



Enterocina-35, una Bacteriocina con Actividad Sobre *Listeria monocytogenes*. Posible Uso en la Industria de Alimentos

R. CONCHA,^{1*} M. E. FARIAS,² R. KÜMMERLIN,¹ AND F. SESMA²

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile. ² Centro de Referencia para Lactobacilos de Argentina, Cerela, Argentina.

* Autor para la correspondencia: Tel. 56-41-203535. Fax 54-41-2035636. E-mail rconcha@udec.cl

ABSTRACT. The *in vitro* inhibitory activity of enterocin-35 produced by *Enterococcus faecium* CRL 35, was studied against *Listeria monocytogenes*, isolated from sea foods. Optimal growth conditions of the enterocin-35 producing strain, for higher bacteriocin production and improve the extraction and purification of these peptides, were applied. A crude extract of enterocin-35 was assayed in a frozen seafood artificially contaminated with *Listeria monocytogenes* isolate, simulating at laboratory scale an eventual application of this biopreservant in a routine production process at factory level. The feasibility of biopreservation of seafoods by means of bacteriocins is proposed and discussed.

Key Words: Bacteriocin, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*.

RESUMEN. Se estudió la actividad inhibitoria *in vitro* de enterocina-35 producida por *Enterococcus faecium* CRL 35, contra *Listeria monocytogenes* aislada desde productos marinos. Se aplicaron las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa productora de enterocina-35 y un método de extracción y purificación de estos péptidos para obtener los más altos rendimientos de producción de la bacteriocina. Se ensayó la actividad de un extracto crudo de enterocina-35 sobre un producto marino congelado artificialmente contaminado con *Listeria monocytogenes*, simulando a escala de laboratorio una eventual aplicación de este biopreservante en un proceso industrial. Se propone y discute la factibilidad de biopreservación de alimentos marinos por medio de bacteriocinas.

Palabras Clave: Bacteriocina, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

El término bacteriocina fue formalmente descrito por Jacob *et al*¹⁸, para designar moléculas, sintetizadas por especies bacterianas de la familia Enterobacteriaceae, las que además de presentar características antibióticas, presentan actividad bactericida intraespecífica sobre especies homólogas, al unirse a receptores específicos de la superficie celular y hacer actuar un grupo proteico biológicamente activo.

Sin embargo, además de las enterobacterias, numerosas bacterias productoras de ácido láctico, presentes en plantas y animales, pueden producir bacteriocinas con actividad sobre especies bacterianas patógenas.^{2,3,4,5,9,23} Estas bacteriocinas de bacterias ácido lácticas difieren de las producidas por enterobacterias en: (a) su expresión genética puede estar codificada por plásmidos o asociada a transposones;¹⁸ (b) su acción bactericida sobre especies de bacterias Gram positivas generalmente relacionadas;^{32,33} (c) su naturaleza proteica, de bajo peso molecular^{27,30} y (d) su ocasional estructura de varias cadenas polipeptídicas^{1,25,36,37} o de proteínas asociadas a lípidos o grupos de carbohidratos.^{20,34,35}

El conocimiento de su acción bactericida, estructura espacial, peso molecular y secuencias aminoacídicas permitió a Klaenhammer²¹ clasificar las bacteriocinas de las

bacterias ácido lácticas en cuatro clases denominadas como I, II, III y IV internacionalmente aceptadas.

Por otra parte, la presencia de cisteína como constituyente estructural de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas, permitieron a Jack *et al*¹⁷ postular la siguiente clasificación alternativa, como lantibióticos, cistibióticos y tiolibióticos.

El mecanismo mediante el cual las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas ejercen su acción letal no está aun del todo claro, pero parece ser que las células que actúan como blanco de acción de estas moléculas perderían su viabilidad debido a que las bacteriocinas se unen primariamente a receptores de tipo no específico a estas células (el ácido lipoteicoico) y que solo cuando estos sitios están saturados, y la pared ha cambiado de configuración espacial por interacciones moleculares, las bacteriocinas tendrían acceso a receptores específicos ubicados a nivel de membrana citoplasmática, lo que provocaría cambios en la integridad de ésta.⁵

Como resultado de esta desintegración, las células perderían iones potasio, moléculas absorbentes de radiaciones ultravioleta y otros componentes celulares hasta llegar a la muerte. En bacterias Gram positivas resistentes, no existirían receptores específicos, o éstos no estarían disponibles para la unión.⁶



Por las características de síntesis, actividad e inocuidad, diversas aplicaciones de uso de las bacteriocinas se han descrito como preservante biológico de alimentos de diverso origen.^{11,15,26,29,31} Esta aceptación del empleo de bacteriocinas como una alternativa "natural" para la preservación de alimentos ha despertado interés en productores cuyos mercados les presentan exigencias estrictas de calidad microbiológica.

Uno de ellos es el sector pesquero, que a partir de materia prima de alta perecibilidad, debe ser capaz de ofrecer productos terminados de larga duración, para poder acceder a mercados internacionales. No solo interesa una reducida carga microbiana, sino la ausencia de patógenos de importancia sanitaria que constituyen un riesgo epidemiológicos.

En este sentido, la bacteria *Listeria monocytogenes* a tomado gran importancia y se encuentra prescrita en la mayoría de las normativas de calidad de los mercados externos por ser el agente etiológico de la listeriosis, una enfermedad infecciosa transmitida también por los alimentos, que se manifiesta en infecciones intrauterinas, granulomatosis infantiséptica, sepsis, meningoencefalitis e infecciones focalizadas.^{7,22}

En virtud de estos antecedentes, es interesante estudiar un modelo de tratamiento de un producto pesquero de alto riesgo, con una bacteriocina de conocida acción sobre este patógeno como lo es enterocina-35, producida por *Enterococcus faecium* CRL35,^{12,13} con el objeto de validar la posibilidad de diseñar un tratamiento biopreservante a nivel industrial, que permita eventualmente disminuir la carga microbiana y/o eliminar *L. monocytogenes*.

Atendiendo su valor agregado y por ende su importancia económica, se decidió realizar el presente estudio utilizando como modelo las colas del camarón *Heterocarpus reedi*, que manufacturan industrias de la VIII Región de Chile a la forma de producto congelado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo. La cepa *E. faecium* CRL35 productora de enterocina-35 usada en esta investigación, fue aislada desde Queso Tafi en el centro de Referencia para Lactobacilos de Argentina por Farias et al 1994.¹³

La cepa de *L. monocytogenes* MIC1 utilizada como modelo experimental fue aislada de colas del camarón *H. reedi*, que elaboran las industrias de la VIII Región de Chile a la forma de producto congelado. Su aislamiento fue realizado de acuerdo a la metodología descrita por McBride & Girard.²⁴

El extracto de enterocina-35 fue preparado a partir del cultivo de la cepa CRL35 en medio LAPTg.²⁸ Para el crecimiento de *L. monocytogenes*, se utilizó caldo soya tripticasa (Merck) y agar soya tripticasa (Merck).

Producción de extracto de enterocina-35. *E. faecium*

CRL35 fue inoculado en 3 litros de medio LAPTg e incubado a 37°C durante 24 h. La enterocina-35 se extrajo a partir de este cultivo por el método de adsorción y desorción de Yang et al 1992 modificado, que consistió en calentar el cultivo a 70°C por 25 min, ajustando su pH a 6.0 con NaOH 4M y centrifugando a 15,000 x g por 15 min. El residuo sólido se lavó dos veces con solución reguladora fosfato salino 5 mM, pH 6.5. Luego fue resuspendido en 1/10 del volumen original de NaCl 100 mM, ajustando a pH 2.0 con H₃PO₄ 5% y mezclando por agitación magnética a 4°C por 1 h. Finalmente, las células fueron separadas por centrifugación a 29,000 x g por 20 min, evaluando la actividad antibacteriana del sobrenadante.

Cuantificación de la actividad antibacteriana. La cuantificación de la actividad del extracto se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en pocillos, descrita por Fleming et al (1975) y modificada por Farias et al.¹³

Se inocularon 30 ml de un cultivo de la cepa sensible en 5 ml de agar soya tripticasa con 0.8 % de agar-agar atemperado a 40°C (agar blando) y se vertió sobre una placa conteniendo el mismo medio de cultivo con 1.5 % de agar-agar (agar duro). Una vez solidificada la capa superficial, se perforaron sendos pocillos de 4 mm de diámetro con bombilla plástica estéril, dentro de los que se colocaron 25 ml de diluciones del sobrenadante (1:2 hasta 1:1024).

La actividad antagonista se cuantificó en "unidades arbitrarias por mililitro" (UA/ml), calculada por la relación matemática: $1000 * V = 1 * D$; donde V es el volumen de inóculo en el pocillo de siembra (en este caso 25 ml), y D, la más alta dilución capaz de inhibir el crecimiento de la cepa indicadora.⁸

Determinación de MICs. En el estudio de la aplicación de la bacteriocina como biopreservante, fue necesario obtener aproximaciones experimentales de la concentración *in vitro* que tiene un mayor efecto inhibitorio o letal sobre cepas de *L. monocytogenes*. Para ello se investigaron las concentraciones mínimas inhibitorias de enterocina-35 sobre la cepa modelo.

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria de la enterocina-35 sobre la cepa MIC1 variando el tamaño de inóculo y la temperatura de incubación. Se usaron inóculos de 10³ y 10⁴ UFC/ml y temperaturas de incubación de 4 y 37 °C. Se trabajó en duplicado con tiempos de incubación de 18 h para 37°C y de 6 días para 4°C.

La más baja concentración de enterocina-35 que impidió el desarrollo bacteriano fue calificada como la concentración mínima inhibitoria.

Determinación de cinética de muerte bacteriana. Para evaluar la cinética de muerte o inhibición bacteriana se agregaron 80 UA/ml, 160 UA/ml, 500 UA/ml y 1000 UA/ml de enterocina-35 a cultivos de *L. monocytogenes* en caldo soya tripticasa con una densidad poblacional de 10⁴ UFC/ml, los que se incubaron a 4°C por 7 h. Posteriormente se cuantificó su efecto sobre la población blanco por medio de recuentos bacterianos viables a 37°C en agar soya

tripticosa.

Ensayos de biopreservación. El estudio de biopreservación se realizó sobre el modelo experimental de colas de camarón congelado. Se contaminaron artificialmente por aspersión con *L. monocytogenes* las muestras del producto congelado. El agua de aspersión contenía diferentes proporciones de enterocina-35, así, esta etapa, cuya finalidad es reducir la deshidratación producida por el congelamiento, eliminar el hielo formado en exceso y otorgar al producto un aspecto brillante y atractivo al consumidor, permitiría adicionalmente reducir la viabilidad celular de la cepa contaminante de *L. monocytogenes*.

Se obtuvieron camarones de una empresa pesquera local, que fueron esterilizados en autoclave (121°C/15 min) para eliminar su flora bacteriana, y se distribuyeron en 42 bolsas estériles con 10 g por bolsa, las que constituyeron sendas unidades experimentales.

Se dividieron en seis series de siete unidades experimentales, las que fueron contaminadas con *L. monocytogenes* a concentración de 10^4 UFC/ml y posteriormente congeladas a -20°C por 18 h.

Luego del congelamiento y emulando el efecto de aspersión, cada serie fue inoculada con enterocina-35 a concentraciones: de 40 UA/ml para la serie 1, 80 UA/ml para la serie 2, 160 UA/ml para la serie 3, 320 UA/ml para la serie 4 y 500 UA/ml para la serie 5. Todas las series fueron almacenadas a -20°C.

Para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de enterocina-35, se controló diariamente la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en cada unidad por medio de la técnica de recuento del Número Más Probable en series de tres tubos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de extracto de enterocina-35. El extracto semipurificado de enterocina-35 preparado por el método de Yang *et al*³⁸ presentó una actividad de 10,240 UA/ml. La utilización de este método permite obtener una solución de bacteriocinas con características incoloras, que no interfiere en una utilización posterior, ya sea en forma directa o previa purificación. Esta condición, se traduce en una importante ventaja respecto a la utilización del método de Gonzalez & Kunka,¹⁶ que se basa en la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, ya que de este último método se obtiene un extracto coloreado y turbio, que eventualmente es capaz de manchar y producir pardeamiento en la superficie aplicada.

Determinación de MICs. La posible aplicación de la bacteriocina en estudio para obtener un alimento libre de *L. monocytogenes* requirió conocer la concentración mínima inhibitoria de esta bacteriocina sobre la cepa modelo.

El efecto de la temperatura y del tamaño de inóculo sobre la concentración mínima inhibitoria de enterocina-35, se muestra en la fig. 1. Un aumento cuantitativo del

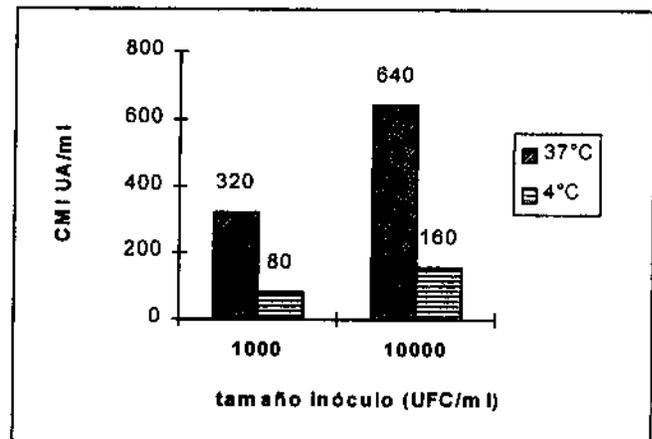


Fig. 1. Concentración mínima inhibitoria de enterocina-35 sobre *Listeria monocytogenes* MIC1, en diferentes condiciones de temperatura y tamaño de inóculo.

inóculo subió la concentración mínima inhibitoria, lo que ya fue descrito por Pucci *et al*²⁶ para la pediocina PA-1 sobre *L. monocytogenes*, aun cuando los valores de concentraciones mínimas inhibitorias encontrados por estos investigadores son menores que los descritos en esta investigación.

Por otra parte, la concentración mínima inhibitoria fue menor a 4°C que a 37°C. No se dispone de información que explique este fenómeno, pero probablemente, en condiciones de crecimiento a bajas temperaturas, esta bacteria psicrófila presenta modificaciones en su estructura de pared. La disposición espacial de los ácidos teicoicos podría influir en la menor cantidad de bacteriocina necesaria para producir cambios conformacionales de estas estructuras, favoreciendo una vía de acceso hasta los receptores de membrana citoplasmática.

Determinación de la cinética de muerte bacteriana. La fig. 2 muestra la cinética de declinación poblacional de *L. monocytogenes* a tamaños de inóculo pequeños y a una temperatura de 4°C, determinada para establecer la acción bactericida o bacteriostática de la enterocina-35.

El menor efecto de la enterocina-35 fue a concentración de 80 UA/ml, que provocó una disminución de 2 órdenes de magnitud de la población en los primeros 90 minutos. Esto sugiere que la cantidad de bacteriocinas activas no fue suficiente para ejercer su efecto sobre la totalidad de la población bacteriana.

Sin embargo, concentraciones superiores a la mínima inhibitoria fueron letales sobre toda la población bacteriana.

Ensayos de biopreservación. Para estudiar el efecto *in situ* de esta bacteriocina sobre colas de camarón congelado se debió enfrentar algunos problemas experimentales. Por la inexistencia de registros de las cargas bacterianas de *L. monocytogenes* en alimentos de origen pesquero, se decidió tomar como referencia las cuantificaciones presentadas

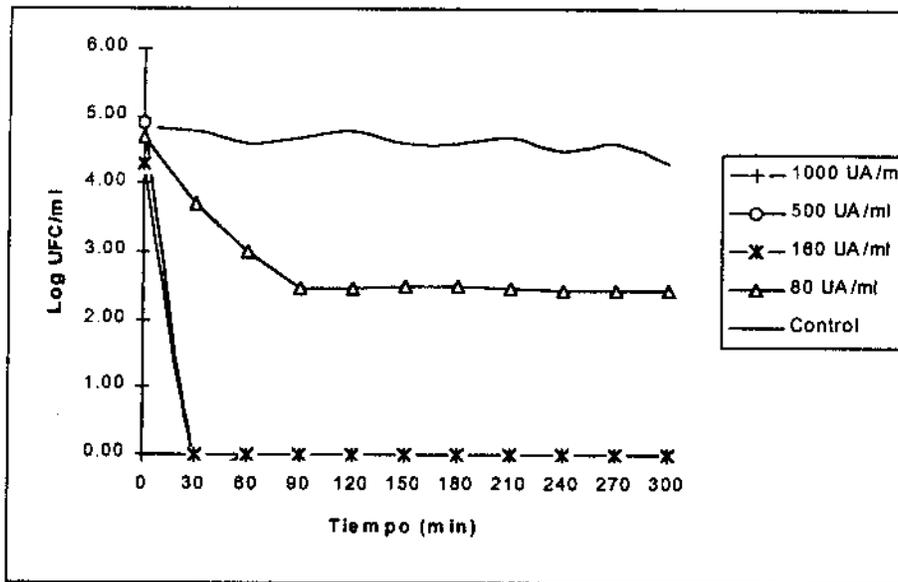


Fig. 2. Efecto de la enterocina-35 sobre una población de 10^4 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* a 4°C .

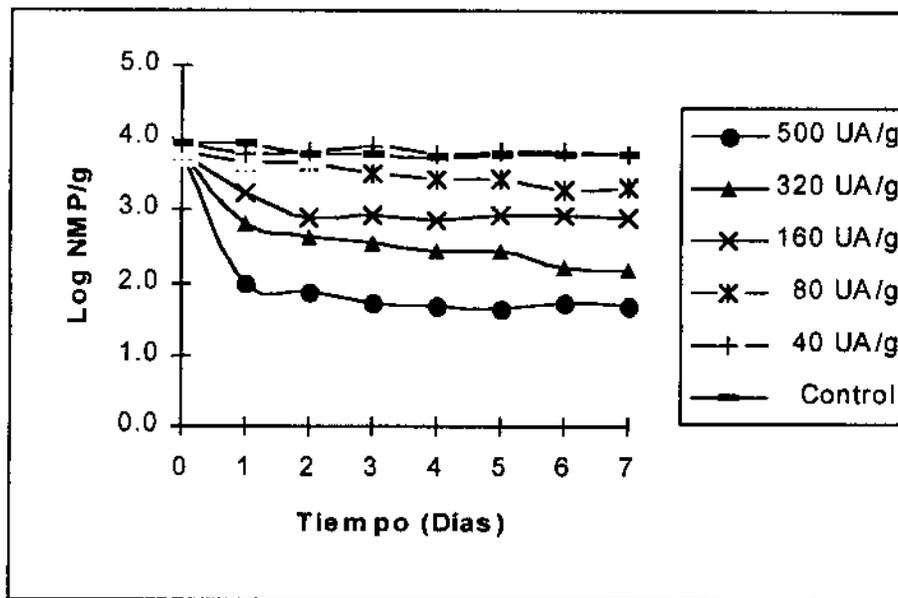


Fig. 3. Efecto de enterocina-35 sobre *Listeria monocytogenes* en camarones congelados, contaminados artificialmente con 10^4 UFC/g.

por Jay,¹⁹ quién informó que en la mayoría de los casos esta bacteria no sobrepasa el orden de 10^4 UFC/g de alimento.

Para la cuantificación de *L. monocytogenes* en las colas de camarón congelado y por la dificultad de recuperación de esta bacteria por siembra directa en medios de cultivos selectivos, se esterilizó el producto, aun cuando este procedimiento no es usado en la industria. Esto posiblemente altera la estructura del alimento, pero, se debió asumir este riesgo para poder cuantificar *L. monocytogenes* en el mo-

delo experimental.

Como en el laboratorio no podía realizarse la aspersión de agua en aerosol sobre las colas de camarón congelado, se utilizó la inoculación directa del líquido que contenía las bacteriocinas dentro de cada unidad experimental, y distribuyéndola homogéneamente en forma manual. El volumen usado para la aspersión fue de 10% del peso contenido en cada unidad experimental, similar a la utilizada en la industria pesquera.

La fig 3 muestra los resultados de los ensayos de simu-

lación industrial de la aplicación de la bacteriocina. Debe recordarse que en el ensayo *in vitro*, la distribución de bacterias y bacteriocinas fue relativamente homogénea, además de no haber influencia de grasas, alta concentración de proteínas, sólidos y temperatura de congelación, lo que dificulta la difusión de las moléculas.

Por ello se necesitaron mayores concentraciones de enterocina-35 para lograr disminuciones de *L. monocytogenes* en el alimento. En el experimento de simulación industrial, se requirió concentraciones de enterocina-35 de 500 UA/g para disminuir la población de *L. monocytogenes* en dos órdenes de magnitud. Al estar el alimento almacenado a -20°C , es posible que tanto el tiempo requerido por la bacteriocina para llegar a la célula blanco, como el congelamiento de la fase líquida, y la captura por las grasas presentes, sean factores que incidieron en el aumento de las concentraciones necesarias para la acción biopreservante, aunque es fundamental insistir en la mejora del modelo.

La enterocina-35 presentó mejores efectos letales a menores concentraciones que la pediocina PO2 que El-Khateib *et al.*¹¹ emplearon en carne. Para disminuir en 90 % la población de *L. monocytogenes* en 50 h se requirieron 3.2×10^3 UA/ml de bacteriocina. Por otra parte, Rodríguez *et al.* (1997),²⁹ usaron la enterocina-4 en concentraciones del orden de 10^3 UA/ml para observar efectos letales. En todos los casos se observa un efecto letal sobre las poblaciones blanco, sin embargo, no existe una información concreta respecto a la conveniencia económica de su uso a escala industrial, como tampoco de la inocuidad que estas bacteriocinas, incluyendo a enterocina-35 tengan para el consumo directo. Solamente por los antecedentes que informa Fariás¹³ sobre la sensibilidad de enterocina-35 a proteasas que incluyen las intestinales humanas es posible asumir que estas moléculas pueden ser fácilmente degradables al momento de su consumo, lo que minimiza los riesgos, no obstante, es necesario realizar los ensayos toxicológicos pertinentes para asegurar este punto.

Finalmente, la enterocina-35, al ser inactivada por acción de proteasas gastrointestinales y ser estable a condiciones de almacenamiento y variaciones de temperatura es una bacteriocina potencialmente efectiva como biopreservante. Por esta razón, podría ser interesante estudiar su aplicación a otro tipo de alimentos, además de realizar su caracterización toxicológica y determinar su inocuidad para el hombre.

BIBLIOGRAFIA

1. Allison, G., C. Fremaux, C. Ahn, y T. Klaenhammer. 1994. Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176:2235-2241.
2. Barefoot, S. y T. Klaenhammer. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:328-331.
3. Berry, E., M. Liewen, R. Mandigo, y R. Hutkins. 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *J. Food Prot.* 53:194-197.
4. Bhunia, A., M. Johnson, B. Ray. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.* 65:261-268.
5. Bhunia, A., M. Johnson, B. Ray y N. Kalchayanand. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strain. *J. Appl. Bacteriol.* 70:25-33.
6. Bruno, M., y Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3003-3010.
7. Cliver, D. 1990. *Foodborne Diseases*. Academic Press, Inc. San Diego, California. USA.
8. Daba, H., C. Lacroix, J. Huang, R. Simard, y L. Lemieux. 1994. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* 77:682-688.
9. Delves-Broughton, J. 1992. Nisin and its uses as food preservative. *Food Technol.* 44:100-117.
10. Dood, H. N. Horn y M. Gasson, M. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* 136:555-556.
11. El-Khateib, T., A. Yousef, y H. Ockerman. 1993. Inactivation and attachment of *Listeria monocytogenes* on beef muscle treated with lactic acid and selected bacteriocins. *J. Food Protect.* 56:29-33.
12. Fariás, M., R. Fariás, R., A. de Ruiz Holgado y F. Sesma, F. 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL 35, a "pediocin-like" bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:417-419.
13. Fariás, M., A. de Ruiz Holgado y F. Sesma, F. 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: Inhibition of foodborne pathogens. *J. Food Protect.* 57:1013-1015.
14. Fleming, H., J. Etchells y R. Costillow. 1975. Microbial inhibition by isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl. Microbiol.* 30:1040-1042.
15. Foegeding, P., A. Thomas, H. Pilkington y T. Klaenhammer. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:884-890.
16. Gonzalez, C. y B. Kunka. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2534-2538.
17. Jack, R., J. Tagg, y B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171-200.
18. Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch, y E. Wollman.



1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 84:222-224.
19. Jay, J. 1992. *Modern Food Microbiology*. Edited by Van Nostrand Reinhold. New York, USA.
20. Jimenez-Diaz, R., M. Rios-Sanchez, M. Dezmazeaud, J. Ruiz-Barba, y J. Piard. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1416-1424.
21. Klaenhammer, T. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-86.
22. Lorber, B. 1997. Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 24:1-11.
23. Nettles, C. y S. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Protect.* 55:338-356.
24. McBride, M y K. Girard, K. 1990. A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial population. *J. Lab. Clin-Med.* 55:133-157.
25. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L., Sletten, K., y Nes, I. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174:5686-5692.
26. Pucci, J., E. Vedamuthu, B. Kunka, y P. Vandenberg. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2349-2353.
27. Pugsley, A. 1984. The ins and outs of colicins. II. Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiol. Sci.* 1:203-205.
28. Raibaud, P., M. Caulet, J. Galpin y G. Mocquot. 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *J. Appl. Bacteriol.* 24:285-291.
29. Rodriguez, J., P. Gaya, M. Medina y M. Nufez. 1997. Bactericidal effect of enterocin 4 on *Listeria monocytogenes* in a model dairy system. *J. Food Protect.* 60:28-32.
30. Sano, Y., M. Kobayashi y M. Kageyama. 1993. Functional domains of S-type pyocins deduced from chimeric molecules. *J. Bacteriol.* 175:6179-6185.
31. Schillinger, U. y F. Karl-Lücke, F. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Env. Microbiol.* 55:1901-1906.
32. Tagg, J. y L. Bannister, L. 1979. "Fingerprinting" β -haemolytic *streptococci* by their production of and sensitivity to bacteriocin-like inhibitors. *J. Med. Microbiol.* 12:397-411.
33. Tagg, J., A. Dajani, A. y L. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:722-756.
34. Upreti, G. y R. Hinsdill, R. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4:487-494.
35. Upreti, G. y R. Hinsdill. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:139-145.
36. van Belkum, M., B. Hayema, A. Geis, R. Jeeninga, J. Kok, y G. Venema. 1991. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:492-498.
37. van Belkum, M., J. Kok, y G. Venema, G. 1992. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:572-577.
38. Yang, R., M. Johnson y B. Ray. 1992. Novel methods to extract large amount of bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 58:3355-3359.