* CP5 e *C. maltaromaticum* UAL307 (QUADRI et al., 1997; HERBIN et al., 1997; MARTIN-VISSCHER et al., 2008). Essa bacteriocina pertence à classe IIa, com a sequência consenso YGNGV, e possui resíduos de cisteína nas posições 10 e 15, os quais formam pontes dissulfeto e como as outras bacteriocinas de classe IIa, apresenta grande estabilidade térmica. É produzida como um pré-peptídeo contendo uma sequência líder de 18 resíduos de aminoácidos onde ocorre a clivagem em dois resíduos de glicina das posições -2 e -1 para gerar o peptídeo ativo (Figura 2). A carnobacteriocina B1 possui a mesma sequência de aminoácidos da carnobacteriocina BM1, mas apresenta um resíduo de metionina oxidado e tem menor atividade antimicrobiana (QUADRI et al., 1997).

De acordo com Quadri et al. (1995), o gene que codifica a carnobacteriocina BM1 em *C. maltaromaticum* LV17B está localizado no cromossomo, sendo que essa linhagem possui um plasmídeo que codifica a carnobacteriocina B2. Esse plasmídeo foi analisado por Quadri et al. (1997), onde foram descritos os genes para outras três proteínas com provável ação antimicrobiana: *cbnX*, *cbnY* e *cbnS*. Embora essas proteínas não tenham sido isoladas por Quadri et al. (1997), foi atribuída a elas atividade antimicrobiana porque seus genes contêm uma sequência codificadora de um peptídeo líder com dois resíduos de glicina na sua porção C-terminal, como ocorre nas bacteriocinas de classe IIa (Figura 2).

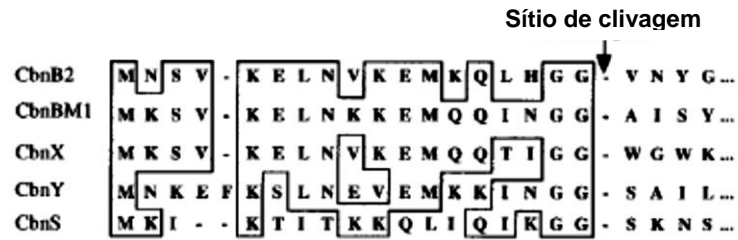


Figura 2. Alinhamento das seqüências N-terminais das carnobacteriocinas B2 e BM1, assim como as seqüências N-terminais previstas para os peptídeos codificados pelos genes *cbnX*, *cbnY* e *cbnS*, como apresentado por Quadri et al. (1997, com modificações).

Diante do potencial bioconservador de *C. maltaromaticum* C2 e da falta de dados sobre as estruturas das bacteriocinas produzidas por esta linhagem, no presente trabalho foi realizada a extração, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos por esta bactéria.

6. Conclusões

- A melhor condição de cultivo de *C. maltaromaticum* C2 visando à purificação de bacteriocinas foi obtida em caldo CAA a 20°C;
- A produção de bacteriocinas por *C. maltaromaticum* C2 ocorre partir de 4 horas de incubação, atingindo o máximo em 24h, quando cultivado em caldo BHI a 20°C;
- *C. maltaromaticum* C2 também produz bacteriocinas em caldo BHI quando cultivado a 5°C, indicando o potencial dessa linhagem para a bioconservação de alimentos refrigerados, especialmente para inibição do patógeno *L. monocytogenes*;
- Os bacteriocinas produzidas por *C. maltaromaticum* C2 parcialmente purificadas por extração com resina XAD-16 e extração em fase sólida apresentaram moderada estabilidade térmica, com retenção de 50% de atividade a 70°C por 15 minutos;
- A técnica de purificação com resina XAD-16 e extração em fase sólida, em comparação a técnica de adsorção-dessorção de bacteriocinas às células produtoras, permitiu maior rendimento na purificação de bacteriocinas produzidas por *C. maltaromaticum* C2;
- *C. maltaromaticum* C2 produz no mínimo três peptídeos com atividade antimicrobiana: as carnobacteriocinas B1 e BM1 já descritas na literatura e a carnobacteriocina CbnX, caracterizada de forma pioneira neste trabalho.

7. Referências

ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; MARTINEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M.; GALVEZ, A. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 599-605, 2003.

AHN, C.; STILES, M. Plasmid associated bacteriocin production by a strains of *Carnobacterium piscicola* from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 2503-2510, 1990.

ALVES, V. F.; DE MARTINIS, E. C. P.; DESTRO, M. T.; VOGEL, B. F.; GRAM, L. Antilisteral activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (Surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. **Journal of Food Protection**, v. 11, p. 2068-2077, 2005.

AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. T. **Lactic acid bacteria**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1993, p. 1-63.

AZUMA, T.; BAGENDA, D. K.; YAMAMOTO, T.; KAWAI, Y.; YAMAZAKI, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by freeze-dried piscicocin CS526 fermentate in food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 138-144, 2007.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BHUGALOO-VIAL, P.; DOUSSET, X.; METIEVIER, A.; SOROKINE, O.; ANGLADE, P.; BOYAVAL, P.; MARION, D. Purification and amino acid sequences of Piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4410-4416, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CANTU, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S.; Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 1-16, 1997.

CHATTERJEE, C.; PAUL, M.; XIE, L.; VAN DER DONK, W. A. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 633-683, 2005.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of protein in polyacrylamide gels. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HERRANZ, C.; HAVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces Enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent Enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed Enterocin Q. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6806-6814, 2000.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7(4), p. 281 – 305, 2001.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 777-788, 2005.

D'ANGELIS, C. E. M.; POLIZELLO, A. C. M.; NONATO, M. C.; SPADARO, A. C. C.; DE MARTINIS, E. C. P. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence of Sakacin 1, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* 1. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 4, p. 636-649, 2009.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 114-119, 2003.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; MCMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DUARTE, R. M. B. O.; DUARTE, A. C. Application of non-ionic solid sorbents (XAD resins) for the isolation and fractionation of water-soluble organic compounds from atmospheric aerosol. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 51, p. 79-93, 2005.

ELEGADO, F. B.; KIM, W. J.; KWON, D. Y. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 1-11, 1997.

FARBER, J. M. FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 71, 2000.

FIELD, D.; HILL, C.; COTTER, P. D.; ROSS, P. R. The dawning of a "Golden era" in lantibiotic bioengineering. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1077-1087, 2010.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1316-1325, 2005.

GURSKY, L. J.; MARTIN, N. I.; DERKSEN, D. J.; VAN BELKUM, M. J.; KAUR, K.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E.; MCMULLEN, L. M. Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL126 is controlled by temperature and induction peptide concentration. **Archives of Microbiology**, v. 186, p. 317-325, 2006.

GUYONNET, D.; FREMAUX, C.; GENATIEMPO, Y.; BERJEAUD, J. M. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1744-1748, 2000.

HASTINGS, J. W.; SAILER, M.; JOHNSON, K.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; SITLES, M. E. Characterization of Leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **Journal of Bacteriology**, v.173, n. 23, p. 7491-7500, 1991.

HERBIN, S.; MATHIEU, F.; BRULE, F.; BRANLANT, C.; LEFEBVRE, G.; LEBRIHI, A. Characteristics and genetic determinants of bacteriocins activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. **Current Microbiology**, v. 35, p. 319-326, p. 1997.

HOBEN, H.J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 1246-1247, 1982.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, p. 171-200, 1995.

JACK, R. W.; WAN, J.; GORDON, J.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B. E.; HILLIER, A. J.; WETTENHALL, R. E. H.; HICKEY, M. W.; COVENTRY, M. J. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2897-2903, 1996.

JAMUNA, M.; JEEVARATNAM, K. Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 433-439, 2004.

KHOUITI, Z.; SIMON, J. P. Detection and partial characterization of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* 213. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 28-33, 1997.

KHOUITI, Z.; SIMON, J. P. Carnocin KZ213 produced by *Carnobacterium piscicola* 213 is adsorbed onto cells during growth. Its biosynthesis is regulated by temperature, pH and medium composition. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 5-10, 2004.

LEISNER, J. J.; LAURSEN, B. G.; PREVOST, H.; DRIDER, D.; DALGAARD, P. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 592-613, 2007.

MARTIN-VISSCHER, L. A.; VAN BELKUM, M. J.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; WHITTAL, R. M.; ZHENG, J.; MCMULLEN, L. M.; VEDERAS, J. C. Isolation and characterization of Carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n. 15, p. 4756-4763, 2008.

MARTIN-VISSCHER, L. A.; YOGANATHAN, S.; SIT, C. S.; LOHANS, C. T.; VEDERAS, J. C. The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 317, p. 152-159, 2011.

MASS SPECTROMETRY RESOURCE. Mass spectrometry and biotechnology resource. Disponível em <<http://www.ionsource.com/>>. Acesso em: 14 Out. 2010.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. **Methods in Microbiology**, v. 7, p. 313-342, 1972.

MICHEL, C.; PELLETIER, C.; BOUSSAHA, M.; DOUET, D.; LAUTRAITE, A.; TAILLIEZ. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2947-2955, 2007.

MORA, D.; SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; COLOMBO, S.; GALLI, A. Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 675-678, 2003.

NAGMOUCHI, K.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 24, n. 7-8, p. 718-727, 2007.

NES, I.; YOON, S.; DIEP, D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 675-690, 2007.

NILSSON, L.; NG, Y. Y.; CHRISTIANSEN, J. N.; JORGENSEN, B. L.; GROTH, D.; GRAM, L. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 133-143, 2004.

OSCARIZ, J. C.; PISABARRO, A. G.; Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **International Microbiology**, v. 4, p. 13-19, 2001.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 52, p. 628-638, 1999.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 546-553, 2007.

PROTEIN PROSPECTOR. Peptide / Protein MS Utility Programs. Disponível em <<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>>. Acesso em: 14 Out. 2010.

QUADRI, L. E. N.; SAILER, M.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 16, p. 12204-12211, 1994.

QUADRI, L. E. N.; SAILER, M.; TEREbiznik, M. R.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 1144-1151, 1995.

QUADRI, L. E. N.; KLEEREBEZEM, M.; KUIPERS, O. P.; DE VOS, W.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 19, p. 6163-6171, 1997.

REIS, F. B.; DE SOUZA, V. M.; THOMAZ, M. R. S.; FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W. P.; DE MARTINIS, E. C. P. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n.3, 228-234, 2011.

RIHAKOVA, J.; CPPELIER, J.; HUE, I.; DEMNEROVA, K.; FEDERIGHI, M.; PREVOST, H.; DRIDER, D. *In vivo* activities of recombinant Divercin V41 and its structural variants against *Listeria monocytogenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 563-564, 2010.

ROSS, A. C.; VEDERAS, J. C. Fundamentals functionality: recente developments in understanding the structure-activity relationships of lantibiotic peptides. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 27-34, 2011.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

SCHÖBITZ, R.; SUAZO, V.; COSTA, M.; CIAMPI, L. Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 237-244, 2003.

SHPAKOV, A. O. Peptide autoinducers in bacteria. **Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 255-266, 2009.

SIT, C. S.; VEDERAS, J. C. Approaches to the discovery of new antimicrobial agents based on bacteriocins. **Biochemistry and Cell Biology**, v.86, p. 116-123, 2008.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 7ed. Rio de Janeiro: RTC, 2001. 645p. Volume 1.

SONODA, D. Y.; FILHO, J. D. S.; SHIROTA, R.; CYRINO, J. E. P. Situação atual e perspectivas da comercialização do pescado no estado de São Paulo. 2000. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/Socio/SONODA-021.pdf>>. Acesso em: 12 de maio de 2011.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.

STOFFELS, G.; NISSEN-MEYER, J.; GUMUNSDÓTTIR, S.; SLETTEN, K.; HOLO, H.; NES, I. F. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1417 – 1422, 1992.

STOFFELS, G.; SAHL, H. G.; GUDMUNSDÓTTIR, A. Carnocin UI49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various gram-positive bacteria including *Listeria* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 199-210, 1993.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, p. 722-756, 1976.

TAHIRI, I.; DESBIENS, M.; BENECH, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; THIBAUT, S.; OUELLET, D.; FLISS, I. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 123-136, 2004.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. Parameters affecting the adsorption of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423 isolated from sorghum beer. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 405-409, 2006.

TULINI, F. L.; DE MARTINIS, E. C. P. Improved adsorption-desorption extraction applied to the partial characterization of the antilisterial bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* C2. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 493-496, 2010.

TULINI, F. L.; REIS, F. B.; DE MARTINIS, E. C. P. Caracterização preliminar da produção e estabilidade da bacteriocina produzida por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]). In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 8., 2009, Campinas. **CD-ROM de Resumos**. Campinas: Associação Latino Americana de Ciência de Alimentos, 2009. 1 CD-ROM.

VOGET, S.; KLIPPEL, B.; DANIEL, R.; ANTRANIKIAN, G. Complete genome sequence of *Carnobacterium* sp. 17-4. **Journal of Bacteriology**, doi:10.1128/JB.05113-11.

WANG, W.; LIU, Q.; CUI, H. Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulfate fractionation. **Electrophoresis**, v. 28, p. 1-3, 2007.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations**. 3ed. New York: Wiley-VCH, 2001. 349p.

WOROBO, R. W.; VAN BELKUM, M. J.; SAILER, M.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 11, p. 3143-3149, 1995.

YAMAZAKI, K.; SUZUKI, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; MONTVILLE, T. J. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surumi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 554 – 557, 2005.

YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel method to extract large amount of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3335-3359, 1992.

YU, H.; WANG, Z.; LIU, L.; XIA, Y.; CAO, Y.; YIN, Y. Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, 2008.