



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MAYARA BAPTISTUCCI OGAKI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
ENTEROCINAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS DE  
*Enterococcus sp.***

MAYARA BAPTISTUCCI OGAKI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
ENTEROCINAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS DE  
*Enterococcus sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Márcia Cristina Furlaneto

Co-orientador(a): Prof(a). Dr(a). Luciana Furlaneto Maia

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

O34a Ogaki, Mayara Baptistucci.

Avaliação da atividade antimicrobiana de enterocinas produzidas por isolados de *Enterococcus* sp. / Mayara Baptistucci Ogaki. – Londrina, 2015.  
77 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Coorientador: Luciana Furlaneto Maia.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Enterococcus – Teses. 2. Bacteriocinas – Teses. 3. Peptídeos – Teses.  
4. Alimentos – Conservação – Teses. 5. Microbiologia – Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Maia, Luciana Furlaneto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.86

MAYARA BAPTISTUCCI OGAKI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ENTEROCINAS  
PRODUZIDAS POR ISOLADOS DE *Enterococcus sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Márcia Cristina  
Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr.Cristiano Ragagnin de Menezes  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Londrina, 06 de março de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Ap. e Valter K. Ogaki, e ao meu irmão William. Obrigada por todoamor e confiança. Ao meu namorado Rafael Sanches e aos amigos que amo, agradeço por todo incentivo e obstinação ao me fazerem prosseguir durante mais essa etapa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia e Márcia Cristina Furlaneto, não somente pelas orientações neste trabalho, mas sobretudo pelos ensinamentos, paciência e dedicação como pesquisadora durante esse tempo em que participei dos projetos do laboratório.

Ao apoio do programa de pós-graduação em Microbiologia e ao apoio financeiro da CAPES pelo concedimento da bolsa de estudos e do CNPQ pelos subsídios concedidos para este projeto.

Às colegas de laboratório Danielle Karine Ohashi, Kátia R. Rocha e Márcia Regina Terra pelo auxílio nas técnicas laboratoriais que me foram muito úteis durante este trabalho. Aos colegas de laboratório Alane Tatiana P. Morales, Aline Stipp Abe, Hugo F. Perini, Thalita Caroline Herek e Thiago S. Barros pelas sugestões de ideias e benevolências recebidas durante esses dois anos.

”Nunca desista do trabalho. Trabalho lhe dá significado e propósito e, a vida é vazia sem isso.”

Stephen Hawking

OGAKI, Mayara Baptistucci. **Avaliação da atividade antimicrobiana de enterocinas produzidas por isolados de *Enterococcus* sp.** 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

*Enterococcus* sp. têm sido amplamente pesquisadas quanto a sua aplicabilidade em alimentos, sendo utilizados como aditivos para atribuir sabor e aroma a alimentos fermentados, mas também como culturas protetoras, devido a sua capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos, denominados enteriocinas. Em função de seu espectro antimicrobiano, as enteriocinas têm sido testadas como bioconservadores em diversos produtos, mostrando atividade contra micro-organismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Considerando os benefícios e os resultados positivos que as enteriocinas vêm apresentando, o presente trabalho teve por objetivo genotipar isolados de *Enterococcus* sp. potencialmente produtores de enterocinas A, B, P, L50A e L50B, e por fim avaliar e caracterizar sua atividade antimicrobiana. Foram avaliados 135 isolados, dos quais 59,26% apresentaram pelo menos um gene que codifica enterocina (Gene+), sendo o gene da enterocina A, o mais frequente. Entre os isolados Gene+, 82,5% apresentaram atividade antimicrobiana frente a pelo menos um micro-organismo indicador. Os melhores isolados produtores em meio solidificado em diferentes meios de cultivo (Efm20, Ent22, Efm24, Efm25, Efm26 e Efs27) foram caracterizados quanto à atividade antimicrobiana de enterocinas presentes no CFS (sobrenadante de cultivo livre de células), outros testes foram realizados a fim de descartar uma possível inibição por outros agentes antimicrobianos que não fossem as enterocinas, como o gás carbônico e o peróxido de hidrogênio. Nenhum dos isolados produziu dióxido de carbono, e Efm26 foi o único capaz de produzir peróxido de hidrogênio. Os níveis mais elevados de atividade antimicrobiana foram obtidos pelos isolados Efm20, Ent22, Efm24, Efm26, e Efs27 (800 UA.ml<sup>-1</sup>) seguidos por Efm25 (400 UA.ml<sup>-1</sup>). O meio MRS suplementado com lactose foi determinado como melhor meio de cultivo líquido para a produção de enterocina. A atividade antimicrobiana do CFS foi inativada após tratamento com enzimas proteolíticas, mas se manteve quando o CFS foi termicamente tratado a 80°C e 100°C e também quando tratado com catalase, o que confirma que a atividade antimicrobiana do CFS não está relacionada com a ação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ácido láctico (CFS neutralizado com NaOH), mas sim com agentes proteicos, as enterocinas. Em conclusão, constatou-se que os isolados avaliados apresentam grande potencial para serem aplicados na bioconservação de produtos alimentícios.

**Palavras-chave:** Enterocinas. *Enterococcus* sp. Atividade antimicrobiana. Bioconservantes.

OGAKI, Mayara Baptistucci. **Evaluation of antimicrobial activity of enterocins produced by *Enterococcus* sp. isolates.** 2015. 77p. Dissertation (Master in Microbiology) – Londrina State University, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

*Enterococcus* sp. has been extensively researched for their applicability in food, and is widely applied as additive to assign flavor and aroma in fermented foods as well as protective cultures, due to their ability to produce antimicrobial peptides, called enteriocins. Because of their antimicrobial spectrum, the enteriocins have been tested as biopreservatives in different products, resulting in antimicrobial activity against pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Considering the benefits and the positive results that enteriocins have shown, this study aimed to genotype *Enterococcus* sp. isolates with potential producing enterocins A, B, P, L50A and L50B and after to evaluate and characterize their antimicrobial activity. About the 135 isolates evaluated, more than half (59.26%) presented at least one enterocin-encoding gene (Gene<sup>+</sup> strains). The gene *entA* was the most frequent. Among Gene<sup>+</sup> strains, 82.5% showed antimicrobial activity against at least one indicator strain. The best enterocin producers in semi-solidified media (Efm20, Ent22, Efm24, Efm25, Efm26 and Efs27) were characterized for antimicrobial activity of cell-free supernatant (CFS). Other tests were done to exclude a possible inhibition by other antimicrobial agents instead of enterocins, such as carbon dioxide and hydrogen peroxide. None of the isolates produced carbon dioxide and just Efm26 isolate was capable to produce hydrogen peroxide. The higher levels of antimicrobial activity were obtained by the isolates Efm20, Ent22, Efm24, Efm26 and Efs27 (800 UA.ml<sup>-1</sup>), followed by Efm25 (400 UA.ml<sup>-1</sup>). The MRS medium supplemented with lactose was the best medium in liquid culture to produce enterocin. The antimicrobial activity of CFS was inactivated after treatment with proteolytic enzymes, but remained when CFS was thermally treated at 80°C and 100°C, and treated with catalase which confirms that the antimicrobial activity of CFS is not related to hydrogen peroxide or lactic-acid (CFS neutralized with NaOH), but due to protein agents, the enterocins. In conclusion, it was found that the isolates have great potential to be applied in biopreservation of food products.

**Keywords:** Enterocins. *Enterococcus* sp. Antimicrobial activity. Biopreservatives.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Classificação de bacteriocinas proposta por Heng e Tagg (2006) ..... | 18 |
| <b>Figura 2</b> – Esquema referente aos loci para enterocina A e B .....               | 25 |
| <b>Figura 3</b> – Esquema de biossíntese e transporte de bacteriocinas .....           | 27 |
| <b>Figura 4</b> – Transporte de peptídeos pela via Sec-translocase .....               | 28 |
| <b>Figura 5</b> – Modo de ação de bacteriocinas de BAL.....                            | 31 |
| <b>Figura 6</b> – Modelos de formação de poros.....                                    | 31 |
| <b>Figura 7</b> – Mecanismos de ação de bacteriocinas .....                            | 32 |

### PARTE 1

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> – Percentage of <i>Enterococcus</i> isolates with inhibitory activity<br>against different indicator strains..... | 59 |
|---|----|

### PARTE 2

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> – Anti-listerial activity of CFS.....                                  | 74 |
| <b>Figure 2</b> – Anti-listerial activity of CFS in different thermal treatments ..... | 75 |
| <b>Figure 3</b> – Results for culture media assay .....                                | 76 |

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Diferenças entre bacteriocinas e antibióticos .....                                      | 15 |
| <b>Tabela 2</b> – Sistema de classificação para enterocinas segundo Franz et al. (2007).....               | 19 |
| <b>Tabela 3</b> – Sistema de classificação para bacteriocinas Classe I segundo Cooter et al. (2013) .....  | 20 |
| <b>Tabela 4</b> – Sistema de classificação para bacteriocinas Classe II segundo Cooter et al. (2013) ..... | 21 |
| <b>Tabela 5</b> – Cepas de <i>Enterococcus</i> sp. usadas na produção de bacteriocinas .....               | 24 |
| <b>Tabela 6</b> – O uso da nisina como conservante alimentar em diferentes países.....                     | 34 |

### PARTE 1

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1</b> – Specific primers for the PCR amplification of enterocin-encoding and <i>cyIA</i> genes ..... | 59 |
| <b>Table 2</b> – Percentage of enterocin-encoding genes among Gene+ <i>Enterococcus</i> strains .....         | 59 |

### PARTE 2

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1</b> – Growth inhibition of <i>L. innocua</i> after enzymatic treatment of CFS..... | 74 |
|---|----|

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| <b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....                                  | 13 |
| <b>3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....                           | 14 |
| <b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                           | 14 |
| 4.1 BACTERIOCINAS .....  | 14 |
| 4.2 ASPECTOS HISTÓRICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS..... | 16 |
| 4.3 <i>ENTEROCOCCUS</i> SP. ....                               | 21 |
| 4.4 BIOSÍNTESE .....   | 24 |
| 4.5 MECANISMOS DE AÇÃO .....                                   | 29 |
| 4.6 APLICAÇÕES DE BACTERIOCINAS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.....  | 32 |
| <b>5 REFERÊNCIAS</b> .....                                     | 36 |
| <b>PARTE 1</b> .....   | 42 |
| 1. Introduction .....  | 43 |
| 2. Materials and methods .....                                 | 44 |
| 3. Results.....  | 47 |
| 4. Discussion .....  | 50 |
| References .....   | 53 |
| <b>PARTE 2</b> .....   | 60 |
| 1. Introduction .....  | 61 |
| 2. Materials and methods .....                                 | 62 |
| 3. Results.....  | 65 |
| 4. Discussion .....  | 66 |
| References .....   | 76 |
| <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 77 |

## INTRODUÇÃO

Mudanças nos hábitos nutricionais promoveram maior interesse por alimentos frescos e tradicionais que proporcionam benefícios à saúde, o que aumentou as exigências dos consumidores para o uso de conservantes naturais que visam prolongar o tempo de vida destes produtos nas prateleiras.

Para satisfazer as exigências dos consumidores e as necessidades de evitar perdas e doenças transmitidas por alimentos contaminados por micro-organismos, a indústria alimentícia está optando por mudanças no processamento dos produtos, priorizando métodos biológicos naturais, os chamados bioconservadores. Esses visam à extensão da vida de prateleira e a segurança dos alimentos usando sua microbiota natural/introduzida e seus produtos antibacterianos, como por exemplo, as bacteriocinas.

As bacteriocinas são peptídeos em geral catiônicos com atividade antimicrobiana e sintetizadas nos ribossomos, as quais possuem espectro restrito e não são tóxicas às células eucariotas, sendo até o momento consideradas substâncias seguras para serem usadas como aditivos em alimentos. Devido a sua atividade antimicrobiana, as bacteriocinas já foram testadas contra diversos alvos microbianos contaminantes de alimentos que podem vir a se tornar patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-lácticas (BAL) têm sido recomendadas como bioconservadores de alimentos, por causa do seu status GRAS (*Generally recognized as safe*). Essas são consideradas uma alternativa aos conservantes químicos por serem tolerantes ao pH e calor, e facilmente digeridas por enzimas proteolíticas do estômago, devido a sua natureza proteica. No entanto, caracterizações e estudos toxicológicos devem ser realizados a fim de aprovar o uso de novas bacteriocinas em alimentos, já que até o momento, a nisina é a única bacteriocina permitida para o consumo em mais de 50 países, incluindo o Brasil.

A nisina, bacteriocina produzida por diversas cepas de *Lactococcus lactis*, foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) em 1969. No Brasil, a

nisina é aprovada para uso em queijos, além de outros produtos cárneos, no limite máximo de 12,5 mg/kg.

Muitas espécies de BALs já foram testadas quanto ao potencial de produção de bacteriocinas, especialmente as do gênero *Enterococcus*, já que são presentes naturalmente em alimentos fermentados derivados de leite cru e carnes. Essas atribuem sabor e aroma característicos em diversos produtos alimentícios, como por exemplo, alguns queijos de preparo artesanal. Diferentes enterocinas, bacteriocinas produzidas por enterococos, têm sido usadas como bioconservantes em diferentes produtos alimentícios, como queijos, leite de cabra, salames, salsichas e carne de porco, frango e também na conservação de pescados.

Cepas de espécies distintas de *Enterococcus* sp. já foram avaliadas quanto à produção de enterocinas, apresentando ação antagonista contra microorganismos como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Testes criteriosos devem ser realizados para que seja aprovada a aplicação de novas bacteriocinas em alimentos. Vários trabalhos relativos à aplicabilidade de enterocinas frente a organismos patogênicos contaminantes de alimentos têm sido publicados nos últimos anos, principalmente referentes à biopreservação em produtos lácteos e cárneos.

Considerando as propriedades únicas que as enterocinas proporcionam ao eliminar alvos microbianos potencialmente patogênicos, estudos biotecnológicos quanto à atividade antimicrobiana e a aplicação das enterocinas são necessários, a fim de que essas possam ser caracterizadas para serem posteriormente usadas como aditivos que visem, como novas ferramentas à bioconservação de alimentos, aumentar a segurança alimentar de produtos fermentados, como queijo e outros derivados lácteos.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Identificar isolados de *Enterococcus* sp. (provenientes de amostras clínicas e de alimentos) potencialmente produtores de enterocinas, bem como analisá-las e caracterizá-las quanto à atividade antimicrobiana.

### 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Verificar a presença de genes que codificam as enterocinas A, B, P, L50A e L50B nos isolados de *Enterococcus*;
- ❖ Detectar a atividade antimicrobiana contra micro-organismos potencialmente patogênicos veiculados em alimento;
- ❖ Quantificar a atividade bacteriocinogênica;
- ❖ Avaliar a ação bacteriocinogênica das enterocinas.

### 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 4.1 BACTERIOCINAS

Bacteriocinas constituem um subgrupo de peptídeos com atividade antimicrobiana sintetizados nos ribossomos. Em geral, são catiônicos e exibem propriedades anfipáticas, sendo a membrana bacteriana, na maioria das vezes, o alvo de sua atividade. Tais substâncias podem diferir em termos de tamanho, alvo microbiano, modo de ação, liberação, e mecanismos de imunidade. Embora haja um entendimento básico de sua estrutura, função, biossíntese e modo de ação, muitos aspectos desses compostos ainda são desconhecidos (CLEVELAND et al., 2001; GILLOR et al., 2008; SAVADOGO et al., 2006; TAGG et al., 1976).

As primeiras bacteriocinas caracterizadas foram de bactérias Gram-negativas, e inicialmente atraíram a atenção dos pesquisadores devido a sua capacidade de interferir, por efeito bactericida ou bacteriostático, no crescimento de outras bactérias de espécies relacionadas. Tais efeitos inibitórios resultam da ação desses peptídeos antimicrobianos na permeabilização da membrana, na inibição da síntese de parede celular, ou na inibição da atividade de DNA girase e RNA polimerase da célula alvo. Outras bacteriocinas de bactérias Gram-positivas já têm sido caracterizadas bioquimicamente e geneticamente, incluindo as que são produzidas por bactérias ácido-lácticas (BAL) encontradas em numerosos alimentos fermentados e não fermentados (JACK et al., 1995; CLEVELAND et al., 2001; COTTER et al., 2013).

Nos últimos anos, a produção de bacteriocina por BAL tem atraído grande atenção por causa do seu status GRAS e seu uso potencial como aditivo seguro

para a conservação de alimentos. Em relação às bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas, as típicas de BAL são peptídeos pequenos, termoestáveis e de espectro antibacteriano restrito, porém outras bacteriocinas de BAL possuem amplo espectro antibacteriano, portanto, podem inibir o crescimento de bactérias patogênicas Gram-positivas, leveduras, e também tem sido relatada a inibição do crescimento de algumas espécies de bactérias Gram-negativas (DIOP et al., 2007; TOPISIROVIC et al., 2006).

Diversas espécies de BAL já foram testadas quanto ao seu potencial de produção de bacteriocinas, tais como *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus mundtii*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Carnobacterium piscícola*, entre outras (CLEVELAND et al., 2001; DIOP et al., 2007; DHEWA, 2012).

Devido a seus efeitos antimicrobianos, frequentemente as bacteriocinas são confundidas com antibióticos o que pode inviabilizar seu uso em alimentos. Duas características principais as distinguem dos antibióticos: o fato de serem sintetizadas nos ribossomos e por possuírem um espectro bactericida relativamente restrito (GILLOR et al., 2008; HURST, 1981). Além destas, apresentam outras diferenças em relação aos antibióticos quanto à síntese, ao modo de ação, ao espectro antimicrobiano, à toxicidade e aos mecanismos de resistência (Tabela 1).

**Tabela 1** – Diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.

| <b>Características</b>                 | <b>Bacteriocinas</b>                                 | <b>Antibióticos</b>                                |
|--|--|--|
| Aplicação                              | Alimentos  | Clínica  |
| Síntese                                | Ribossomal   | Metabolismo secundário                             |
| Atividade                              | Espectro estreito                                    | Amplo espectro                                     |
| Imunidade à célula produtora           | Sim  | Não  |
| Mecanismo de resistência ou tolerância | Geralmente afeta a composição da membrana celular    | Afeta diferentes sítios dependendo do modo de ação |
| Requisitos de interação                | Às vezes moléculas acopladas                         | Alvo específico                                    |
| Modo de ação                           | Formação de poros e na biossíntese de parede celular | Membrana celular e alvos intracelulares            |
| Toxicidade                             | Não conhecida  | Sim  |

**Fonte:** Cleveland et al. (2001).

## 4.2 ASPECTOS HISTÓRICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS

Gratia (1925) relatou pela primeira vez a presença de um agente antibiótico em meio líquido produzido por uma amostra virulenta de *Escherichia coli*. Esta substância termoestável e dialisável fora denominada como princípio V, mais tarde chamada de colicina V. Anos após sua descoberta, Gratia estabeleceu a natureza proteica dessa colicina, notando também a existência de substâncias similares produzidas por outras amostras de *E. coli* (GILLOR et al., 2008; JACK et al., 1995).

Fredericq (1946) notou a ação de substâncias proteicas produzidas por *Staphylococcus* sp. contra outras cepas do mesmo gênero, com base em diferentes espectros inibitórios, denominando-as posteriormente como staphylococcinas, por conseguinte comprovando sua natureza proteica e especificidade de seu espectro de atividade.

Fredericq tentou adotar um termo que envolvesse todas essas substâncias antibacterianas produzidas pela família Enterobacteriaceae, porém as tentativas em categorizar as staphylococcinas de uma maneira semelhante às colicinas não foram bem sucedidas (CASCALES et al., 2007; JACK et al., 1995; TAGG et al., 1976).

Outras pesquisas relataram a produção dessas substâncias por parte de outras bactérias não coliformes, até que Jacob et al. (1953) introduziram uma nova designação aos peptídeos bacteridas, denominando-os bacteriocinas. Essa designação também seguia a dada às colicinas, portanto, as famílias de novas bacteriocinas passariam a ter o nome da espécie da bactéria produtora com o sufixo “*cin*”, e para evitar redundâncias, Fredericq (1964) propôs algumas alterações na nomenclatura, utilizando também o gênero ao invés do nome da espécie.

Desde a descoberta da nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, na década de 1920, várias outras bacteriocinas já foram isoladas e caracterizadas a partir de bactérias ácido-láticas (BAL). O interesse nesses compostos, principalmente os produzidos por BAL, aumentou substancialmente, devido a sua ação potencial como conservantes alimentares naturais (NES et al., 1996; SAVADOGO et al., 2007).

As bacteriocinas de BAL podem ser agrupadas com base em sua estrutura como, por exemplo, similaridades entre a sequência primária, propriedades físico-químicas, sequência líder e número de peptídeos que constituem sua atividade, e principalmente com base em seu modo de ação (AYMERICH et al., 1996). Porém, não há um consenso quanto a uma classificação universal que agrupe toda a diversidade de bacteriocinas já descritas até o momento.

Um dos pioneiros a sugerir uma divisão das bacteriocinas em grupos distintos foi Klaenhammer (1993), ele definiu quatro classes de bacteriocinas produzidas por BAL. A Classe I refere-se aos lantibióticos, que constitui um grupo de peptídeos pequenos sintetizados nos ribossomos que sofrem extensa modificação pós-traducional. Estes contêm resíduos de lantionina e  $\beta$ -metil lantionina, bem como outros aminoácidos dideidroalanina e didehidrobutirina.

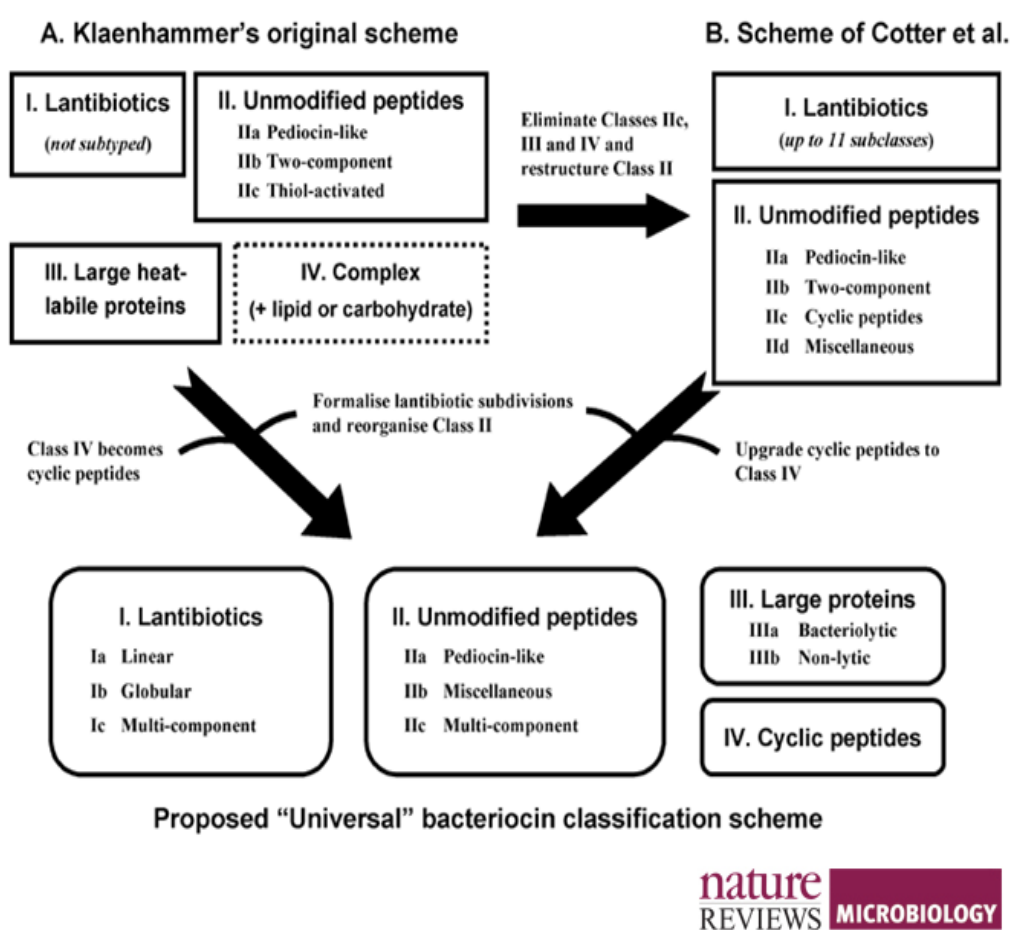
A Classe II inclui os peptídeos pequenos (de 4–6 kDa), termo-estáveis, sintetizados nos ribossomos, e que não sofrem extensa modificação pós-traducional, exceto a clivagem do peptídeo durante o transporte para fora da célula. A Classe II foi subdividida por Klaenhammer (1993) em três subgrupos IIa, IIb e IIc. As bacteriocinas de Classe III, são peptídeos termo lábeis maiores que 30 kDa, e as da Classe IV compreendem complexos de bacteriocinas que contêm lipídeos essenciais ou porções de carboidratos ligados a proteínas (FRANZ et al., 2007; JACK et al., 1995).

Em uma outra classificação três anos mais tarde, Nes et al. (1996) propuseram a exclusão das bacteriocinas de Classe IV, por não terem sido caracterizadas. Já Van Belkum e Stiles (2000) subdividiram a Classe II com base no número de resíduos de cisteína em seis subclasses IIa, IIb, IIc, IIe, IId e IIf. Nesta classificação, as bacteriocinas secretadas pela via pré-peptídeo translocase (Sec) não seriam classificadas como um grupo separado, devido à diversidade de bacteriocinas secretadas por esta via.

Cotter et al. (2005) sugeriram uma classificação em três grupos principais: Lantibióticos de Classe I (bacteriocinas que contêm lantionina), não lantibióticos de Classe II (bacteriocinas que não contêm lantionina) as bacteriolisinas (peptídeos líticos), sendo a Classe IV não inclusa na classificação. Uma classificação simplificada somente para bacteriocinas produzidas por

*Enterococcus* foi proposta por Franz et al. (2007) que subdividiram a Classe II em três subgrupos segundo a Tabela 2.

Considerando as inúmeras divergências quanto à classificação das bacteriocinas, Heng e Tagg (2006) sugeriram uma classificação universal (Figura 1) que abrangia elementos adotados por Klaenhammer (1993) e Cotter (2005), porém tal classificação ainda não é extensivamente utilizada por outros autores que publicaram revisões mais recentes sobre o tema (BALCIUNAS et al., 2013; COTTER, 2014; COTTER et al., 2013; SONOMOTO et al., 2012; YANG et al., 2014).



Fonte: Heng e Tagg (2006).

**Figura 1** – Classificação de bacteriocinas proposta por Heng e Tagg (2006).

A mais nova classificação foi proposta recentemente por Cotter et al. (2013). Essa nova classificação separa as bacteriocinas produzidas por Gram-positivas, das que são produzidas por Gram-negativas. As bacteriocinas de

Gram-positivas são divididas em apenas duas Classes I e II, excluindo as Classes III e IV propostas até então. A Classe III seria inclusa na Classe II em uma nova subdivisão IIc e a Classe IV não entraria na classificação, pois a designação de bacteriocinas corresponderia apenas aos peptídeos pequenos ribossomalmente sintetizados, não incluindo outras proteínas antimicrobianas grandes.

Segundo a nova classificação, a Classe I corresponde às bacteriocinas que sofrem extensas modificações pós-traducionais e a Classe II engloba as bacteriocinas que não sofrem tais modificações e também as que sofrem modificações modestas, como a formação de pontes dissulfeto, circularização ou adição de N-formilmetionina. Já as bacteriocinas de Gram-negativas pertenceriam a dois grupos distintos, um de peptídeos pequenos, como as microcinas, e um segundo de peptídeos grandes, as colicinas.

As Classes I e II de bacteriocinas de Gram-positivas também teriam subdivisões com base nas modificações que sofrem após a tradução (Tabela 3 e 4). Em uma publicação recente, autores como Yang et al. (2014) já adotaram essa nova classificação.

**Tabela 2** - Sistema de classificação para enterocinas segundo Franz et al. (2007).

| <b>Classificação</b>                                      | <b>Exemplos</b>        |
|---|------------------------|
| Classe I - Enterocinas lantibióticas                      | Citolisina             |
| Classe II - Enterocinas não lantibióticas                 |                        |
| Classe II.1 - Enterocinas da família da pediocina         | Enterocina A e P       |
| Classe II.2 - Enterocinas sintetizadas sem peptídeo líder | Enterocina L50A e L50B |
| Classe II.3 - Outras lineares, e do tipo não pediocina    | Enterocina B           |
| Classe III - Peptídeos cíclicos antibacterianos           | Enterocina AS-48       |
| Classe IV - Proteínas grandes                             | Enterolisina A         |

**Fonte:** Franz et al. (2007)

**Tabela 3** – Sistema de classificação para bacteriocinas Classe I segundo Cooter et al. (2013).

| <b>Classe I (modificadas)</b>                | <b>Distinções</b>   | <b>Exemplos</b>  |
|--|---|------------------|
| Tipo microcina (C7-C51)                      | Ligação covalente à região carboxi-terminal do ácido aspártico.                                     | Microcina C7-C51 |
| Lasso peptídeos                              | Possui estrutura lasso.   | Microcina J25    |
| Peptídeos lineares contendo azol- ou azolina | Possui heterociclos, mas não outras modificações.   | Microcina B17    |
| Lantibióticos                                | Possui pontes de lantionina.  | Nisina           |
| Linaridinas                                  | Possuem estrutura linear e contem aminoácidos desidratados.   | Cipemicina       |
| Proteusinas                                  | Contêm múltiplas hidroxilações, epimerizações e metilações.   | Politeonamida A  |
| Sactibioticas                                | Contêm pontes S- $\alpha$ -C.   | Subtilosina A    |
| Cianobactinas tipo patellamida               | Possuem heterociclos e passam por macrociclos heterocíclicos e passam por macrociclização.          | Patellamida A    |
| Cianobactinas tipo anaciclamida              | Peptídeos cíclicos com aminoácidos proteinogênicos com ligações prenil.                             | Anaciclamida A10 |
| Tiopeptídeos                                 | Contêm uma piridina central, dihidropiridina ou um anel piperidina bem como heterociclos.           | Tiostreptona     |
| Botromicinas                                 | Contêm macrociclos amidina, carboxi-terminal tiazol descarboxilado e aminoácidos carbono-metilados. | Botromicina A2   |
| Glicocinas                                   | Contêm glicopeptídeos “S-linked”.   | Sublancina 168   |

**Fonte:** Cooter et al. (2013).

**Tabela 4** – Sistema de classificação para bacteriocinas Classe II segundo Cooter et al. (2013).

| <b>Classe II (não modificadas/cíclicas)</b> | <b>Distinções</b>   | <b>Exemplos</b>                   |
|---|---|-----------------------------------|
| Ila (tipo pediocinas PA-1-)                 | Possui região conservada YGNGV (onde N representa qualquer aminoácido).                               | Pediocina PA-1, enterocina CRL35, |
| Ilb   | Dois peptídeos não modificados são necessários para a atividade.                                      | Lactacina F                       |
| Ilc   | Peptídeos cíclicos.   | Enterocina AS-48                  |
| Ild   | As que não sofrem modificações, são lineares, tipo não pediocina, ou bacteriocinas de único peptídeo. | Microina V, lactococcina A        |
| Ile   | Contêm serina(s) na região carboxi-terminal com modificação pós-traducional tipo sideróforo.          | Microcina E492, Microcina M       |

**Fonte:** Cooter et al. (2013).

#### **4.3 ENTEROCOCCUS SP.**

Os enterococos são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas, cujo principal produto do metabolismo fermentativo da glicose é o ácido láctico, por isso são caracterizadas como bactérias ácido-lácticas (BAL). Originalmente eram conhecidos como estreptococos do grupo D, entretanto na década de 1980, com base em estudos de hibridação DNA-DNA e DNA-RNA, foram transferidos para o novo gênero *Enterococcus*. O gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as mais encontradas em alimentos e habitat relacionados. Algumas espécies têm motilidade, e em sua maioria, apresentam crescimento entre 10°C a 45°C na presença de 6,5% de NaCl (FRANZ et al., 2007; HARDIE e WHILEY, 1997).

Espécies de enterococos constituem parte da microbiota normal do intestino de seres humanos e animais de sangue quente, também podem ser detectadas em insetos, caracóis, além de ambientes abertos, como lama, solo e plantas. Uma vez liberados no ambiente, por meio de fezes humanas ou de animais, colonizam diversos nichos, devido a sua capacidade de resistir ou crescer em ambientes hostis. Caso haja contaminação, por fonte intestinal ou ambiental, os enterococos também podem colonizar alimentos crus (por exemplo, leite e carne), multiplicando-se durante a etapa de fermentação ou

processamento do produto, por isso, muitos alimentos fermentados feitos a partir de carne e leite contêm enterococos (GIRAFFA, 2002; HAJIKHANI et al., 2007).

Quando presentes em alimentos fermentados, especialmente queijos produzidos com leite cru, contribuem para a ocorrência de características sensoriais desejáveis, relacionadas à consistência e aroma característicos. Em países do Mediterrâneo alguns queijos tradicionais preparados a partir do leite de ovelha ou de cabra possuem entre seus constituintes os enterococos que por meio de da atividade proteolítica, lipolítica, e produção de compostos voláteis exercem papel importante na maturação do queijo, atribuindo sabor e aroma únicos a estes produtos (DE VUYST et al., 2003; MANOLOPOULOU et al., 2003).

As espécies mais frequentemente isoladas em produtos lácteos são *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus durans*. Estas são capazes de crescer em ambientes restritos, de elevado teor salino e baixo pH, como os encontrados em queijos, ao passo que outras BAL dificilmente se desenvolveriam sob tais condições (HAJIKHANI et al., 2007).

Além de atribuir sabor diferencial em diversos queijos tradicionais, serem componentes de inoculantes de silagem ou usados como probióticos na nutrição humana e animal, os enterococos também podem atuar como agentes protetores contra patógenos, devido a sua capacidade de produção de compostos antimicrobianos, incluindo bacteriocinas. Estas são ativas contra espécies patogênicas comumente detectadas em produtos lácteos e cárneos, como a espécie *Listeria monocytogenes* (KHAN et al., 2010; OTT et al., 2001).

Entre as bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp. algumas foram descritas a partir de cepas provenientes de alimentos, como por exemplo as enterocinas A, B, P, L50A e L50B (DU TOIT et al., 2000).

As enterocinas A e B também têm sido extensivamente estudadas devido as suas propriedades anti-listeriais, especialmente em produtos cárneos. Além disso, o efeito sinérgico das enterocinas juntamente a outros conservantes, ou tratamentos físicos, tais como calor e alta pressão, mostrou um melhoramento na atividade antimicrobiana das enterocinas (KHAN et al., 2010).

A enterocina A, caracterizada pela primeira vez por Aymerich et al. (1996), é sintetizada na forma de um pré-peptídeo inativo que sofre clivagem na porção N-terminal durante sua exportação da célula (geralmente por um transportador

ABC - ATP), gerando um peptídeo maduro de 47 aminoácidos e peso molecular de 4,8kDa que contém quatro resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto intramoleculares (AYMERICH et al., 1996; O'KEEFFE et al., 1999).

Já a enterocina B possui 53 aminoácidos e peso molecular de 5,4kDa, cujo pré-peptídeo é do tipo duplo-glicina e contém 18 aminoácidos (FRANZ et al., 2007). A enterocina B foi caracterizada por Casaus et al. (1997) que relataram a sua ação sinérgica com a enterocina A. Há relatos de isolados de *Enterococcus* em que o operon enterocina B não possuía genes codificadores de proteínas acessórias e também do transportador, portanto acredita-se que esse peptídeo pode ser transportado através das proteínas de transporte da enterocina A (FRANZ et al., 1999).

A enterocina P, caracterizada por Cintas et al. (1997), possui um amplo espectro antimicrobiano, que inclui não somente *L. monocytogenes*, mas também uma grande variedade de bactérias patogênicas Gram-positivas de origem alimentar. A enterocina P é inicialmente sintetizada como um pré-peptídeo de 71 aminoácidos que é clivado depois dos resíduos Val-Asp-Ala (posições 23-21), resultando numa bacteriocina madura de 44 aminoácidos e peso molecular de 4,4kDa, diferentemente da enterocina A, a P é transportada para o exterior da célula por um transportador Sec-dependente (CINTAS et al., 1997; HERRANZ e DRIESSEN et al., 2005).

A enterocina L50, foi identificada e caracterizada pela primeira vez por Cintas et al. (2000), sendo expressa pelo gene *entL50* presente no plasmídeo, ela consiste em dois peptídeos L50A e L50B, que têm atividade antimicrobiana individual e exibem sinergismo quando combinados, possuindo 31 aminoácidos em comum (FRANZ et al., 2007).

Várias bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de *Enterococcus* sp. já foram testadas em diversos produtos alimentícios, tendo como alvos espécies patogênicas como *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus* e *S. aureus* (Tabela 5).

**Tabela 5** – Cepas de *Enterococcus* sp. usadas na produção de bacteriocinas

| <b>Produtor</b> | <b>Bacteriocina</b> | <b>Alimento testado</b>                                     | <b>Alvo bacteriano</b>  |
|-----------------|---------------------|---|-------------------------|
| Efm 7C5         | Indefinida          | Taleggio (queijo suave italiano)                            | <i>L. monocytogenes</i> |
| Efm7C5          | Indefinida          | Leite   | <i>L. innocua</i>       |
| Efm WHE 81      | Ent A e B           | Queijo Munster  | <i>L. monocytogenes</i> |
| Efm F58         | Ent L50A e B        | Leite de cabra e Jben (queijo marroquino de leite de cabra) | <i>L. monocytogenes</i> |
| Efs A-48-32     | Ent AS-48           | Queijo sem gordura  | <i>Bacillus cereus</i>  |
| Efs A-48-32     | Ent AS-48           | Leite desnatado e queijo suave sem gordura maduro           | <i>S. aureus</i>        |
| Efm CCM 4231,   | Ent CCM 4231,       | Salames secos fermentados espanhóis                         | <i>Listeria spp.</i>    |
| Efm RZS C13     | Ent 13              |   |                         |
| Ecf IM 416K1    | Ent 416k1           | Cacciature (salame italiano)                                | <i>L. monocytogenes</i> |
| Efm CTC 492     | Ent A e B           | Salame seco fermentado                                      | <i>L. innocua</i>       |
| Efm CTC 492     | Ent A e B           | Carne de porco cozida                                       | <i>L. sakei CTC746</i>  |

**Fonte:** Khan et al. (2010). Efm = *Enterococcus faecium*, Efs = *Enterococcus faecalis*, Ecf = *E. casseliflavus* e Ent = enterocina(s).

#### 4.4 BIOSÍNTESE

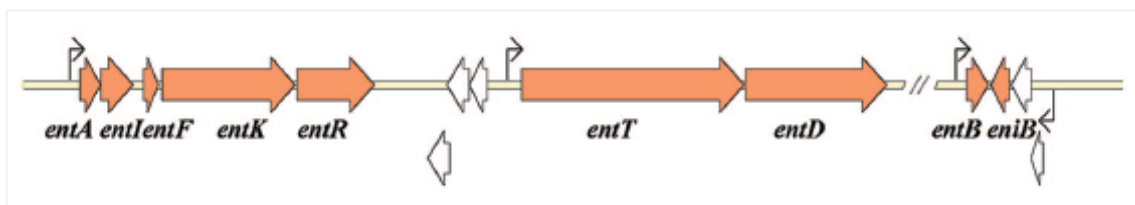
A biossíntese de bacteriocinas envolve quatro genes principais: o gene que expressa o pré-peptídeo, o gene de imunidade específica que expressa uma proteína de imunidade à célula produtora, o gene que codifica proteínas do transportador ABC, responsável por exteriorizar a bacteriocina, e por fim, o gene que codifica uma proteína acessória essencial para a exteriorização da bacteriocina, cuja função não está totalmente esclarecida. Esses genes estão organizados em um ou dois operons (NES et al., 1996).

Na maioria das espécies, como por exemplo, *S. thermophilus* e *E. faecium*, a produção de bacteriocina é regulada por indutores específicos, os peptídeos feromônios. A indução da expressão ocorre quando o peptídeo feromônio atinge um limiar de concentração específico, assim, os peptídeos se ligam aos seus receptores proteína quinase histidina, seguidos da fosforilação

de um regulador de resposta que se liga a região promotora ativando-a (NES et al., 2007).

O cluster gênico das bacteriocinas pode ser encontrado tanto em cromossomos (OSMANAĞAOĞLU e KIRAN, 2011), em plasmídeos (KOJIC et al., 2006) ou em transposons (DUFOR et al., 2000).

As enterocinas A e B cromossômicas, por exemplo, possuem genes organizados em dois operons. Para enterocina A: o primeiro operon (operon bacteriocina) consiste do gene da enterocina A (*entA*), o gene de imunidade (*entI*), o gene do peptídeo feromônio (*entF*), o gene da proteína quinase histidina, receptor do peptídeo feromônio (*entK*), e o gene ativador de ligação ao DNA, regulador de resposta (*entR*). O segundo (operon transportador) é constituído por dois genes, o transportador ABC (*entT*) e o acessório (*entD*), necessários para a secreção do peptídeo feromônio e da bacteriocina (Figura 2). Para enterocina B: um operon onde se localiza o gene para enterocina B (*entB*) e o segundo operon, contendo o gene de imunidade (*eniB*). Ambos os operons são controlados pelos genes reguladores (*entFKR*), e o processamento e o transporte da enterocina B são provavelmente mediados pelos genes *entT* e *entD* (NES et al., 2007).



Fonte: Nes et al. (2007).

**Figura 2** – Esquema referente aos loci para enterocina A e B. Promotores regulados indicados por setas e *open reading frame* (ORFs) por setas brancas.

Em relação à biossíntese das bacteriocinas de Classe I, há uma subdivisão em dois grupos: no grupo I o pré-peptídeo sofre desidratação pela enzima LanB e posteriormente formação de uma ligação tio-éter pela enzima LanC. Em seguida o pré-peptídeo sofre modificações pela protease serina LanP e é translocado em sua forma madura através da membrana, pelas proteínas LanT do transportador tipo ABC (Figura 3). Já no grupo II, o pré-peptídeo é extensivamente modificado por uma única enzima LanM e o processamento é concomitante à translocação pela enzima LanT(P) (CHEN e HOOVER, 2003).

Após a liberação da bacteriocina, uma proteína histidina quinase (HPK) detecta a presença de bacteriocinas e se autofosforila. O grupo fosfato é transferido a um regulador de resposta (RR) que ativa a transcrição de genes reguladores, assim peptídeos de imunidade (LanI) e do transportador ABC (LanFEG) são produzidas (CHEN e HOOVER, 2003).

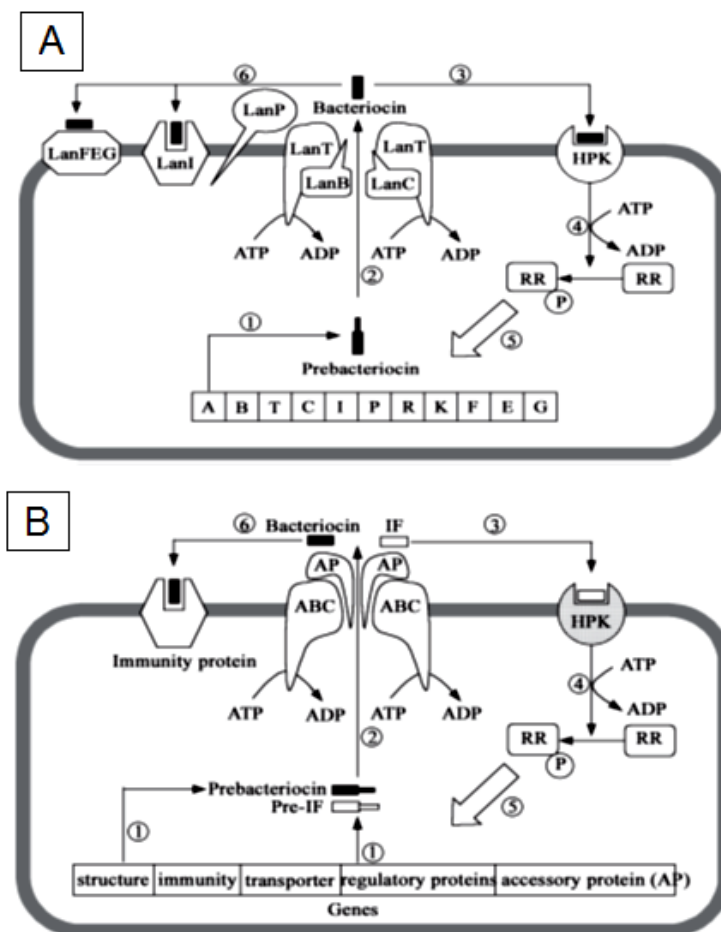
As bactérias produtoras de bacteriocinas possuem um mecanismo de imunidade, protegendo-as da ação de suas próprias bacteriocinas. Esse peptídeo de imunidade, citado anteriormente, é expresso concomitantemente com a expressão das bacteriocinas, ligando-se ao receptor que a própria bacteriocina se ligaria para formar poros na membrana citoplasmática, o que provocaria a lise celular (ABEE et al., 1995; NES et al., 2007; KJOS et al., 2011).

As bacteriocinas Classe II, em sua maioria, são sintetizadas como pré-peptídeos tipo dupla-glicina. Na região N-terminal dos pré-peptídeos há dois resíduos de glicina conservados, que têm por funções: impedir a bacteriocina de ser biologicamente ativa intracelularmente e fornecer o sinal de reconhecimento para o transportador ABC. A presença ou ausência dessa região N-terminal no pré-peptídeo irá determinar o mecanismo de secreção das bacteriocinas da Classe II. (HAVARSTEIN et al., 1995).

Até agora, as enterocinas L50A, L50B, Q e a bacteriocina LsbB são os únicos exemplos de bacteriocinas Classe II que são sintetizadas sem região N-terminal, sendo seus mecanismos de secreção desconhecidos (HERRANZ e DRIESSEN, 2005).

Inicialmente ocorre a síntese do pré-peptídeo e também de um fator de indução (IF), em seguida os pré-peptídeos tipo dupla-glicina são exportados através da membrana citoplasmática por um cassete transportador ligado a ATP (ABC). O transportador ABC é uma protease, cujo domínio proteolítico reside na região N-terminal da proteína, portanto, tem por função a remoção da sequência líder, e a translocação do peptídeo maduro através da membrana citoplasmática. O transporte por ABC está envolvido na translocação de diferentes substratos como íons, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, lipídeos e antibióticos, além de moléculas maiores, como oligossacarídeos, oligopeptídeos e proteínas de elevado peso molecular (BIEMANS-OLDEHINKEL et al., 2006; HAVARSTEIN et al., 1995).

Após a liberação da bacteriocina, a HPK detecta a presença do fator de indução e se autofosforila, o grupo fosfato (P) é transferido para o regulador RR que ativa a transcrição de genes regulados e produção do peptídeo de imunidade, ocorrendo de maneira similar à Classe I. A biossíntese geral das bacteriocinas Classe I e Classe II translocadas por ABC transportador estão representadas na Figura 3.



Fonte: Chen e Hoover et al. (2003).

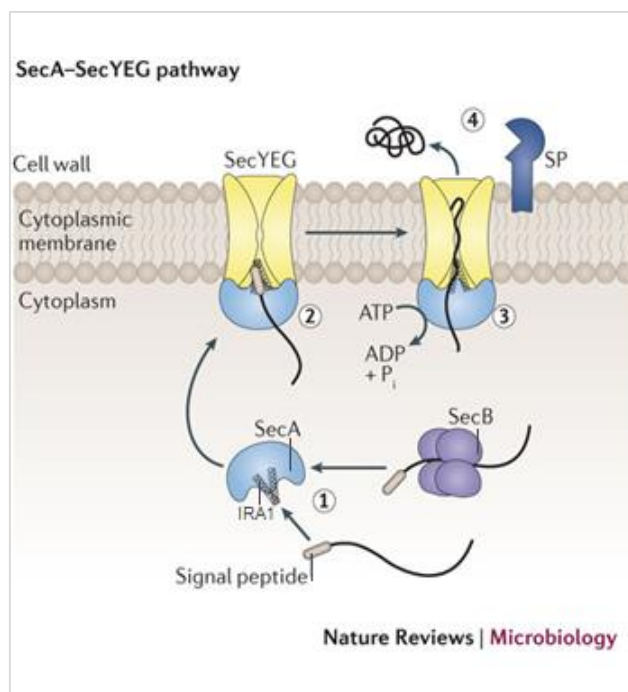
**Figura 3** – Esquema de biossíntese e transporte de bacteriocinas. A. Classe I; B. Classe II.

Mesmo a maioria das bacteriocinas de Classe II contendo o sinal tipo dupla-glicina e transporte via proteínas ABC, outras podem apresentar um pré-peptídeo do tipo Sec-dependente, transportado pela via Sec-translocase. Como por exemplo, as bacteriocinas divergicina A (*Carnobacterium divergens*), acidocina B (*Lactobacillus acidophilus*), bacteriocina 31 (*E. faecalis*) e enterocina P (*E. faecium*) (CINTAS et al., 1997; HERRANZ e DRIESSEN, 2005).

Os pré-peptídeos tipo Sec são sintetizados nos ribossomos com uma sequência Sec N-terminal e sua translocação da membrana plasmática é mediado por um complexo de proteínas citossólicas e transmembrânicas, chamado de translocase (Figura 4). A translocação de proteínas para o exterior das células é acionada por meio de hidrólise de ATP e por força próton motora (KEYZER et al., 2003).

Após sintetizados, os pré-peptídeos são capturados por uma chaperona SecB que os mantêm desenrolados e os direcionam à proteína SecA. A proteína citoplasmática SecA possui dois domínios, um domínio motor que aciona a hidrólise de ATP e outro específico que interage com o pré-peptídeo, o qual se liga a uma fenda entre os dois domínios (FELTCHER e BRAUNSTEIN, 2012; LYCKLAMA A NIJEHOLT e DRIESSEN, 2012).

SecA auxilia na translocação dos pré-peptídeos gradualmente pelo canal SecYEG (Figura 4). O pré-peptídeo se insere para manter o canal aberto e a proteína SecA também é inserida pela supra hélice IRA1 (regulador intramolecular de hidrólise de ATP1). Após a translocação, o sequência Sec é removida do pré-peptídeo por peptidases periplásmicas de sinal (SP), e conseqüentemente há a formação da bacteriocina madura (FELTCHER e BRAUNSTEIN, 2012).



Fonte: Feltcher e Braunstein (2012).

**Figura 4** – Transporte de peptídeos pela via Sec-translocase.

#### 4.5 MECANISMOS DE AÇÃO

A maioria das bacteriocinas interage com lipídeos aniônicos presentes na membrana plasmática das bactérias alvo, sendo ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas, já que essas são caracterizadas por um elevado teor de lipídeos aniônicos na membrana. A maioria das bacteriocinas age permeabilizando a membrana através da formação de poros, o que promove a dissipação da força próton motora (PMF) e inibição do transporte de aminoácidos (ABEE, 1995). A PMF está envolvida em diversos processos na membrana citoplasmática, tais como o acúmulo de íons e metabólitos, e a síntese de ATP (BRUNO e MONTEVILLE, 1993).

Outras bacteriocinas podem inibir também bactérias Gram-negativas (Figura 7), estas necessitam transpor a membrana externa da parede celular e alcançar a membrana plasmática da célula alvo para atuarem. Em contato com a membrana plasmática são capazes de interferir na síntese de DNA, RNA e proteínas (Figura 7). Por exemplo, a microcina B17 (MccB17) inibe a DNA-girase, a MccJ25 inibe a RNA polimerase, e a MccC7-C51 inibe a aspartil-RNA sintase. Há também exceções, como a MccE492, que funciona através da formação de poros (COTTER et al., 2013).

A Classe I de bacteriocinas possui amplo espectro de ação e geralmente formam poros instáveis, porém algumas moléculas de ancoragem presentes na membrana alvo podem funcionar como receptores, aumentando a condutividade e a estabilidade dos poros (MOLL et al. 1999). A nisina pertencente à classe, tem modo de ação duplo (Figura 5). Os lipídeos II, presentes na membrana alvo, são os principais transportadores de subunidades de peptidoglicano do citoplasma para a parede celular, a nisina se liga ao lipídeo II impedindo a síntese correta da parede celular. Além disso, o lipídeo II pode atuar como uma molécula de ancoragem em que a nisina se liga para se inserir na membrana formando poros (COTTER et al., 2005).

Já as bacteriocinas de Classe II são termo-estáveis, com espectro restrito de atividade, sendo os receptores da membrana da célula alvo que determinam sua especificidade de ligação. Em geral, possuem uma estrutura helicoidal anfifílica, o que lhes permite inserir na membrana da célula-alvo (Figura 5 e 7),

conduzindo à despolarização por dissipação da PMF, conseqüentemente há o desequilíbrio do conteúdo intracelular (COTTER et al., 2005; MOLL et al. 1999).

Bacteriocinas Classe III ou bacteriolisinas, como a lisostafina, podem funcionar diretamente sobre a parede celular de bactérias Gram-positivas alvos, causando sua lise (COTTER et al., 2005). Um resumo do modo de ação das diferentes classes de bacteriocinas está representado na Figura 5.

Existem dois modelos que simulam o mecanismo de ação de peptídeos sobre a membrana plasmática, o modelo *Wedge-like* e o *Barrel stave* (Figura 6). Estes diferem quanto à forma de inserção da bacteriocina na membrana da célula alvo.

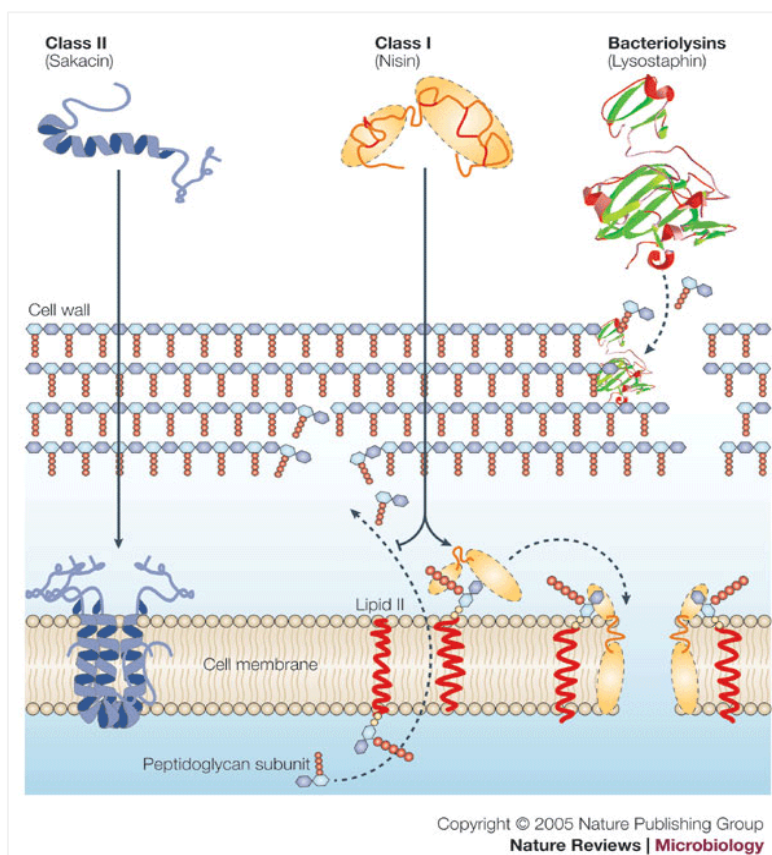
Bacteriocinas Classe I atuam de acordo com o modelo *Wedge-like*, em que a formação do poro ocorre quando há ligação de moléculas de bacteriocinas à superfície da membrana provocando sua desestabilização (MOLL et al., 1996). A PMF promove a inserção da porção C-terminal do peptídeo na bicamada lipídica, no entanto o peptídeo não entra em contato com a parte hidrofóbica da membrana. Vários peptídeos inseridos podem dar origem a um local de perturbação causando a formação de poros temporários lipídeo-proteína. Tais estruturas são intrinsecamente instáveis, devido às forças hidrofóbicas que irão conduzir os rearranjos dos lipídios na sua organização original em bicamada (MOLL et al., 1999; ROSA e FRANCO, 2002).

A nisina, uma bacteriocina Classe I, apresenta pelo menos três tipos de atividade antimicrobiana além da formação de poros na membrana citoplasmática, é capaz de inibir a germinação de esporos bacterianos, a biossíntese da parede celular e, a atividade de enzimas autolíticas (MOLL et al., 1996).

Bacteriocinas de Classe II formam poros de acordo com o modelo *Barrel stave*, em que vários monômeros de bacteriocinas com estrutura  $\alpha$ -hélice atuam em conjunto, estes se agregam lateralmente para formar poros na membrana (Figura 6). O peptídeo em alfa-hélice fica se liga ao receptor de ancoragem, a porção hidrofílica fica voltada para a parede celular e a porção hidrofóbica se liga às cadeias de ácidos-graxos dos lipídios da membrana (MOLL et al., 1999; ROSA e FRANCO, 2002).

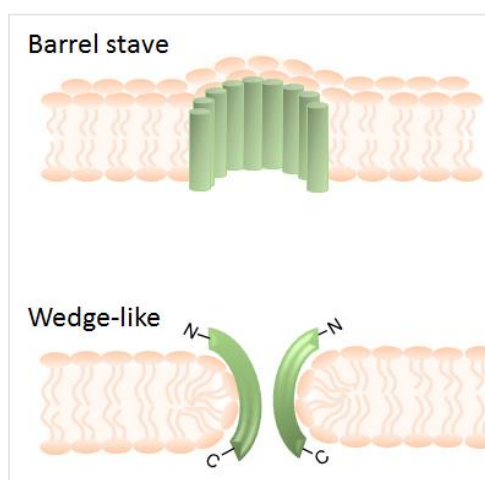
Um exemplo do mecanismo de ação das bacteriocinas Classe II é o da lactococcina, os monômeros de lactococcina se ligam a um receptor de

membrana (manose-fosfotransferase - ManPTS) se inserem e dão origem aos poros (Figura 7) (COTTER et al., 2013).



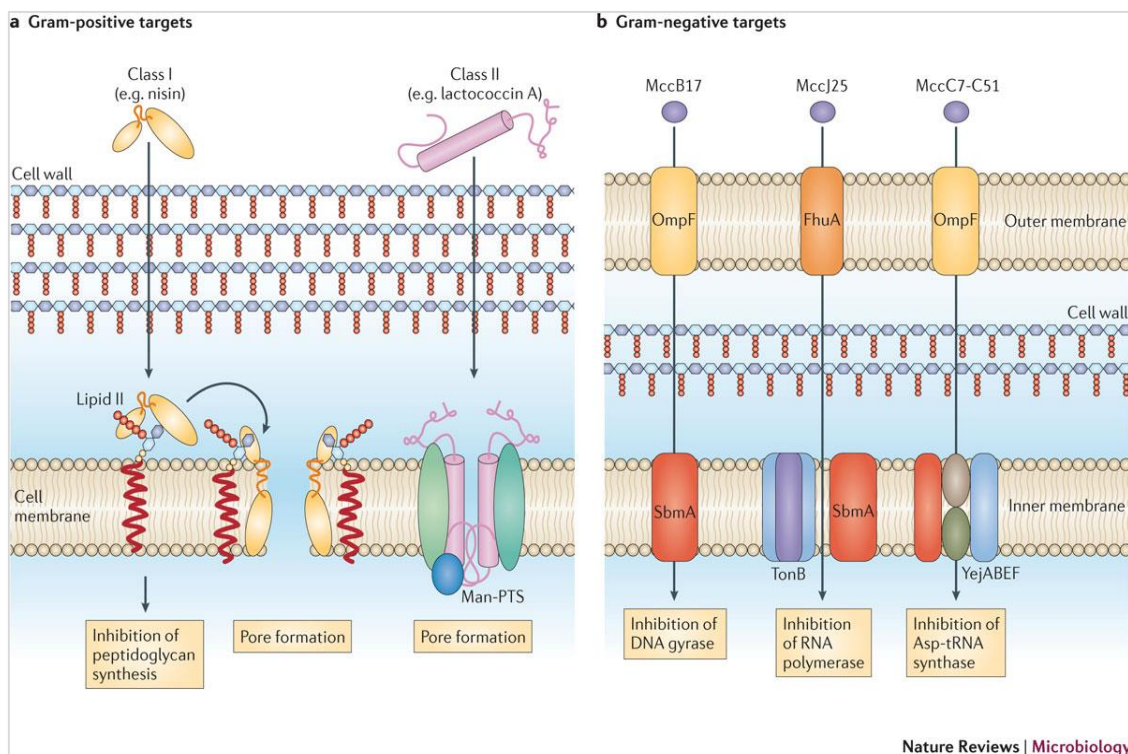
Fonte: Cotter et al. (2005).

Figura 5 – Modo de ação de bacteriocinas de BAL.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6 – Modelos de formação de poros.



Fonte: Cotter et al. (2013).

**Figura 7** – Mecanismos de ação de bacteriocinas. (a) Bactérias Gram-positivas, (b) Bactérias Gram-negativas.

#### 4.6 APLICAÇÕES DE BACTERIOCINAS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Bioconservação refere-se a um armazenamento prolongado que objetiva a extensão da vida de prateleira e segurança dos alimentos, usando sua microbiota natural ou introduzida, e/ou seus produtos antibacterianos (STILES, 1996).

O uso de bactérias ácido lácticas em preparos fermentados é conhecido há séculos por estender o tempo de vida de diversos produtos (lácteos, cárneos, bebidas fermentadas). Como culturas starter e co-culturas, as BAL proporcionam uma ação conservante nos alimentos, esta é derivada da formação de metabólitos com atividade antimicrobiana capazes de inibir bactérias patogênicas ou eliminá-las competitivamente, tais como, ácidos orgânicos (ácido láctico, acético e fórmico), peróxido de hidrogênio (na presença de oxigênio), diacetil, aldeídos (p.ex.  $\beta$ -hidroxi-propionaldeído) e bacteriocinas (DU TOIT et al., 2000; GILLOR et al., 2008; LINDGREN e DOBROGOSZ, 1991; SETTANI e CORSETTI, 2008).

Devido à atividade contra patógenos de origem alimentar e as exigências de consumidores para o uso de conservantes "naturais", as bacteriocinas têm sido sugeridas como bioconservadores de alimentos (FRANZ et al., 2007). São consideradas uma alternativa aos conservantes químicos, pois são inofensivas às células eucariotas, geralmente tolerantes ao pH e calor, e facilmente digeridas por enzimas proteolíticas do estômago, devido a sua natureza proteica (GÁLVEZ et al., 2007).

Os alimentos podem ser suplementados com bacteriocina *ex situ* ou por meio de inoculação com a espécie produtora, a fim de obter bacteriocinas *in situ*. No primeiro exemplo, as bacteriocinas são obtidas por cultivo da cepa produtora num fermentador em escala industrial, portanto, podem ser adicionadas na forma parcialmente purificada ou já purificadas, sendo necessária uma aprovação legal de seu uso como conservante de alimentos (GÁLVEZ et al., 2007).

Os primeiros resultados promissores, quanto à aplicação dessas bacteriocinas na bioconservação de alimentos, foram obtidos por Hirsch et al, (1951), com o uso da nisina produzida por *Streptococcus* sp. na prevenção dos defeitos de estufamento tardio em queijo tipo Suíço (THOMAS e DELVES-BROUGHTON, 2005). A nisina possui quatro tipos de atividades antimicrobianas, seu efeito bactericida ocorre por meio da formação de poros na membrana citoplasmática, da inibição da germinação de esporos bacterianos, da inibição da síntese da parede celular ou afetando a atividade de enzimas autolíticas (MOLL et al., 1996). Atualmente a nisina é a única bacteriocina licenciada para o uso como um aditivo alimentar em vários países (Tabela 6), porém outras podem estar acidentalmente presentes nos alimentos (FRANZ et al., 2007).

As bacteriocinas de BAL têm sido usadas como agentes terapêuticos na medicina veterinária e médica, substâncias fitossanitárias para a proteção de plantas, bioconservantes de alimentos, e também no desenvolvimento de probióticos (DHEWA, 2012). Tais peptídeos antimicrobianos são ativos contra patógenos de origem alimentar, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* e células vegetativas e esporos de *Clostridium botulinum* (CLEVELAND et al., 2001; GIRAFFA et al., 2003).

**Tabela 6** – O uso da nisina como conservante alimentar em diferentes países.

| Países     | Alimento em que há permissão para o uso de nisina        | Nível máximo (UI/g) |
|------------|--|---------------------|
| Bélgica    | Queijo   | 100                 |
| Argentina  | Queijo processado  | 500                 |
| Brasil     | Queijo, vegetais enlatados, salsichas                    | 500                 |
| Itália     | Queijo   | 500                 |
| México     | Nisina permitida como aditivo                            | 500                 |
| Holanda    | Queijo industrializado, queijo processado, queijo ralado | 800                 |
| Rússia     | Queijo processado dietético, vegetais enlatados          | 8000                |
| EUA        | Queijo processado e pasteurizado                         | 10000               |
| França     | Queijo processado  | sem limite          |
| Inglaterra | Queijo, alimentos enlatados, creme                       | sem limite          |
| Peru       | Nisina permitida como aditivo                            | sem limite          |
| Austrália  | Queijo, queijo processado, tomates enlatados             | sem limite          |

**Fonte:** Cleveland et al. (2001).

Entre as BAL, o gênero *Enterococcus* é conhecido há tempos por ser capaz de produzir substâncias antimicrobianas, algumas das quais exibem um amplo espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como as enterocinas (SIMONETTA et al., 1997).

*L. monocytogenes* tem sido frequentemente encontrada como contaminante em queijos e leite, sendo responsáveis por vários surtos de listeriose. Muitas cepas de enterococos, produtoras de enterocinas e com atividade anti-listerial têm sido utilizadas em queijos, sendo desnecessário o uso de conservantes adicionais (ACHEMCHAM et al., 2006).

As enterocinas com alta atividade anti-listerial são promissoras como agentes antimicrobianos na conservação de alimentos, como por exemplo, a Enterocina 1146, cuja produção tem sido estudada em detalhes, apresenta efeito bactericida contra *L. monocytogenes* em meio tamponado, caldo e leite (KHAN et al., 2010; FOULQUIÉ MORENO et al., 2003). Foulquié Moreno et al. (2003) testaram a atividade de uma enterocina de *E. faecium* RZSC5 no processo de fabricação de queijos. Segundo estes autores, a enterocina produzida apresentou atividade anti-listerial durante a fermentação do leite e de outros meios complexos.

Achemchem et al. (2006) introduziram uma enterocina produzida por *E. faecium* F58 em JBen, um queijo fresco marroquino. Quando *E. faecium* F58 foi inoculado no leite 12h antes da contaminação com *L. monocytogenes*, houve

redução parcial da carga bacteriana. Porém quando a contaminação foi feita antes do processo de embalagem, observou-se um declínio considerável da contagem de células listeriais viáveis, e após uma semana de armazenamento a 22°C não foi detectada a presença de contaminação, mostrando a eficácia da enterocina e sua viável aplicação em alimentos.

As enterocinas tem aplicabilidade não somente na indústria de laticínios, mas também atua na conservação de outros produtos como vegetais (MOLINOS et al., 2005), carnes (ANANOU et al., 2005) e sucos de frutas (GRANDE et al., 2005).

Grande et al. (2007) testaram o efeito da enterocina AS-48 em diferentes preparos vegetais, como sopas e purês. Acrescentando AS-48 a 10 mcg/ml, a bactéria indicadora *B. cereus* LWL1 foi completamente inibida em todas os seis produtos vegetais testados durante 30 dias a 6, 15 e 22°C.

Ananou et al. (2010), testaram o efeito isolado da enterocina AS-48 e também em combinação com conservantes químicos e calor contra a *L. monocytogenes* e *S. aureus* em presunto cozido. Tanto o peptídeo sozinho quanto combinado foram eficazes na proteção contra *L. monocytogenes*, e em menor grau, contra *S. aureus*, comprovando a grande aplicação das enterocinas na inibição de micro-organismos patogênicos veiculados em alimentos.

## 5 REFERÊNCIAS

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.169–185, 1995.

ACHEMCHAM, F.; ABRINI, J.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. **Journal of Food Protection**, v.69, n.10, p.2370-2376, 2006.

ANANOU, S.; BAÑOS, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. **Food Control**, v.21, p.478–486, 2010.

ANANOU, S.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. **Meat Science**, v.71, p.549–556, 2005.

AYMERICH, T.; HOLO, H.; HÅVARSTEIN, L. S.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.5, p.1676–1682, 1996.

BALCIUNAS, E. M., MARTINEZ; F. A. C.; TODOROV, S. D.; MELO FRANCO B. D. G.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v.32, p.134-142, 2013.

BIEMANS-OLDEHINKEL, E.; DOEVEN, M. K.; POOLMAN, B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. **FEBS letters**, v.580, p.1023–1035, 2006.

BRUNO, M. E. C.; MONTEVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.9, p. 3003–3010, 1993.

CASAUS, F.; NILSEN, T.; CINTAS, L. M.; NES, L. F.; HERNÁNDEZ, P. E.; HOLO, H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* TI36 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiology**, 143v., p.2287–2294 , 1997.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBES, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.1, p.158–229, 2007.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.82–100, 2003.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HÅVARSTEIN, L. S.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P , a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4321–4330, 1997.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HERRANZ, C.; HAVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; HERNÁNDEZ, 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, p.6806–6814, 2000.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.; 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. An 'Upp'-turn in bacteriocin receptor identification. **Molecular Microbiology**, v.92, n.6, p.1159-1163, 2014.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, n.3, p.777-788, 2005.

COTTER, P. D.; ROSS, R.P; HILL, C. Bacteriocins — A viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, n.11, p.95-105, 2013.

DE VUYST, L.; FOULQUIÉ MORENO, M.; REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.299–318, 2003.

DHEWA, T. Screening, production purification and potential use of bacteriocins from lactic acid bacteria of meat and dairy food origin. In: International Conference on Nutrition and Food Sciences, 2012, Singapura. **Anais... IACSIT Press**, 2012. v.39, p.35–41.

DIOP, M. B.; DUBOIS-DAUPHIN, R.; TINE, E.; NGOM, A.; DESTAIN, J.; THONART, P. Bacteriocin producers from traditional food products. **Biotechnologie Agronomie Société et Environnement**, v.11, n.4, p.275–281, 2007.

DU TOIT, M. D.; FRANZ, C. M. A. P.; DICKS, L. M. T.; HOLZAPFEL, W. H. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.482–494, 2000.

DUFOUR, A.; RINCÉ, A.; UGUEN, P.; LE PENNEC, J. P. IS1675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lacticin 481 lantibiotic operon. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.19, p.5600–5605, 2000.

FELTCHER, M. E.; BRAUNSTEIN, M. Emerging themes in SecA2-mediated protein export. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.779-789, 2012.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; REA, M. C.; COGAN, T. M.; DE VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, n.1, p.73–84, 2003.

FRANZ, C. M. A. P.; VAN BELKUM, M. J.; HOLZAPFEL, W. H.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, n.3, p.293–310, 2007.

FRANZ, C. M. A. P.; WOROBO, R. W. W.; QUADRI, L. E. N.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2170-2178, 1999.

FREDERICQ, P. Colicins and colicinogeny. **Annales de l'Institut Pasteur Paris**, v.107, p.7–17, 1964.

FREDERICQ, P. Sur la sensibilité et l'activité antibiotique des Staphylocoques. C. R. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, v.140, p.1167–1170, 1946.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; BEN OMAR, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, n.1-2, p.51–70, 2007.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, n.4, p.591–606, 2008.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.163–171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.215–222, 2003.

GRANDE, M. J.; LÓPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; BEN OMAR, N.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v.70, p.405-411, 2007.

GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; VALDIVIA, E.; ABRIOUEL, H.; MAQUEDA, M.; BEN OMAR, N.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A. Stability of Enterocin AS-48 in Fruit and Vegetable Juices. **Journal of Food Protection**, v.10, 2085-2094, 2005.

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coilibacille. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, v.93, p.1040–1041, 1925.

HAJIKHANI, R.; BEYALTI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.2, p.105–108, 2007.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Society for Applied Bacteriology symposium series**, v.26, p. 1–11, 1997.

HAVARSTEIN, L. S.; DIEP, D. B.; NES, I. F. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. **Molecular Microbiology**, v.16, n.2, p.229–240, 1995.

HENG, N. C. K.; TAGG, J. R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.4, 2006.

HERRANZ, C.; DRIESSEN, A. J. M. Sec-Mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.4, p.1959–1963, 2005.

HURST, A. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, v.27, p.85–123, 1981.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, n.2, p.171–200, 1995.

JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH, L.; WOLLMAN, E. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. **Annales de l'Institut Pasteur Paris**, v.84, p.222–224, 1953.

KEYZER, J.; VAN DER DOES, C.; DRIESSEN, A. J. M. The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v.60, n.10, p.2034–52, 2003.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P.L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.1-2, p.1–10, 2010.

KJOS, M.; BORRERO, B.; OPSATA, M.; BIRRI, D. J.; HOLO, H.; CINTAS, L. M.; SNIPEN, L.; HERNÁNDEZ, P. E.; NES, I. F.; DIEP, D. B. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Microbiology**, v.157, p.3256–3267, 2011.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, 39–85, 1993.

KOJIC, M.; STRAHINIC, I.; FIRA, D.; JOVCIC, B.; TOPISIROVIC L. Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, n.11, p.1110–1120, 2006.

LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Reviews**, v.87, p.149-164, 1990.

LYCKLAMA A NIJEHOLT, J. A.; DRIESSEN, A. J. M. The bacterial Sec-translocase: Structure and mechanism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.367, p.1016–1028, 2012.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G. ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.153-161, 2003.

MOLINOS, A. C.; ABRIOUEL, H.; BEN OMAR, N.; VALDIVIA, E.; LUCAS, R. L.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ CAÑAMERO, M.; GALVEZ, A. Effect of Immersion Solutions Containing Enterocin AS-48 on *Listeria Monocytogenes* in Vegetable Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p. 7781–7787, 2005

MOLL, G.; ROBERTS, G.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.69, p.185–191, 1996.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.76, p.185–98, 1999.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HÅVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.70, n.2-4, p.113–28, 1996.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HOLO, H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.4, p.1189–98, 2007.

O'KEEFFE, T.; HILL, C.; ROSS, R. P. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1506–1515, 1999.

OSMANAĞAOĞLU, O.; KIRAN F. Evidence for a chromosomally determined mesenterocin, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* OZ. **Journal of Basic Microbiology**, v.51, n.3., p.279–288, 2011.

OTT, E. M.; MÜLLER, T.; MÜLLER, M.; FRANZ, C. M; ULRICH, A; GABEL, M; SEYFARTH, W. Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.1, p.54–66, 2001.

ROSA, M.C.; FRANCO, B.D. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde, UNINOVE - São Paulo**, v.1, p.09–15. 2002.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - A minireview. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.678–683, 2006.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.123–138, 2008.

SIMONETTA, A. C.; MORAGUES DE VELASCO L.G.; FRISO, L.N. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.139–143, 1997.

SONOMOTO, K.; NISHIE, M.; NAGAO, J. I. Antibacterial peptides “bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Science*, Osaka, v.17, p.1–6, 2012. STILES, M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.235–249, 1996.

TAGG, J. R.; DAJANI, A S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.40, n.3, p.722–56, 1976.

THOMAS, L. V.; DELVES-BROUGHTON, J. 2005, Nisin. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN A. L. (Eds.), **Antimicrobials in Food**, 3.ed, CRC Press, 2005, p.237–274.

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO. J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.230–235, 2006.

VAN BELKUM, M. J.; STILES, M. E. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. **Natural Product Reports**, v.17, n.4, p.323–335, 2000.

YANG, S. C.; LIN C. H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p.1–10, 2014.

## PARTE 1

**Identification of enterocin-encoding genes and screening for antimicrobial activity in *Enterococcus***

Mayara Baptistucci Ogaki<sup>a</sup>, Katia Real Rocha<sup>a</sup>, Luciana Furlaneto-Maia<sup>b</sup>, Marcia Cristina Furlaneto<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Londrina State University, Brazil

<sup>b</sup> Department of Education, Federal Technological University of Paraná, Brazil

**Abstract**

In this study, a total of 135 enterococci strains from different sources were evaluated by PCR method to detect enterocin-encoding genes *entA*, *entP*, *entB*, *entL50A* and *entL50B*. Enterocin genes occurred at different frequency where, *entL50A* and *L50B* were not detected, and *entA* was the most frequent, followed by *entP* and *entB*. This study have shown a higher frequency of genes occurring singly than in multiple combinations. The 80 isolates that presented at least one enterocin-encoding (Gene<sup>+</sup> strains) were screened for antimicrobial activity. The majority of indicator strains exhibited growth inhibition, such as *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 6538, *Listeria innocua* CLIP 12612, *Listeria monocytogenes* CDC 4555, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076. Based on screening assay, 82.5% of Gene<sup>+</sup> strains inhibited at least one of the indicator strains, and the isolates harbouring multiple enterocin-encoding genes inhibited a larger number of indicators strains than isolates harbouring a single gene. The detection of bacteriophage activity and the identification of gene *cyIA* (responsible for encoding cytolysin) was performed to exclude a possible inhibition by other antimicrobials agents instead of enterocins. Isolates with anti-listerial activity was also tested under different conditions for culture media. The media MRS agar supplemented with 2% (w/v) of yeast extract was the better solidified-medium for enterocin production. Furthermore, our data revealed that none of the enterococci strains with antimicrobial activity exhibited the gene *cyIA* or bacteriophage activity, therefore the enterocins could be acting. It have been concluded in this study that there was a large number of isolates harbouring enterocin-encoding genes with potential application as biopreservatives in food industry, due to their capability of controlling spoilage food pathogens.

Keywords: Enterocin, enterocin-encoding genes, antimicrobial activity, *Enterococcus*

## 1. Introduction

Enterococci are lactic acid bacteria (LAB) commonly present in food, because of their capability to tolerate and survive under adverse environmental conditions as temperature extremes, salt and acid in high concentrations (Giraffa, 2002; Hardie and Whiley 2000; Pangallo et al., 2004). LAB are interesting because of their status generally recognized as safe (GRAS), therefore their applicability in food and pharmaceutical industry is practicable (Du Toit et al., 2000; Sonomoto et al., 2012). Among LAB, the members of the genus *Enterococcus* are found in vegetables (De Kwaadsteniet et al., 2005), intestine of animals (Sanchèz et al., 2007) including humans (Turgis et al., 2013) and fermented food, like cheeses (Rivas et al., 2012; Ahmadova et al., 2013; Sparo et al., 2012), sausages (Sabia et al., 2008) and other meat products (Bellei et al., 2011; Ishibashi et al., 2012); *Enterococcus* have ability to inhibit pathogenic microorganisms producing antimicrobial compounds, such as diacetyl, organic acids, hydrogen peroxide and enterocins (Daeschel, 1989), with a potential applicability as food preservatives and other biotechnological purposes.

Enterocins are enterococci bacteriocins, peptides with antimicrobial activity synthesized on ribosomes (Nes et al., 1996). They have ability to kill or inhibit the growth of bacteria of the same species or other genera in a competitive exclusion (Cleveland et al., 2001; Cotter et al., 2005). Different enterocins have shown activity against several foodborne pathogens like *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Mixococcus* strains (Ananou et al., 2010; Cleveland et al., 2001; Gálvez et al., 2008; Hajikani et al., 2007; Khan et al., 2010). The most common enterocins described in food isolates are enterocins A, B, P, L50A and L50B (Du Toit et al., 2000).

These antimicrobial peptides own specific molecular properties, including low toxicity, versatility of broad and narrow-spectrum and ability of *in situ* production by probiotic strains. Because of these properties, they became a target of industrial interest such as food biopreservatives or a viable alternative to antibiotics employed against pathogens (Ananou et al., 2010; Cotter et al., 2013; Franz et al., 2007; Rehaiem et al., 2014).

Several researches reported the use enterocins as bioconservatives in preparing foods. For example, enterocins produced by *E. faecium* RZS C5 and *E. faecium* DPC 1146 in cheddar cheese (Foulquie Moreno et al., 2003), enterocins produced by *E. faecalis* CECT7121 in crafted goat cheese (Sparo et al., 2012) and enterocin on fresh-cut lettuce (Bellei et al., 2011). In addition, the incorporation of enterocin AS-48 in sausages (Ananou et al., 2005a; Ananou et al., 2005b), fruit juices (Grande et al., 2005), cooked ham (Ananou et al., 2010) and other dairy products (Muñoz et al., 2007).

On the assumption that a specific bacteriocin will have its own unique properties and usefulness in targeting microbial pathogens, isolation and purification of new bacteriocins will always prove beneficial (Osmanağaoğlu, 2007). This study was conducted to isolate and identify bacteriocin-producing enterococci from different sources, as well as to characterize bacteriocin-like substances and detect enterocin-encoding genes produced by them against food-borne pathogens, to establish the best producer for his potential application as biopreservative.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Bacterial strains and growth conditions*

A collection of 135 enterococcal strains isolated from different sources including fresh cheeses (n = 103) and clinical colonization samples (n = 32) (Furlaneto-Maia et al., 2014), belongs to the Genome Lab in Londrina State University (UEL). Nine indicator strains are used such as *Listeria innocua* CLIP 12612, *Listeria monocytogenes* CDC 4555, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* UK1 and *Escherichia coli* BAC 49LT ETEC. Brain Heart Infusion medium (BHI) was used for growth and stock cultures. Stock cultures were stored at -20°C in BHI broth supplemented with 20% (v/v) of glycerol. Fresh cultures were prepared with inoculation of 20µl of frozen stock in 3ml of BHI broth incubated for 18 to 24h at 37°C.

## 2.2. PCR genotyping for enterocins-encoding genes

The most common enterocins-encoding genes *entA*, *entB*, *entP*, *entL50A* and *entL50B* (Aymerich et al., 1996; Casaus et al., 1997; Cintas et al., 1997; Cintas et al., 2000) were amplified by polymerase chain reaction (PCR).

All reactions in the thermocycler (Esco Swift MaxPro) were carried out using total DNA extracted according to the boiling method described by Marques and Suzart (2004). PCR was performed in a final volume of 20µl containing 2µl of total DNA, Taq buffer (10X), 2.5mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.17mM of dNTPs, 1pmol of each primer (forward and reverse) and 1U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). The negative controls contained all the reagents except the DNA extracted. The cycles conditions were those described by De Vuyst et al. (2003), using different temperatures for specific primers (Table 1). The amplicons were separated by eletrophoresis in 2% agarose gels containing ethidium bromide, the size of the amplified product was compared with the molecular size marker 100bp (Amersham Pharmacia Biotech). The visualization by UV light was performed by the photographic system computerized L-PIX ST (LOCCUS).

## 2.3. Screening for enterocin production

The screening method for enterocin production was performed according Harris et al. (1989) with modifications. Isolates with presence at least one enterocin-encoding genes (designed Gene<sup>+</sup>) were screened for their capability to produce bacteriocins against nine different indicators microorganisms. *Enterococcus* were streaked in plates containing BHI agar that were incubated at 37°C for 24h. The plates were inverted to receive 1ml of chloroform in the covers, and remained closed for 20 minutes. Residual chloroform was evaporated by opening of plates. Through the pour plate method, each indicator strain (10<sup>8</sup> cells.ml<sup>-1</sup>) was inoculated into soft BHI agar (0.8%) and poured into *Enterococcus* plates forming an overlay, and then plates were incubated at 37°C for 24h. Isolates were considered able to produce bacteriocins if inhibitions zones were found around the colonies and these zones were measured in millimeters. In order to compare statistically, Fisher's exact test was used to analyze the association among the antimicrobial activity against at least one indicator strain

(Ent<sup>+</sup>) and the presence of enterocins genes occurring singly or in multiple combinations (considering  $p < 0,05$ ).

#### 2.4. Detection of bacteriophage activity

To exclude the possible presence of lytic bacteriophages acting on antimicrobial activity, the detection of bacteriophage activity was evaluated according to Lewus et al. (1991). A portion of the antagonism zone was cut and added to 3ml of BHI broth, and then macerated with sterile tips. The suspension was held at room temperature, an aliquot of 100 $\mu$ l of this suspension and 100 $\mu$ l of indicator strain culture (grown at 37°C for 18-24h in BHI broth) were added in 4ml of BHI soft agar, this portion was poured in BHI plates forming an overlay, and incubated in the same conditions reported. The formation of plaques was considered an indicative of bacteriophages activity.

#### 2.5. PCR genotyping for cytolysin activator gene (*cyIA*)

To identify the cytolysin marker (*cyIA*) on isolates, specific primers was designed (Table 1). The reactions were carried out in thermal cycler Techne-TC3000 and the reaction contents following item 2.2. The cycles conditions were those described by Dutka-Malen et al. (1995), using different temperatures for specific primers (Table 1). The negative control contained all reagents except the DNA. The resulting amplification products were separated on agarose gel 1%, stained with ethidium bromide. The size of the amplified product was compared with the molecular size marker 1kb (Amersham Pharmacia Biotech).

#### 2.6. Enterocin production under different conditions of culture media

The isolates that presented antimicrobial activity against *L. innocua* were tested under different conditions for culture media. Media assays were performed using BHI and MRS (Man, Rogosa, Sharpe) agar and supplementations: BHI 2% (w/v) glucose, BHI 4.5% (w/v) lactose, MRS 2% (w/v) yeast extract, MRS 2% (w/v) glucose and MRS 1.5% (w/v) lactose. *L. innocua* was selected for tests, because these bacteria are one of the most common indicator strain in assays involving enterocins. This evaluation was performed to fix the best media and the best enterocin producers using statistical analysis. The enterocin activity did not

follow a normal distribution, therefore a non-parametric test – Friedman’s test, was selected for comparisons (considering  $p < 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Genotyping

Among 135 *Enterococcus* spp. strains evaluated in this study, the presence of one or more enterocin-encoding genes was detected in 80 isolates (59.26%). Isolates harbouring at least one enterocin-encoding gene were referred as Gene<sup>+</sup> strain and was considered 100%. Considering Gene<sup>+</sup> strains, 21 (26.25%) belonged to clinical colonization samples and 59 (73.75%) belonged to food samples.

Genes *entA*, *entB* and *entP* that codifies enterocins A, B and P respectively, were identified in this study, owning the expected sizes: *entA* 138 bp, *entB* 201 bp and *entP* 87 bp (De Vuyst et al., 2003; Özemir et al., 2011). The enterocin-encoding genes *entL50A* and *entL50B* were not detected in any isolate. The enterocin A gene had a higher frequency among Gene<sup>+</sup> strains and was detected in 69 isolates (86.25%), occurring singly in 36 isolates (45%).

The *entP* gene was the second most frequent, detected in 42 isolates (52.5%) occurring singly in 10 isolates (12.5%), besides, none of these isolates exhibiting *entP* belonged to clinical colonization samples. The less abundant gene was the *entB*, which was not identified singly, but associated to other gene in 10 isolates, which two of them belonged to clinical colonization samples and the remaining belonged to food samples. The summary of results for genotyping of enterocin-encoding genes is shown in Table 2, according to the source and corresponding species.

In general, this study have shown a higher frequency of genes occurring singly than in multiple combinations. For food isolates it was found an equivalent proportion between isolates with multiple and single genes, unlike in clinical colonization isolates wherein there was a higher frequency of genes occurring singly.

The combination of two genes *entA* and *entP* was the most predominant association, occurring in 24 strains (30%), followed by *entA* and *entB* (2.5%). The combination of three genes *entA*, *entB* and *entP* was present in 8 isolates (10%).

Considering clinical colonization samples, only two isolates showed combination of genes, the genes *entA* and *entB*.

Regarding species prevalence, *E. faecium* occurred predominantly among Gene<sup>+</sup> strains (88.75%), followed by *E. faecalis* (8.75%) and *Enterococcus* sp. (2.5%).

### 3.2. Screening for enterocin production

The 80 enterococci isolates with presence at least one enterocin-encoding gene (Gene<sup>+</sup> strains) were screened to evaluate the antimicrobial inhibition of different indicators strains.

Indicator strains such as *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 6538, *L. innocua* CLIP 12612, *L. monocytogenes* CDC 4555, *E. faecalis* ATCC 29212 and *S. enteritidis* had growth inhibition by Gene<sup>+</sup> strains; the remaining two Gram-negative strains were not inhibited. The inhibition percentage of the indicator strains was summarized on Fig. 1.

More than half of Gene<sup>+</sup> strains inhibited at least one of the indicator strains, totaling 66 isolates (82.5%), and these isolates were considered 100%. The isolates that presents antimicrobial activity against at least one indicator strains was called Ent<sup>+</sup> strains. The close related *E. faecalis* strain was the indicator microorganism that was inhibited by Gene<sup>+</sup> strains, followed by the potential pathogenic strains such as *L. innocua*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis* (Fig. 1).

Among the 21 isolates that belonged to clinical colonization samples, some 17 (80.95%) have shown antimicrobial activity at least one indicator strain; besides the 59 Gene<sup>+</sup> strains that belonged to food samples, some 49 (83.05%) was identified as Ent<sup>+</sup>. The proportion of Ent<sup>+</sup> strains between these two different sources was equivalent, where no correlation was found between the strains origin and the inhibitory activity, considering that sampling of clinical colonization isolates was smaller than that composed by food isolates.

Statistical analysis with Gene<sup>+</sup> strains that showed antimicrobial activity against *L. innocua*, revealed that the occurrence of inhibitory activity by Ent<sup>+</sup> strains was dependent of enterocins genes occurring singly or in combinations. The number of strains harbouring genes in combinations differed significantly

from strains harbouring single genes ( $p = 0.02$ ). There was a higher frequency of isolates with combined genes showing antimicrobial activity than isolates with singly genes.

The bacteriophage activity assay revealed the absence of plaques zones, suggesting that none of the inhibition observed is due to lyses promoted by phages. Concerning the presence of the gene *cyIA*, responsible to encoding a cytolysin activator, only one clinical colonization isolate presented *cyIA*, but this isolate was not belong to Gene<sup>+</sup> strains, therefore it was not evaluated in screening assay. In this study was also evaluated the production of organic acids, and none of isolates tested showed this production (data not shown).

### 3.3. Enterocin production under different conditions of culture media

Among the 24 isolates exhibiting anti-listerial activity (Fig. 1), eleven showed inhibition zones under all conditions tested, therefore, they were selected for comparative purposes using Friedman's test in order to establish the best media for enterocin production and the best enterocin producer.

Concerning the influence of culture media on inhibition of *L. innocua*, the different media showed significant difference ( $p = 0.002$ ). The MRS agar supplemented with yeast extract was the best solidified-medium for enterocin production, followed by BHI unsupplemented, BHI glucose, MRS lactose, MRS glucose, BHI lactose and MRS unsupplemented. Significant differences between MRS yeast extract and BHI lactose, MRS glucose, and MRS without supplementations were present ( $p < 0.05$ ), the remaining media evaluated did not showed significant difference in their influence on inhibition of *L. innocua*, therefore, they can be considered excellent conditions of cultivation for enterocin production in solidified-medium assays.

The performance of isolates in different culture media, concerning isolates differed significantly from each other ( $p = 0.0001$ ). The isolate 26 was the best enterocin producer followed by: 20, 22, 24, 27, 25, 52, 62, 71, 70 and 69. Isolates 26, 20, 22, 24 and 27 differed significantly from isolates 70 and 71 that showed the lowest enterocin production. The six best producers did not differ from each other, and might be considered potential isolates to be used in future enterocin assays.

#### 4. Discussion

Enterococci are commonly isolated from fermented foods (Ahmadova et al., 2013; Castro et al., 2002; Ishibashi et al., 2012; Muguerza et al., 2006; Sabia et al. 2008; Rivas et al., 2012; Yang et al., 2012). They are mostly found in cheeses and are responsible for the production of substances that attribute different aroma and flavor to dairy foods (Manolopoulou et al., 2003; Sarantinopoulous et al., 2001). Enterococci in food industry are commonly used as biopreservatives, due to their ability to produce antimicrobial compounds, including enterocins (El-Ghaish et al., 2011).

Consumers interest in quality products, without chemical additives, stimulated industrial interest in new strains with biopreservation capability, thereby the evaluation of potential enterocin producers became interesting. The identification of bacteriocin genes in enterococci isolates has been evaluated in several studies, most commonly enterocins A, B, P, L50 A and L50B (De Vuyst et al., 2003; Rehaïem et al., 2014; Rivas et al. 2012; Shin et al., 2008).

In this study, among Gene<sup>+</sup> strains, enterocins were most detected in *E. faecium*, followed by *E. faecalis* which is in agreement to others researches (De Vuyst et al., 2003; Pangallo et al., 2004; Stropfová et a., 2008). Here, enterocin-encoding gene *entA* occurred in a higher frequency among Gene<sup>+</sup> strains (86.25%), occurring singly in 36 (45%). Some studies have shown the prevalent detection of *entA* in *Enterococcus* sp. strains (De Vuyst et al., 2003; Özdemir et al., 2012).

The presence of a single enterocin gene is the most common among *Enterococcus* strains as found in our isolates as well by Stropfová et al. (2008). However, comparing only isolates from food source, a combination of two or more genes was prevalent, as demonstrated by other researchers (Ahmadova et al., 2013; De Vuyst et al., 2003; Özdemir et al., 2012; Rehaïem et al., 2014; Rivas et al. 2012). Detection of enteriocins genes in clinical isolates by Klibi et al. (2008) had shown multiple genes occurring frequently, different to that observed in the present study.

A combination of two genes *entA* and *entP* was frequently among our strains which is in accordance with Stropfová et al. (2008) and De Vuyst et al. (2003). *EntB* had been found associated with *entA* in accordance with De Vuyst

et al. (2003), Poeta et al. (2007) and Ozdemir et al. (2012). This correlation may be due to the absence of transport or accessory protein genes in some *Enterococcus* strains, therefore enterocin B can be secreted via dedicated transport proteins produced by translation in enterocin A operon. Thus, it is possible that both enterocins could be act synergistically when expressed at the same cultivation (Casaus et al., 1997; Franz et al., 1999). Gene *entL50A* and *entL50B* were not detected in this study, such as reported by Sabia et al. (2008).

Concerning the antimicrobial activity, the majority of Gene<sup>+</sup> strains (82.5%) inhibited at least one of the indicator strains, and isolates that harboured multiple enterocin genes inhibited a larger number of indicators strains. The presence of these genes do not indicate that all enterocins were expressed at the same time. Gene expression depends of several factors including environmental conditions and genetic mechanisms (Casaus et al., 1997; Rivas et al., 2012).

Species of Gram-positive bacteria, such as *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*, were more sensitive to enteriocins activity than other indicator strains tested. The closed related strain *E. faecallis* was the indicator that was inhibited by a high number of Gene<sup>+</sup> strains, followed by *L. innocua*. Most bacteriocins have a narrow spectrum, hence is common their activity against genera or species closely related. Another possibility, that can explain the greater inhibition of *E. faecalis* and *L.inocua*, would be due to bacteriocins of Class IIa (as enterocins A and P) binding to specific receptors on target cells, these protein receptors belong to mannose phosphotransferase system (Man-PTS). Class IIa bacteriocins target specifically a subgroup of Man-PTSs (group I); the genera *Listeria* and *Enterococcus* exclusively contain this subgroup protein (Kjos et al., 2009; Kjos et al., 2011). Other studies showed that enterocins positive effect against various Gram-positive bacteria and closely related bacteria as *Listeria* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacilli* and *Leuconostoc* sp. (Ahmadova et al., 2013; De Vuyst et al., 2003; Klibi et al., 2008; Ozdemir et al., 2012; Rivas et al., 2012; Shin et al., 2012).

Concerning Gene<sup>+</sup> strains, it is possible to conclude that inhibitory activity against *L. innocua* was dependent of enterocin genes occurring singly or in combinations. The presence of multiple enterocin genes not indicate that all genes are being expressed at the same time, but if enterocins were present in the same supernatant, antagonistic activity may be higher due to their synergism.

Several studies demonstrated a more efficient inhibitory activity when multiple bacteriocins were produced at the same time (Casaus et al., 1997; Ishibashi et al., 2012; Sanchèz et al., 2007).

Concerning enterocin production under different conditions, the present study concludes that low levels of glucose in both media (BHI and MRS) as well as the introduction of lactose as another carbon source and the increment of nitrogen sources (like yeast extract) influenced positively the enterocin activity.

The increase or decrease in enterocin production by the presence of simple carbon sources (glucose) or disaccharides (lactose) indicated that production depends directly of strains and/or the concentration of carbohydrates. These modifications probably interfered in the osmolarity and availability of nutrient sources of the media, consequently promoting stressful conditions that altered the enteriocin production by enterococci strains.

It is known that stress factors such as low growth and temperature, toxic compounds (NaCl, ethanol and oxygen), and competing microflora can stimulate higher bacteriocin activity, even with lower growth rates. High concentrations of carbon sources also cause a stress conditions, therefore, bacteriocin biosynthesis can be affected depending on the producer strain, the media and culture conditions used in the fermentation process (De Vuyst et al., 1996).

In accordance with the present results, Ogunbanwo et al. (2003) improved bacteriocin production of *Lactobacillus brevis* OG1 in MRS broth with supplementations of low concentration of glucose (1%) and yeast extract (2 and 3%). Evaluations of Foulquie Moreno et al. (2003) also demonstrated the use of disaccharide lactose instead of glucose in MRS broth that also resulted in a greater production of enterocin by *E. faecium* RZS C5.

Other research with *Enterococcus faecium* ST311LD was performed by Torodov and Dicks (2005) that evaluated the production of bacteriocins in MRS broth supplemented with tryptone (20 g.l<sup>-1</sup>), saccharose (5 or 10 g.l<sup>-1</sup>) or vitamin C (1 ppm). According to these authors the employment of these modified media, compared to BHI and M17 broth, soy milk and molases, resulted in improved levels of bacteriocin activity. Torodov and Dicks (2006) also reported similar results where bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* ST23LD and ST341LD varied according to the type and concentration of carbon source tested. Bacteriocin ST23LD production was improved, following in addition of 20 to 40

g.l<sup>-1</sup> of maltose as sole carbon source, while bacteriocin ST341LD was stimulated in presence of tryptone (nitrogen source), and reduced with glucose (10 to 40 g.l<sup>-1</sup>). In conclusion, modifications in the constituents of culture media can influence positively the amount and activity of enterocins, thereby they should be considered for optimization of enterocin production.

In this research, none of isolates with enterocin-encoding genes showed the gene *cy/A*. The gene *cy/A* was responsible to encode a component that activates the cytolysin, a hemolytic toxin with  $\beta$ -hemolytic property presenting bactericidal activity against Gram-positive bacteria (Coburn and Gilmore, 2003; Fisher and Phillips, 2009), this indicates that it was not a cytolysin acting in antimicrobial activity, but probably the enterocins.

In conclusion, following genotyping and screening for antimicrobial activity, was evidenced a large number of isolates with industrial potential for applications as biopreservatives and protetors against foodborne pathogens. However, there is more requirements to perform about isolates characterization and enterocin production optimization, in order to apply these isolates as biopreservatives in food products.

### **Acknowledgement**

The authors express their gratituted to National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Araucaria Foundation (Parana – Brazil) and CAPES (scholarship of Master's Degree student) for their financial support.

### **References**

Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Zadi TM, Kuliyevev A, De Melo Franco BDG, Chobert JM, Haertlé T. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control 2013; 30:631-641.

Ananou S, Baños A, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Gálvez A, Valdivia E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. Food Control 2010; 21:478–486.

Ananou S, Garriga M, Hugas M, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Gálvez A, Valdivia E. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *Int J Food Microbiol* 2005a; 103:179–190.

Ananou S, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Gálvez A, Valdivia E. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci* 2005b; 71:549–556.

Aymerich T, Holo H, Håvarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* 1996; 64:1676–1682.

Bellei B, Miguel M, Mere del Aguila EM, Silva JT, Paschoalin VMF. Purification of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. *J Microbiol Antimicrob* 2011; 3:119-125.

Casaus F, Nilsen T, Cintas LM, Nes LF, Hernández PE, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* TI36 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 1997; 143:2287-2294.

Castro A, Montañó A, Casado FJ, Sánchez AH, Rejano I. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol* 2002; 19:637-644.

Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernandez PE, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:4321-4330.

Cintas L, Casaus P, Herranz C, Havarstein LS, Holo H, Hernández PE, Nes IF. 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. *J Bacteriol* 2000; 182:6806-6814.

Cleveland J, Montville T, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International J Food Microbiol* 2001; 71:1-20.

Coburn PS, Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* 2003; 5:661-669.

Cotter PD, Hill C, ROSS RP. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Rev Microbiol* 2005; 3:777-788.

Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins – A viable alternative to antibiotics? *Nature Rev Microbiol* 2013; 11:95-105.

Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa DR, Baldassarri L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004; 53:13-20.

Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol* 1989; 43:164-167.

De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H, Dicks LMT. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 2005; 105:433-444.

De Vuyst L, Moreno MF, Revets H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol* 2003; 84:299-318.

De Vuyst L, Callewaert R, Crabbe K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 1996; 142:817-827.

Du Toit MD, Franz CMAP, Dicks LMT, Holzapfel WH. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J Appl Microbiol* 2000; 88:482-494.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33:24-27.

El-Ghaish S, Ahmadova A, Hadji-Sfaxi I, El-Mecherfi KE, Bazukyan I, Choiset Y, Rabesona H, Sitohy M, Popov YG, Kuliev AA, Mozzi F, Chobert JM, Haertl T. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends Food Sci Tech* 2011; 22:509-516.

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009; 155:1749-1757.

Franz CMAP, Van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:293–310.

Franz CMAP, Worobo RWW, Quadri LEN, Schillinger U, Holzapfel WH, Vederas JC, Stiles ME. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *App Environ Microbiol* 1999; 65:2170-2178.

Foulquié Moreno MR, Rea MC, Cogan TM, De Vuyst L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 2003; 81:73-84.

Furlaneto-Maia L, Rocha KR, Siqueira VLD, Furlaneto MC. Comparison between automated system and PCR-based method for identification and antimicrobial susceptibility profile of clinical *Enterococcus* spp. *Rev Inst Med Trop* 2014; 56:97-103.

Gálvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 2007; 120:51-70.

Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26:163-171.

Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 2003; 88:215-222.

Grande MAJ, Lucas R, Abriouel H, Ben Omar N, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Martínez-Cañamero M, Valdivia E, Gálvez A. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int J Food Microbiol* 2005; 104:289-297.

Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol Symp (Suppl. 83)* 1997; 1S-11S.

Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 1989; 52:384-387.

Ishibashi N, Himeno K, Fujita K, Masuda Y, Perez RH, Zendo T, Wilaipun P, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. Purification and characterization of multiple bacteriocins and an inducing peptide produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai fermented fish. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76:947-953.

Khan H, Flint S, Yu PL. Enterocins in food preservation. *Int J Food Microbiol* 2010; 141:1-10.

Klibi N, Jouini A, Rojo-Bezares B, Masmoudi A, Ruiz-Larrea F, Boudabous A, Torres C. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in clinical enterococcal isolates of Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:653-657.

Kjos M, Borrero B, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, Snipen L, Hernández PE, Nes IF, Diep DB. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 2011; 157:3256-3267.

Kjos M, Nes IF, Diep DB. Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiology* 2009; 155:2949-2961.

Lewus CB, Kaiser A, Monteville TJ. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *App Environ Microbiol* 1991; 57:1683-1688.

Marques EB, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol* 2004; 53:1069-1073.

Manolopoulou E, Sarantinopoulos P, Zoidou E, Aktypis A, Moschopoulou E, Kandarakis IG, Anifantakis EM. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol* 2003; 82:153-161.

Muguerza B, Ramos M, Sánchez E, Manso MA, Miguel M, Aleixandre A, Delgado MA, Recio I. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int Dairy J* 2006; 16:61-69.

Muñoz A, Ananou S, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Rodríguez A, Maqueda M, Valdivia E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *Int Dairy J* 2007; 17:760-769.

Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 70:113-28.

Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African J Biotechnol* 2003; 2:179-184.

Osmanağaoğlu, O. Detection and characterization of Leucocin OZ, a new anti-listerial bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. *Food Control* 2007; 18:118–123.

Özdemir GB, Oryasm E, Biyik HH, Özteber M, Bozdoğan B. Phenotypic and Genotypic Characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian J Microbiol* 2011; 51:182-187.

Pangallo D, Harichová J, Karellová E, Drahovská H, Chovanová K, Ferianc P, Turňa J, Timko J. Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental sources. *Biologia* 2004; 59:829-837.

Poeta P, Costa D, Rojo-Bezares B, Zarazaga M, Klibi N, Rodrigues J, Torres C. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiological Res* 2007; 162:257-263.

Rehaim A, Belgacem ZB, Edalatian MR, Martínez B, Rodríguez A, Manai M, Guerra NP. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. *Food Control* 2014; 37:343-350.

Rivas F, Castro M, Vallejo M. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes milk and cheese. *LWT - Food Sci Technol* 2012; 46:428-436.

Sabia C, De Niederhäusern S, Guerrieri E, Messi P, Anacarso I, Manicardi G, Bondi M. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J Appl Microbiol* 2008; 104:970-979.

Sánchez J, Basanta A, Gómez-Sala B, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), *Int J Food Microbiol* 2007; 117:295-305.

Shin MS, Han SK, Ji AR, Kim KS, Lee WK. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *J Appl Microbiol* 2008; 105:2203-2212.

Sonomoto K, Nishie M, Nagao JI. Antibacterial peptides “bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci* 2012; 17:1-6.

Sparo MD, Corso A, Gagetti P, Delpech P, Ceci M, Confalonieri A, Urbizu L, Sánchez-Bruni SF. *Enterococcus faecalis* CECT712: Biopreservation of crafted goat cheese. *Int J Probiotics Prebiotics* 2012; 7:145-152.

Strompfová V, Lauková A, Simonová M, Marciňáková M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet Microbiol* 2008; 132:293-301.

Todorov SD, Dicks LMT. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Res* 2006; 161:102-108.

Todorov SD, Dicks LMT. Optimization of Bacteriocin ST311LD Production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *J Microbiol* 2005; 43:370-374.

Turgis M, Dang Vu K, Lacroix M. Partial characterization of bacteriocins produced by two new *Enterococcus faecium* isolated from human intestine. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2013; 5:110-120.

Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* 2012; 2:6-12.

## PARTE 1

**Table 1**

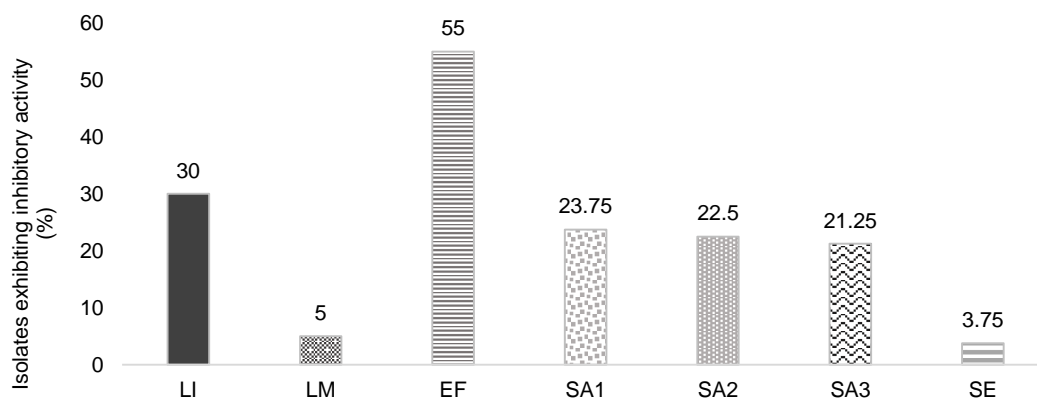
Specific primers for the PCR amplification of enterocin-encoding and *cylA* genes.

| Gene             | Sequence (5' – 3')   | Amplicon size (pb) | Annealing temperature (°C) | References              |
|------------------|--|--------------------|----------------------------|-------------------------|
| <i>entA</i>      | F: GGT ACC ACT CAT AGT GGA AA<br>R: CCC TGG AAT TGC TCC ACC TAA      | 138                | 55                         | (Özdemir et al., 2011)  |
| <i>entB</i>      | F: CAA AAT GTA AAA GAA TTA AGT ACG<br>R: AGA GTA TAC ATT TGC TAA CCC | 201                | 56                         | (De Vuyst et al., 2003) |
| <i>entP</i>      | F: GCT ACG CGT TCA TAT GGT AAT<br>R: TCC TGC AAT ATT CTC TTT AGC     | 87                 | 55                         | (Özdemir et al., 2011)  |
| <i>entL50A/B</i> | F: ATGGGAGCAATCGCAAAATTA<br>R: TAGCCATTTTTCAATTTGATC                 | 274                | 58                         | (Özdemir et al., 2011)  |
| <i>cylA</i>      | F: ACTCGGGGATTGATAGGC<br>R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT                       | 688                | 54                         | (Creti et al., 2004)    |

**Table 2**

Percentage of enterocin-encoding genes among Gene+ *Enterococcus* strains.

| Genes              | Number and percentage of <i>Enterococcus</i> isolates |                    |                         |             |               |
|--------------------|---|--------------------|-------------------------|-------------|---------------|
|                    | Species   |                    |                         | Source      |               |
|                    | <i>E. faecium</i>                                     | <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus</i> sp. | Cheese      | Clinical Col. |
| <i>entA</i> singly | 34 (42.5%)  | 2 (2.5%)           | -                       | 17 (21.25%) | 19 (23.75%)   |
| <i>entP</i> singly | 9 (11.25%)  | 1 (1.25%)          | -                       | 10 (12.5%)  | -             |
| <i>entA/B</i>      | 2 (2.5%)  | -                  | -                       | -           | 2 (2.5%)      |
| <i>entA/P</i>      | 22 (27.5%)  | 1 (1.25%)          | 1 (1.25%)               | 24 (30%)    | -             |
| <i>entA/B/P</i>    | 4 (5%)  | 3 (3.75%)          | 1 (1.25%)               | 8 (10%)     | -             |



**Fig. 1** – Percentage of *Enterococcus* isolates with inhibitory activity against different indicator strains. (LI) *Listeria innocua* CLIP 12612; (LM) *Listeria monocytogenes* CDC 4555; (EF) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, (SA1) *Staphylococcus aureus* ATCC 25925; (SA2) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; (SA3) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; (SE) *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; (ST) *Salmonella typhimurium* UK; (EC) *Escherichia coli* BAC 49LT ETEC.

## PARTE 2

**Characterization and production optimization of bacteriocins produced by *Enterococcus***

Mayara Baptistucci Ogaki<sup>1</sup>, Luciana Furlaneto-Maia<sup>3</sup>, Marcia Cristina Furlaneto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Londrina State University, Brazil

<sup>2</sup> Department of Education, Federal Technological University of Paraná, Brazil

**Abstract**

The enterococci strains Efm20, Ent22, Efm24, Efm25, Efm26 and Efs27 isolated from fresh cheeses have ability to inhibit *Listeria innocua* CLIP 12612. Enterococci strains were characterized by production of hydrogen peroxide and dioxide carbon. None of isolates produced dioxide carbon, and only one isolate (Efm26) was capable to produce hydrogen peroxide. Bacteriocins produced by enterococci strains (enterocins) were present on CFS, and were inactivated after treatment with proteolytic enzymes such as proteinase-K, protease, trypsin and  $\alpha$ -chymiotrypsin, but remained active when treated with catalase. When CFS were heated, the antimicrobial activity remained stable after heating at 80°C for 10 min, but at 100°C for 20 min showed a significant decrease. The highest level of enterocin activity was observed by isolates 20, 22, 24, 26, and 27 (800 AU.ml<sup>-1</sup>) followed by isolate 25 (400 AU.ml<sup>-1</sup>). Thus, according to culture media test, the best producers were Efm20 and Efm26 isolates. Besides, there was no significant difference in enterocin production between MRS with 2% (w/v) of lactose and MRS unsupplemented, suggesting that both can be use as favorable media for enterocin production in liquid cultures.

**Abbreviations:** Cell free supernatant – CFS; Man Rogosa and Sharpe medium - MRS

**Keywords:** Enterocin / *Enterococcus* sp. / characterization / biopreservatives

## Introduction

*Enterococcus* are acid lactic bacteria (LAB) that have been extensively used as additive in food fermentation, due to ability to produce substances that attribute flavor and taste to products. They acidify the food and their proteolytic and lipolytic activities producing aroma and specific flavor by the conversion of amino acids that form different compounds, such as alcohols, aldehydes, acids, esters and sulphur compounds (Van Kranenburg et al., 2002; Sarantinopoulous et al., 2001)<sup>1,2</sup>.

Enterococci also are used in biopreservation, improving the shelf-life of fermented foods, due to their ability to produce antagonistic substances (El-Ghaish et al., 2011; Khan et al., 2010; Lindgren and Dobrogosz, 1990)<sup>3,4,5</sup>. These compounds provides barriers for pathogens which need overcome them to survive and proliferate in a food (De Vuyst and Vandamme, 1994)<sup>6</sup>.

The antimicrobial compounds produced by *Enterococcus* include organic acids (lactic, acetic and propionic acids), hydrogen peroxide, carbon dioxide from heterolactic fermentation, diacetyl from citrate metabolism and bacteriocins (Ross et al., 2002)<sup>7</sup>.

Bacteriocins produced by *Enterococcus*, so called enterocins, are small and heat-stable peptides synthesized on ribosomes with antimicrobial activity against other bacteria, most commonly Gram-positive species, mainly *Listeria monocytogenes* (Cooter et al., 2005)<sup>8</sup>.

The proteinaceous nature of bacteriocins promote their inactivation by proteolytic enzymes of gastrointestinal tract (Ananou et al., 2007)<sup>9</sup>. Other characteristics such as inactivation against eukaryotic cells, bactericidal activity against foodborne pathogens, thermo-resistance, and their non-toxicity in tests involving laboratory animals; make them more attractive to biopreservation in food industries (Ananou et al., 2007; De Vuyst and Vandamme, 1994)<sup>9,6</sup>.

Modern process of food commonly introduce chemical additives to ensure a better consistency and product preservation until the consumption. However, increasingly, there is a greater concern consumer with the safety of chemical additives, which promotes an increased demand for food without chemicals or wit, natural preservatives, consequently, new searches using these enterocins such as natural alternatives for biopreservation, are interesting Ross et al., 2002; Ananou et al., 2007; Deegan et al. 2006)<sup>7, 9, 10</sup>.

The food preservation can occur through the introduction of enterococci as starter culture or co-culture, as well as through the direct addition of crude enterocin preparations, or even purified or semi-purified enterocins like “natural” additives (Khan et al., 2010; Cooter et al., 2005)<sup>4, 8</sup>. The use of enterocins as biopreservatives in dairy (Muñoz et al., 2007)<sup>11</sup>, meat (Aymerich et al., 2000)<sup>12</sup>, fish (Sarika et al., 2011)<sup>13</sup>, and vegetable products (Grande et al., 2007)<sup>14</sup> have been reported in several studies.

Considering the role and the range application of these enterocins, the present study aimed to characterize enterococci isolated from fresh cheese about the production of hydrogen peroxide and carbon dioxide to exclude the possibility that these compounds could be acting instead of enterocins and characterize these enterocins (released in the crude extract) about their resistance to thermal and enzymatic treatment.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial strains and growth conditions**

The enterococci strains from different species and isolated from fresh cheeses: *E. faecium* (Efm20, Efm24, Efm25, Efm26), *E. faecalis* (Efs27) and *Enterococcus* sp. (Ent22), belongs to the Genome Lab in Londrina State University (UEL). Enterococci strains were previously genotyped for presence of enterocin-encoding genes, and harbour the genes *entA*, *entB* and *entP* (unpublished data). Stock cultures were stored at -20°C in BHI broth (Brain Heart Infusion) supplemented with 20% (v/v) of glycerol. Fresh cultures were prepared with inoculation of 20 µl of frozen stock in 5 ml of MRS broth (Man, Rogosa, Sharpe) incubated for 18 h at 37°C. *Listeria innocua* CLIP 12612 was used as indicator strain for antimicrobial activity assays.

### **Production of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>)**

Production of gas from glucose was determined in modified MRS broth containing inverted tubes with ammonium citrate replaced by ammonium sulphate and incubated for 5 days at 30°C (Schillinger and Liicke, 1987)<sup>15</sup>. Just big bubbles formed in the incubation were read as positive.

### **Production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was evaluated in MRS agar supplemented with 0.75% of manganese dioxide and 0.5% xanthan gum. The plates were incubated at 25°C for 7 days and observed daily. Formation of clear zones around the colonies was due to the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Samelis et al., 1994)<sup>16</sup>.

### **Antimicrobial activity assay**

The antimicrobial assay was evaluated according to Nilsen et al. (1998)<sup>17</sup> with modifications. The isolate was grown by inoculation of freeze culture in MRS broth pH 6.2 (acidified with HCl 0.1M) for 18h at 37°C. Posteriorly, the pH of the culture was adjusted to 6.5 with NaOH 1M and the cell-free supernatant (CFS) was obtained by centrifugation at 10000 rpm followed by membrane filtration 0.22 µm. The CFS containing antimicrobial compounds, including enterocins, was treated with catalase (1mg.ml<sup>-1</sup>). Antimicrobial activity was assessed in microtiter plates. Each well containing 100ul of CFS and 100ul of indicator strain *Listeria innocua* CLIP 12612 (10<sup>8</sup> cells.ml<sup>-1</sup> in MRS broth pH 6.5). A negative control containing only the indicator strain was used for comparative purposes. The plates were incubated at 37°C for 24h and microbial growth were measured by optical density (D.O.) in spectrophotometer at 600nm. D.O. values were evaluated using analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's test, considering p<0.05, to estipulate significant differences between antimicrobial activity of isolates and negative control.

### **Quantitative serial dilution test**

This assay was evaluated according Geis and Teuber (1983)<sup>18</sup> and Mayr-Harting et. al. (1972)<sup>19</sup> with modifications. The CFS is serially diluted 1:2 (v/v) in microtiter plates, using MRS broth. Then, aliquots of 100µl of each dilution were deposited on new microtiter plate with 100µl of indicator culture (about 10<sup>8</sup> cells.ml<sup>-1</sup>), and incubated at 37°C. The bacterial growth was determined by spectrophotometrical measurement (600nm). The unit of enterocin activity (AU.ml<sup>-1</sup>) was arbitrarily defined as the reciprocal of the last dilution showing growth inhibition compared with a negative control without CFS multiplied by 100.

### **Thermal stability of antimicrobial compound**

The thermal stability of the antimicrobial compound is evaluated by treating the obtained supernatants at 80°C for 10 min and at 100°C for 20 min (Ammor et al, 2006; Hugas et al, 1995)<sup>20, 21</sup>. The measurement followed by antimicrobial activity assay and the growth inhibition was compared with the negative and positive controls.

### **Effect of enzymatic treatment on antimicrobial activity**

To assess the sensitivity of the antimicrobial compound against proteolytic enzymes, supernatants obtained (CFS) were treated with enzymes  $\alpha$ -chymotrypsin, protease, trypsin and proteinase K at final concentration of 1mg.ml<sup>-1</sup> (Garriga et al., 1993)<sup>22</sup>. Aliquots of 100 $\mu$ l of each treated CFS were deposited on a microtiter plate with 100 $\mu$ l of indicator strain, the measurement followed by antimicrobial activity assay. The residual activity was determined by spectrophotometrical measurement (600nm) of indicator growth inhibition compared with a negative control without CFS and a positive control containing untreated CFS.

### **Culture media assay**

The culture media assay was performed using MRS broth and supplementations (w/v) with 2% peptone, 2% glucose and 2% lactose. The antimicrobial activity assay was used to measure the efficiency of the antimicrobial compounds presents on CFS (crude extract without treatment) on the inhibition of the indicator strain in different media. Statistical analysis was performed with the optical density values at 6h of growth. To determine the effect of different media on enterocin production by the six isolates. The D.O. values were evaluated using analysis of variance (two-way ANOVA) and Tukey's test, considering  $p < 0.05$ . The purpose of this evaluation was fix the best media and the best enterocin producers by statistical analysis.

## Results

### Production of hydrogen peroxide and carbon dioxide

Only the isolate Efm26 showed clear zone around the colony, therefore the remaining tested strains did not produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, so the antagonistic activity in untreated supernatants with catalase, may be due to synergism between hydrogen peroxide and enterocin activity. Regarding the evaluation of carbon dioxide production, none of isolates produced gas from glucose at the assessed period.

### Antimicrobial activity assay and quantitative serial dilution test

The CFS from strains tested showed antimicrobial activity since the D.O. values were significantly lower (one way ANOVA,  $p < 0.0001$ ) when compared to negative control. No significant differences in antimicrobial activities against *L. innocua* were observed among Enterococci isolates tested (Figure 1). Efm20, Ent22, Efm24, Efm26 and Efs27 yielded 800 AU.ml<sup>-1</sup> and Efm25 yielded a low activity 400 AU.ml<sup>-1</sup>.

### Thermal stability of antimicrobial compound

The antimicrobial activity of CFS (containing enterocins) remained unaffected after heating at 80°C for 10 min, and was partially reduced when heated at 100°C for 20 min (Figure 2). The treating of CFS at 100°C had significant difference compared with the negative control, indicating that there was a partial and not complete loss of activity, so the enterocins present in CFS can be considered heat stable at these temperatures.

### Effect of enzymatic treatment on antimicrobial activity

After enzymatic treatment, microbial growth of *L. innocua* was higher than positive control (*L. innocua* treated with CFS without enzymes). There was a reduction or degradation of the antimicrobial compounds present on CFS after the enzymatic treatment with trypsin, protease, alpha-chymotrypsin and proteinase-K. Therefore, the antimicrobial compounds present in CFS seems to have protein nature. The CFS treated with catalase exhibited lower growth compared to the negative control. Therefore, if the hydrogen peroxide was

produced by any isolate, it was not interfered on antimicrobial activity. The effect of enzymatic treatment on *L. innocua* growth is represented on Table 1.

### **Culture media assay**

Concerning the influence of culture media in the enterococci antimicrobial activity against *L. innocua*, the different media differed significantly (two-way ANOVA analysis) from each other ( $p = 0.0067$ ), regarding their influence on enterocin production. The antimicrobial activity in unsupplemented MRS (used as control) not differed significantly from that presented in MRS with lactose, but differed significantly of antimicrobial activities in MRS glucose and MRS peptone ( $p < 0.05$ ). Glucose and peptone supplementations influenced negatively the antimicrobial activity (Figure 3). Besides, the lactose supplementation influenced positively, similarly to MRS media (control), these media were the best influencers for enterocins producers, thereby; both are potential options for enterocin production in liquid cultures.

With reference to the efficiency of the isolates to produce enterocins, the isolates significantly differed from each other ( $p < 0.0001$ ). Statistically the isolate Efm20 was the best producer, followed by isolates Efm26, Ent22, Efs27, Efm24 and Efm25 (Figure 3). Efm24 and Efm25 did not differed significantly from each other, but they differed from the remaining isolates (Efm24 considering  $p < 0.05$ , and Efm25 considering  $p < 0.01$ ). Furthermore, isolates (20, 26, 22 and 27) showed no significant difference each other, so they are potential options for enterocin production.

### **Discussion**

The consumer search for healthy food has increased the demand for natural preservatives instead of chemical additives. Preservatives should follow some criteria to be considered naturals, such as low toxicity, stability to processing and storage, efficacy at low concentration, no deleterious effect on the food and economic viability. Although most of bacteriocins follow these criteria and only nisin is commercialized (Jeevaratnam et al 2005)<sup>23</sup>.

Several studies have been conducted to introduce new bacteriocins as biopreservatives (Chen et al., 2006; De Kwaadsteniet et al., 2005; Du Toit et al.,

2000; Park et al., 2003)<sup>24, 25, 26, 27</sup>. However, to be considered a food additive, a new bacteriocin needs regulatory authorities approval, which demands information about the toxicological data and the confirmation of bacteriocin efficacy. The manufacturing process, involving tests of quantification and standardization, also needs to be described (Khan et al., 2010; Cleveland et al., 2001)<sup>4, 28</sup>. Therefore, studies involving the identification and characterization of new bacteriocins are needed, in order to introduce alternatives to chemical additives in the food industry.

This study aimed to characterize some enterococci isolates with presence of enterocin genes about their antimicrobial activity. Considering that some LAB strains like enterococci are added to food in order to produce antimicrobial compounds, which promote the product conservation extending its shelf life (this compounds include hydrogen peroxide, carbon dioxide, bacteriocins, acid lactic, and others organic acids) (Daeschel, 1989)<sup>29</sup>, this study aimed to evaluate the production of hydrogen peroxide and carbon dioxide to exclude the possible inhibition of this compounds instead of enterocins.

Carbon dioxide on food preservation create an anaerobic environmental in the food products, this gas replaces the molecular oxygen, promotes intracellular acidification, inhibits enzymatic decarboxylation and disrupts the cell membrane with the gaseous phase accumulation in the lipid bilayer [Amanatidou et al., 2001; Lindgren and Dobrogosz, 1990; Eklund, 1984)<sup>30,5, 31</sup>. The present results do not detected the production of carbon dioxide by any isolated tested, therefore, the antimicrobial activity should be due to other antimicrobial compound, such as enterocins.

Jeenes et al. (2000)<sup>32</sup> have also reported the absence of gas production in enterococci strains. They evaluated the carbon dioxide production from the fermentation of glucose and gluconate in *E. gallinarum*, and three strains do not produce carbon dioxide, but produced lactic acid. In the present study, the possible antimicrobial activity from acid lactic was discarded, because all CFS was neutralized with sodium hydroxide, to avoid the media acidification.

As regard the hydrogen peroxide production, only one of the enterococci isolates produced this compound, forming clear zones on plates with manganese dioxide and xanthan gum. Therefore, the employment of Efm26 can result in a synergistic action of the enterocins and the hydrogen peroxide on biopreservation

of food. This synergism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bacteriocins seems to be closely related to their action on plasma membrane. It is known, that antimicrobial effect of hydrogen peroxide is due to damages on membranes, resulting in alterations on cell permeability (Kong and Davinson, 1981)<sup>33</sup>. Bacteriocins Class II, like some enterocins, also target cells on membrane, forming pore or interfering on membrane integrity when bind on specifically receptors (Kjos et al., 2011)<sup>34</sup>. This synergistic effect among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bacteriocins, as well as organic acids, was also reported by Pasteris et al. (2014)<sup>35</sup> that evaluated the antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1584 against *Listeria monocytogenes*.

*Listeria* sp. can causes several diseases in humans and animals. Several contaminated food has been associated with the transmission, such as dairy food (cheese, raw milk, ice cream and yoghurt), meat (cooked chicken, sausages and minced pork), seafood (fish, shellfish, shrimp, crabmeat, lobster tail) and vegetables (Farber and Peterkin, 1991)<sup>36</sup>. These Gram-positive bacteria are ubiquitous in the environment, and can survive in food, overcoming the preservatives and safety barrier, in addition, these bacteria can grow in varying conditions such as high salt concentration, low temperatures and low pH (Ghandi and Chikindas, 2007; Ramaswamy et al. 2007)<sup>37, 38</sup>. The ingestion of contaminated food has becoming a risk to health, therefore, searches involving new food preservatives are interesting. The present study revealed an evident antimicrobial activity, because all enterococci isolates inhibited *L. innocua*. Enterococci isolates can own enterocins Class II (enterocin A, B or P) recognized due to their antilisterial activity (Abee et al., 1995; Eijsink et al., 2002)<sup>39, 40</sup>.

According Nes et al. (2007)<sup>41</sup> bacteriocins from enterococci belong almost exclusively to the Class II, called as heat-stable nonlantibiotics. This thermostability characteristic allows their industrial applicability to several processes that require heating. The present study observed that the enterocins (presented on CFS) submitted to heat treatment did not lose completely their activity against *L. innocua* after heating at 80°C and 100°C, therefore they can be considered heat stable. Several studies demonstrated the thermostability of difference bacteriocins (Ammor et al, 2006; Foulquié Moreno et al., 2003; Park et al., 2003; Du Toit et al., 2000)<sup>20, 42, 27, 26</sup>.

Following enzymatic treatment of CFS, the antimicrobial compounds present on CFS seems to be degraded by proteolytic enzymes, because the compounds lost their activity (Table 2) and the growth of *L. innocua* was equivalent to negative control (without CFS and enzymes). In conclusion the antimicrobial activity of CFS seems to be due to the proteinaceous compounds, mostly probably the enterocins. Yang et al. (2012)<sup>43</sup> observed similar results with 28 LAB isolates, including *E. faecium*, against *Listeria innocua*. They tested the CFS treated with proteinase-K,  $\alpha$ -chymotrypsin, protease and trypsin, and all isolates lost their antilisterial activity following enzymatic treatment. Park et al. (2003)<sup>27</sup> also evaluated the enzymatic treatment of CFS containing bacteriocins produced by *E. faecium* JCM 5804T, and they noticed that was completely elimination of inhibitory activity after CFS treatment with proteinase K, trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin.

This study concluded that MRS with 2% lactose was the best culture medium to produce enterocins, on the other hand MRS supplemented with glucose and peptone resulted in lower antimicrobial activity. Foulquière Moreno et al. (2003)<sup>42</sup> also reported the positive influence of lactose in MRS media. Our data revealed that the increase of glucose concentration did not influence positively. Parente et al. (1997)<sup>44</sup> reported the increase of enterocin 1146 production by *Enterococcus faecium* DPC1146 when glucose was used in low concentration (20 g.l<sup>-1</sup>), but higher concentrations did not promote the improvement in activity. Torodov and Dicks (2006)<sup>45</sup> tested the bacteriocin ST341LD produced by *Lactobacillus plantarum*. They conclude that levels below 20 g.l<sup>-1</sup> was positive to production, but above 30 g.L<sup>-1</sup> promoted repression. Other researchers have also reported the negative influence of the increasing in glucose concentration for other microorganisms (Ogunbanwo et al., 2003; Aasen et al., 2000)<sup>47,46</sup>.

In conclusion, enterococci isolates evaluated in this study did not produce carbon dioxide from glucose fermentation and only one isolate (Efm26) was capable to produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The antimicrobial activity of CFS was insensitivity to the treat with catalase and sensitive to the proteolytic treatment, being indicative that antimicrobial activity is not related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or acid lactic action, but it is related to proteinaceous agents, the enterocins.

## Concluding remarks

After all evaluations performed in this study, it was concluded that all isolates are great enterocin producers, and these enterocins have potential application as biopreservatives and other biotechnological purposes.

## References

- [1] Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., Siezen, R.J., 2002. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.*, 12, 111-121.
- [2] Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.*, 11, 621-647.
- [3] El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y.G., Kuliev, A.A., Mozzi, F., Chobert, J.M., Haertl, T., 2011. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 22, 509-516.
- [4] Khan, H., Flint, S., Yu, P.L., 2010. Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 141, 1-10.
- [5] Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 149-164.
- [6] De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. London, UK: Blackie Academic & Professional, pp. 91-142.
- [7] Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.*, 79, 3 -16.
- [8] Cotter, P.D., HILL, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3, p.777-788.
- [9] Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., 2007. Biopreservation, ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods, *Appl. Microbiol.*, 1, 475-486.
- [10] Deegan, L.H., Cotter, P.D., HILL, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16, p.1058-1071.
- [11] Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in

dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *Int. Dairy J.*, 17, 760-769.

- [12] Aymerich, T., Garriga, M., Ylla J., Vallier, J., Monfort, J.M., Hugas, M., 2000. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.*, 63, 721-6.
- [13] Sarika, A.R., Lipton, A.P., Aishwarya M.S., Dhivya, R.S., 2011. Efficacy of Bacteriocin of *Enterococcus faecalis* CD1 as a biopreservative for high value marine fish reef cod (*Epinephelus diacanthus*) under different storage conditions. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 1, 18-24.
- [14] Grande, M.J., López, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2007. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.*, 70, 405-411.
- [15] Schillinger, U., Lucke, F., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1901–1906.
- [16] Samelis, J., Maurogenakis, F., Metaxopoulos, J., 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 179-196.
- [17] Nilsen, T., Nes, I. F., Holo, H., 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.*, 180, 1848–1854.
- [18] Geis, A., Jasjit, J., Teuber. M., 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 205-211.
- [19] Mayr-harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C.W., 1972. Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Eds.) *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press, vol.7a. pp. 313-342.
- [20] Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E.; Chevallier, I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17, 454–461.
- [21] Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., Monfort, J.M., 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 322–330.
- [22] Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T.; Monfort, J.M., 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 142-148.
- [23] Jeevaratnam, K., Jamuna M., Bawa, A.S., 2005. Biological preservation of foods-Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J. Biotechnol.*, 4, 446-454.
- [24] Chen, Y.S., Yanagida, F., Sriannual, S., 2007. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44, 320-325.

- [25] De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H., Dicks, L. M. T., 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, p.433-444.
- [26] Du Toit, M.D., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Holzapfel, W.H., 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 482-494.
- [27] Park, S.H., Itoh, K., Fujisawa, T., 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 294-300.
- [28] Cleveland, J., Montville, T., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1–20.
- [29] Daeschel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 43, p.164-167.
- [30] Amanatidou, A., Smid E. J., Gorris, L.G.M., 1999. Effect of elevated oxygen and carbon dioxide on the surface growth of vegetable-associated microorganisms. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 429-438.
- [31] Eklund, T., 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.*, 1, 179–185.
- [32] Jennes, W., Dicks, L.M.T., Verwoerd, D.J., 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 349–357.
- [33] Kong, S., Davison, A. J., 1981. The relative effectiveness of OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and reducing free radicals in causing damage to biomembranes. A study of radiation damage to erythrocyte ghosts using selective free radical scavengers. *Biochim. Biophys. Acta*, 640, 313-325.
- [34] Kjos, M., Borrero, B., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B., 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 157, 3256-3267.
- [35] Pasteris, S.E., Pingitore, E.V., Ale, C.E., Nader-Macias, M.E.F., 2014. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 1053-1062.
- [36] Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Rev.*, 55, 476-511.
- [37] Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1–15.
- [38] Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., Vijila, H.M., 2007. *Listeria* — review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infec.*, 40, 4-13.

- [39] Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International J. Food Microbiol.*, 28, 169-185.
- [40] Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F., 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 639-654.
- [41] Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H., 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189, 1189-98.
- [42] Foulquié Moreno, M.R., Rea, M.C., Cogan, T.M.; De Vuyst, L., 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International J. Food Microbiol.*, 81, 73-84.
- [43] Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2, 1-12.
- [44] Parente, E., Brienza, C., Ricciardi, A., Addario, G., 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 62-67.
- [45] Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2006. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Res.*, 161, 102-108.
- [46] Aasen, I.M., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, L., Storro, I., 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 159-166.
- [47] Ogunbanwo, S.T., Sanni, A. I., Onilude, A.A., 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African J. Biotechnol.*, 2, 179-184.

## Acknowledgments

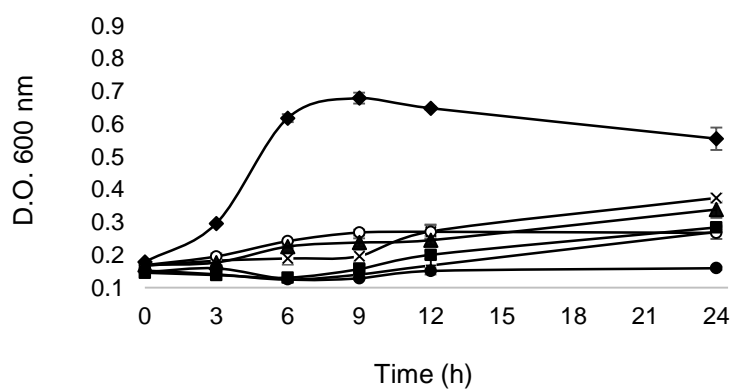
The authors thank to National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Araucaria Foundation (Parana – Brazil) and CAPES (scholarship of Master's Degree student) for their financial support.

## PARTE 2

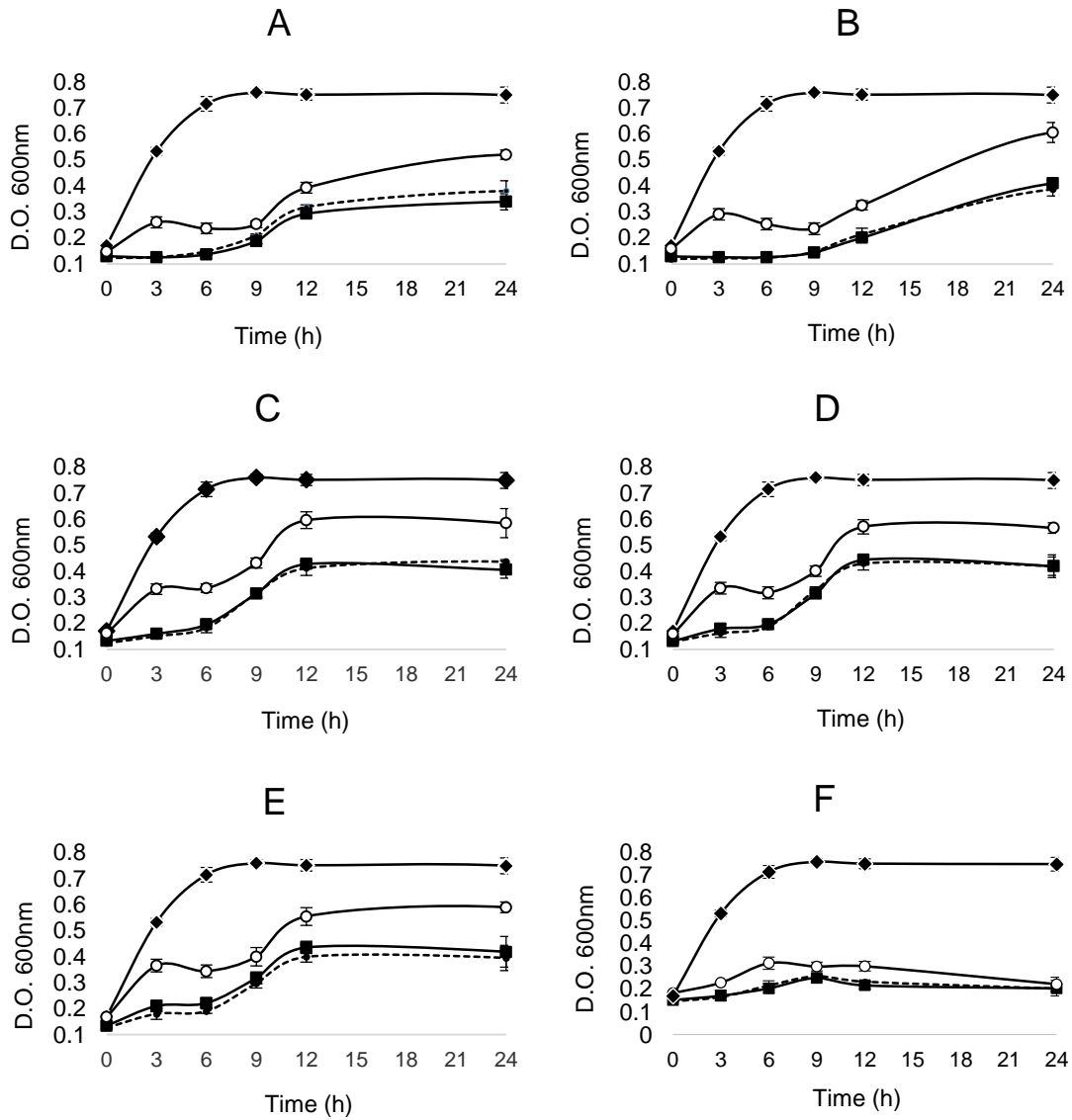
**Table 1.** Growth inhibition of *L. innocua* after enzymatic treatment of CFS.

| Treatment               | Enterococci strains |       |       |       |       |       |
|-------------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                         | Efm20               | Ent22 | Efm24 | Efm25 | Efm26 | Efs27 |
| Negative control        | -                   | -     | -     | -     | -     | -     |
| Positive control        | +                   | +     | +     | +     | +     | +     |
| Proteinase K            | -                   | -     | -     | -     | -     | -     |
| Trypsin                 | -                   | -     | -     | -     | -     | -     |
| $\alpha$ -chymiotrypsin | -                   | -     | -     | -     | -     | -     |
| Catalase                | +                   | +     | +     | +     | +     | +     |
| Protease                | -                   | -     | -     | -     | -     | -     |

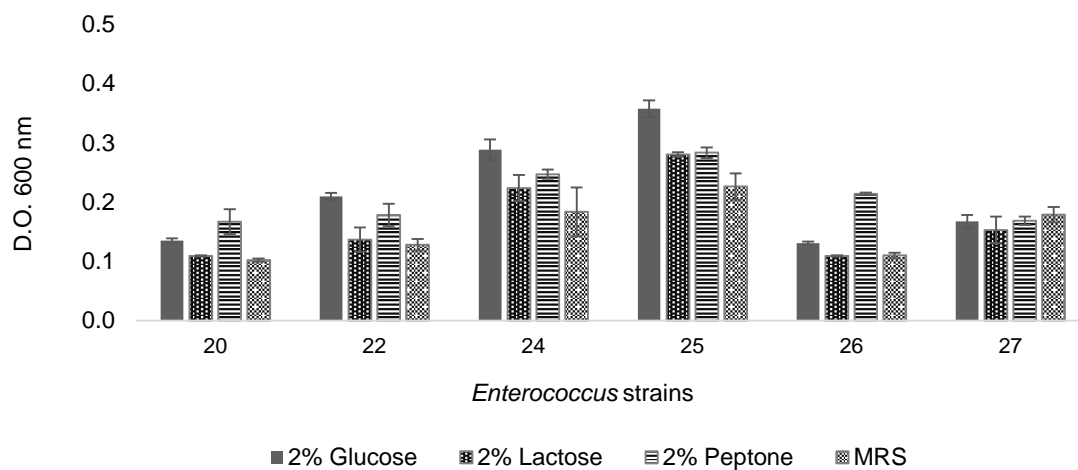
(+) Growth inhibition; (-) Without inhibition.



**Figure 1** – Anti-listerial activity of CFS. (◆) Negative control. (+) Efm20. (x) Ent22. (o) Efm24. (▲) Efm25. (■) Efm26. (●) Efs27.



**Figure 2** – Anti-listerial activity of CFS in different thermal treatments. (A) Efm20. (B) Ent22. (C) Efm24. (D) Efm 25. (E) Efm 26. (F) Efs 27. Symbols: (---) Positive control, (♦) Negative control, (■) Treat at 80°C for 10 minutes, (○) Treat at 100°C for 20 minutes.



**Figure 3** – Results for culture media assay. (A) Differences among *L. innocua* inhibition by enterococci isolates on different media evaluated. (B) Differences of media influence on antimicrobial activity of enterococci strains against *L. innocua*.

## CONCLUSÕES

Realizados a genotipagem para genes que codificam algumas enterocinas e o screening para atividade antimicrobiana, constatou-se que entre 135 isolados de enterococos, 66 apresentaram pelo menos um gene de enterocina e concomitantemente atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos micro-organismos indicadores.

O teste de atividade bacteriófágica e a identificação do gene *cylA* vieram a confirmar que a atividade antimicrobiana apresentada pelos isolados não era em função de atividade fágica ou de citolisinases, mas muito provavelmente por atividade enterocinogênica.

A produção de enterocinas em diferentes meios de cultivos semi-solidificados foi avaliada, concluindo-se que seis isolados (Efm20, Ent22, Efm24, Efm25, Efm26 e Efs27) possuíam potencial como produtores. À vista disso, esses isolados foram submetidos a uma parcial caracterização.

Após as caracterizações do sobrenadante livre de células contendo as enterocinas (CFS), conclui-se que o agente responsável pela atividade antimicrobiana detém uma natureza proteica, pois foi degradado por enzimas proteolíticas e resistente ao tratamento térmico a 80°C e 100°C.

Ao tratar o CFS com catalase e neutralizá-lo com NaOH, exclui-se a possibilidade de compostos antagonistas como o peróxido de hidrogênio e outros ácidos orgânicos, como o lactato, interferissem na atividade antimicrobiana. Não obstante, outros testes excludentes para compostos antagonistas (p.ex. peróxido de hidrogênio e gás carbônico) foram realizados. Sendo que nenhum dos isolados produziu gás carbônico e apenas o Efm26 produziu peróxido de hidrogênio, logo confirmou-se que a atividade antimicrobiana presente no CFS era por ação enterocinogênica.

Por fim, conclui-se neste estudo que os seis isolados avaliados podem ser considerados bons produtores de enterocinas. Por conseguinte, devido ao seu espectro antimicrobiano, esses peptídeos possuem potenciais aplicações como bioconservadores e como protetores contra patógenos em futuras pesquisas.