

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO MEIO AMBIENTE**

**ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *Enterococcus mundtii* 115**

Kelly Flores Priotto
Biomédica - Feevale

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Junho, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

À professora Gertrudes Corção pela confiança, oportunidade e orientação.

Ao professor Júlio Heck pela orientação, pelos conselhos valiosos, pela força e atenção sempre que foi necessário.

À professora Patrícia Valente por ter me apresentado o Dep. de Microbiologia, pela grande força no início do mestrado e, principalmente, por ter acreditado em mim.

Aos professores do Departamento de Microbiologia.

Aos professores João Henrique Kanan, Sueli Van der Sand, Paulo Ivo Bittencourt Jr, Marisa da Costa, Marco Antonio Ayub e Plinho Hertz por terem cedido espaço, material e equipamentos de seus laboratórios que tornaram possível a realização de parte deste mestrado.

Aos colegas de laboratório do Departamento de Microbiologia, em especial aos do laboratório 166 Daiane Fuentefria, Alessandra Ferreira, Natália Canal, Giuliano Hickenbick, Waldir Henkes, Aline Spindler, Letícia Otton, Lyvia Moreira, Gabriela da Cunha, Carolina Gusatti, Tiago Graf, Josué Tornquist e Gustavo Erpen, e aos colegas dos laboratórios vizinhos Sabrina Salamoni, Margaroni Fialho e Albino Neto.

Aos colegas de curso, em especial a Cátia Passos que se tornou uma grande amiga ao longo do Mestrado.

Às minhas queridas amigas, principalmente à Aline Fagundes e Cassandra Brunetto que me apoiaram, comemoraram e foram boas ouvintes nos momentos estressantes durante todo o mestrado e nestes últimos 12 anos.

Aos meus amados pais pelo grande apoio, força e confiança, pelos conselhos, por tentarem entender e ajudar quando meus experimentos davam errado e por comemorarem quando davam certo. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Luccas (Lukita) e Ricardo pelo carinho e compreensão. Também amo vocês!

Ao meu grande amor Endrigo Mildner, que fez toda a diferença ao longo deste mestrado e, principalmente, na minha vida. Pelo carinho, amor, apoio, ajuda, compreensão e muita paciência nos momentos difíceis... e ainda faltam palavras para demonstrar tudo o que sinto.

ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *Enterococcus mundtii* 115

Autor: Kelly Flores Priotto
Orientador: Gertrudes Corção
Co-orientador: Júlio Xandro Heck

RESUMO

Os enterococos são capazes de produzir muitos metabólitos com atividade antimicrobiana, como as bacteriocinas, que são peptídeos que podem inibir ou eliminar o crescimento de uma variedade de bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos. Para uma melhor caracterização das bacteriocinas é muito importante a purificação desses peptídeos. Os processos de purificação são complexos e de baixo rendimento, por isso é de extrema importância desenvolver estratégias que tornem possível a realização destes. Em um trabalho anterior, a cepa *E. mundtii* 115, isolada de amostras de fezes de humanos, foi caracterizada como produtora de bacteriocinas. No atual trabalho, foram produzidos dois sobrenadantes livres de células, em datas diferentes, a partir do cultivo da cepa. As bacteriocinas dos sobrenadantes foram concentradas com clorofórmio e estes concentrados foram cromatografados em resinas sephadex G-15, SP-sepharose e DEAE-sepharose, separadamente, com o intuito de verificar o desempenho de cada uma. As bacteriocinas dos concentrados e eluídas das resinas foram termoestáveis, perdendo grande parte da atividade apenas quando aquecidas a 121° C. Todas mantiveram melhor a atividade quando incubadas em valores de pHs ácidos. Através do gel SDS-PAGE verificou-se que as bacteriocinas possuem, aproximadamente, 3 kD e verificou-se que as frações eluídas das resinas SP-sepharose e sephadex G-15 apresentaram maior e menor grau de purificação, respectivamente. As bacteriocinas foram inativadas por proteases e resistentes a lisozima. Não foi possível a purificação total das bacteriocinas, mas os resultados permitiram comparar as diferenças de desempenho entre as resinas.¹

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (84 p.), Junho, 2009.

PURIFICATION STRATEGIES AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCINS PRODUCED BY *Enterococcus mundtii* 115

Author: Kelly Flores Priotto
Advisor: Gertrudes Corção
Co-advisor: Júlio Xandro Heck

ABSTRACT

The enterococci are capable to produce many metabolites with antimicrobial activity, such as bacteriocins, which are peptides that can inhibit or eliminate the growth of a variety food-borne pathogens. For a better characterization of bacteriocins is very important to purify these peptides. Purification procedures are complexes and low-yield, so it is extremely important to develop strategies that make possible the achievement of these. In a previous work, the strain *E. mundtii* 115, isolated from the humans faecal samples, was characterized as bacteriocins producer. In the current study, two cell-free supernatants were produced on different dates, from a culture of the strain. The bacteriocins from supernatants were concentrated with chloroform and these were applied to resins Sephadex G-15, SP-Sepharose and DEAE-Sepharose, separately, in order to verify the performance of each one. The bacteriocins of concentrates and fractions eluted from resins were heat stable, but keep only part of the activity when heated to 121° C. All fractions had the best activity in acidic pH. By SDS-PAGE it was found that bacteriocins have approximately 3 kD and the fractions eluted from SP-Sepharose and Sephadex G-15 showed higher and lower degree of purification, respectively. The bacteriocins were inactivated by proteases and resistant to lysozyme. It was unable to purificate the bacteriocins completely, but was possible to compare the differences between the resins.²

² Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (84 p.), June, 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Bactérias produtoras de ácido láctico (BAL).....	3
2.1.1 Gênero <i>Enterococcus</i> sp.	4
2.2 Bacteriocinas produzidas por BAL.....	6
2.2.1 Enterocinas.....	12
2.3 Purificação de proteínas.....	16
2.3.1 Purificação de enterocinas.....	18
2.3.2 Cromatografia por gel filtração.....	19
2.3.3 Cromatografia por troca iônica.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Microrganismo produtor.....	22
3.2 Obtenção do sobrenadante livre de células	22
3.2.1 Preparação do pré-inóculo.....	22
3.2.2 Obtenção do sobrenadante.....	22
3.3 Concentração das bacteriocinas.....	23
3.4 Purificação parcial das bacteriocinas.....	24

3.4.1 Escolha da resina de troca iônica.....	24
3.4.2 Estratégias de purificação das bacteriocinas.....	25
3.4.2.1 Cromatografia líquida em resina de gel filtração.....	25
3.4.2.2 Cromatografia líquida em batelada em resina de troca catiônica.....	26
3.4.2.3 Cromatografia líquida em batelada em resina de troca aniônica.....	26
3.5 Quantificação da concentração de proteínas.....	29
3.6 Análise quantitativa da atividade antimicrobiana.....	29
3.7 Caracterização das bacteriocinas.....	30
3.7.1 Estabilidade ao tratamento térmico da fração purificada.....	30
3.7.2 Estabilidade à variação do pH.....	31
3.7.3 Susceptibilidade a enzimas proteolíticas.....	31
3.7.4 Manutenção do espectro antimicrobiano.....	32
3.8 Concentração das frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração.....	32
3.9 Determinação do peso molecular e grau de purificação	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Concentração das bacteriocinas.....	34
4.2 Estratégias de purificação das bacteriocina.....	35
4.2.1 Escolha da resina.....	35
4.2.2 Cromatografia líquida em resina de gel filtração.....	35
4.2.3 Cromatografia líquida em batelada em resina de troca catiônica e resina de troca aniônica.....	37

4.2.4 Etapas de purificação das cromatografias.....	38
4.3 Caracterização das bacteriocinas.....	39
4.3.1 Estabilidade dos concentrados e das frações parcialmente purificadas ao tratamento térmico.....	39
4.3.2 Estabilidade dos concentrados e das frações parcialmente purificadas à variação de pH.....	41
4.3.4 Manutenção do espectro antimicrobiano.....	43
4.3.5 Susceptibilidade a enzimas proteolíticas.....	44
4.4 Determinação do peso molecular e grau de purificação.....	44
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÃO.....	58
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado da atividade antimicrobiana dos eluídos das resinas de troca iônica no teste de escolha.....	35
Tabela 2: Resultado da atividade antimicrobiana (UA/mL) das frações eluídas da resina SP-sepharose com diferentes concentrações de molaridade de NaCl.....	37
Tabela 3: Resultado da atividade antimicrobiana (UA/mL) das frações eluídas da resina DEAE-sepharose com diferentes concentrações de molaridade de NaCl.....	38
Tabela 4: Etapas de purificação das bacteriocinas produzidas por <i>E. mundtii</i> 115, a partir do sobrenadante A.....	39
Tabela 5: Etapas de purificação das bacteriocinas produzidas por <i>E. mundtii</i> 115, a partir do sobrenadante B.....	39
Tabela 6: Resultado da atividade residual (%) obtidas após o tratamento enzimático do concentrado e das frações parcialmente purificadas.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia para purificação das bacteriocinas produzidas por <i>Enterococcus mundtii</i> 115.....	28
Figura 2: Concentrado A com atividade antimicrobiana de 12800 UA/mL . A (não diluída), B até L (diluições duplas 1:2 até 1:1024).....	34
Figura 3: Perfil de eluição das frações coletadas da cromatografia em gel filtração.....	36
Figura 4: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana do concentrado de bacteriocinas e das frações parcialmente purificadas sob diferentes temperaturas, de acordo com a atividade residual (%).....	40
Figura 5: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana do concentrado de bacteriocinas e das parcialmente sob diferentes temperaturas, de acordo com o tamanho do halo (mm).....	41
Figura 6: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana dos concentrados de bacteriocinas e das frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração sob diferentes valores de pH, de acordo com a atividade residual (%).....	42
Figura 7: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana dos concentrados de bacteriocinas e das frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração sob diferentes valores de pH, de acordo com o tamanho do halo (mm).....	43
Figura 8. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com Coomassie blue e gel de atividade.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

° C: graus Celsius
µL: microlitros
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: adenosina trifosfatada
BAL: bactérias ácido lácticas
BHI: infusão de cérebro e coração
CO₂: dióxido de carbono
Da: daltons
DMIC: Departamento de Microbiologia
DNA: ácido desoxirribonucléico
FDA: Food and Drug Administration
FAO: Food and Agriculture Organization
g: unidade de medida da força centrífuga relativa
GRAS: generally regarded as safe
kD: kilodalton
mL: mililitro
M: molar
MRS: Man Rogosa and Sharpe
mg: miligramas
mm: milímetros
NaCl: cloreto de sódio
NaOH: hidróxido de sódio
nm: nanômetros
PBS: solução tampão fosfato salina
pH: potencial de hidrogênio
pI: ponto isoelétrico
Psi: libra por polegada quadrada
rRNA: ácido ribonucléico ribossomal
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
TRIS: hidroximetilaminometano
TSA: ágar triptona de soja
TSB: caldo triptona de soja
UA: unidades arbitrárias
UFRGS: Universidade Federal do rio Grande do Sul

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Enterococcus* sp. são Gram positivas, anaeróbias facultativas e podem ser encontradas no meio ambiente, em alimentos e no trato gastrintestinal de animais e humanos. Este gênero inclui mais de 20 espécies, sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as duas espécies mais comumente encontradas.

Os enterococos têm grande importância ambiental, clínica e na indústria alimentícia. Nesta última podem ser utilizados, principalmente, como culturas iniciadoras e biopreservantes. São bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), desempenham várias atividades metabólicas úteis, como a lipólise e esterólise, utilizam citrato e algumas cepas sintetizam bacteriocinas, que são denominadas enterocinas.

As bacteriocinas são peptídeos que inibem o crescimento de outras bactérias que, em geral, são intimamente relacionadas. As bacteriocinas produzidas por BAL podem inibir ou eliminar o crescimento de uma variedade de bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. e *Listeria monocytogenes*. Elas afetam a permeabilidade da membrana, interferindo desta forma no funcionamento de funções celulares essenciais, tais como replicação do DNA e translocação

Todas estas propriedades tornam os *Enterococcus* sp. bactérias de grande valor industrial para a substituição dos preservantes químicos nos alimentos. A biopreservação inclui o uso de BAL produtoras de bacteriocinas ou a adição, direta, de suas bacteriocinas.

Antes de uma bacteriocina ser aplicada em produtos alimentícios, estudos relacionados ao espectro antimicrobiano, características bioquímicas e genéticas, eficácia e implicações regulatórias devem ser realizados. A completa elucidação destes fatores permitirá o desenvolvimento de bacteriocinas mais seguras e eficientes e para que essa caracterização seja possível faz-se necessária a purificação dessas substâncias. Os processos de purificação são complexos e de baixo rendimento, por isso é de extrema importância desenvolver estratégias que tornem possível a realização destes.

Em um trabalho anterior foram caracterizadas 18 cepas produtoras de bacteriocinas (Ferreira, 2005) provenientes de isolados de *Enterococcus* sp. em amostras de fezes de humanos (Fuentefria, 2004). A cepa *E.mundtii* 115 destacou-se quanto a maior produção de bacteriocinas e, portanto, foi escolhida para iniciar o trabalho de purificação de suas bacteriocinas.

O objetivo deste trabalho foi purificar as bacteriocinas produzidas pela cepa através de diferentes estratégias de purificação e caracterizar as frações purificadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias produtoras de ácido láctico (BAL)

As bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) são ubíquas em alimentos fermentados e não-fermentados e são componentes comuns da microflora comensal humana (Adams, 1999). Incluem os gêneros *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Microbacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Mohania *et al.*, 2008). Possuem um papel essencial na fermentação de alimentos devido a grande variedade de cepas aplicadas, rotineiramente, como culturas iniciadoras na fabricação e/ou preparação de laticínios, carnes e vegetais (O'Sullivan *et al.*, 2002).

As BAL são uma família heterogênea de microrganismos que fermentam, primeiramente, uma variedade de nutrientes em ácido láctico (Poolman, 2002). Os membros da família podem ser subdivididos em dois grupos distintos baseados no metabolismo deles. O grupo dos homofermentativos, composto pelos gêneros *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. e alguns lactobacilos, usam a via Embden-Meyerhof-Parnas para converter um mol de glicose em dois mols de

lactato. Em contraste, as bactérias heterofermentativas (*Leuconostoc* sp., *Weissella* sp. e alguns lactobacilos) produzem quantidades equimolares de CO₂, lactato e ácido acético ou etanol a partir da glicose através da via Pentose-Fosfato e, desta forma geram apenas metade da energia produzida pelas bactérias homofermentativas (Ross *et al.*, 2002).

A contribuição mais importante desses microrganismos para os produtos alimentícios é a preservação das qualidades nutritivas do material por uma longa vida de prateleira e a inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes. Isto acontece devido à competição por nutrientes e a presença de inibidores produzidos pela cultura iniciadora incluindo ácidos orgânicos, diacetil, acetoína, peróxido de hidrogênio, reuterina, reuteriцина, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas (Ray, 1992; Gálvez *et al.*, 2007). Além destas características, as BAL também contribuem com o sabor e a textura dos alimentos (Kleerebezem & Hugenholtz, 2003).

Devido à típica associação com a fermentação de alimentos e a longa tradição como bactérias de alimentos, algumas BAL são consideradas como “GRAS” (generally recognized as safe) pelo órgão americano FDA (Food and Drug Administration) (O’Sullivan *et al.*, 2002; Wilaipun *et al.*, 2004).

2.1.1 Gênero *Enterococcus* sp.

A história dos enterococos iniciou quando Thiercelin usou, em 1899, pela primeira vez o termo para indicar a origem intestinal de um diplococo Gram-positivo. O novo gênero *Enterococcus* sp. foi proposto por Thiercelin e Jouhaud em 1903 e, mais tarde, em 1906, foi renomeado como *Streptococcus* sp. por Andrewes & Horder. Em 1930, com o estabelecimento do sistema de

classificação sorológica Lancefield, os enterococos foram classificados como estreptococos grupo D. Sherman, em 1937, caracterizou o grupo D pela sua habilidade de crescer a 10° C e 45° C, em pH 9,6, em caldo NaCl 6,5% e por ter a capacidade de sobreviver a 60°C por 30 minutos. Na década de 80, baseados nos estudos com hibridização DNA-DNA e com o seqüenciamento do rRNA 16S, os enterococos foram removidos do gênero *Streptococcus* sp. e recolocados em seu próprio gênero: *Enterococcus* sp. (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984).

Os enterococos incluem 28 espécies (Foulquié Moreno *et al.*, 2006), sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as duas mais comumente encontradas e principais responsáveis pelo grande número de infecções oportunistas, que podem ocorrer no trato urinário, na corrente sangüínea, no endocárdio, no abdômen, no trato biliar e em queimaduras (Kayser, 2003). Além disso, estas cepas têm desenvolvido resistência à maioria dos antibióticos de uso clínico, incluindo a vancomicina e a teicoplanina (Franz *et al.*, 1999).

Em geral, os enterococos são bactérias facultativas anaeróbicas, Gram-positivas, catalase-negativas, oxidase-negativas e não formam esporos; podem ocorrer sozinhas, em pares ou em cadeias (Giraffa *et al.*, 1997; Foulquié Moreno *et al.* 2006). Devido a sua habilidade de fermentar carboidratos à L-ácido láctico são conhecidas como bactérias ácido lácticas (BAL) homofermentadoras (Carr *et al.*, 2002).

Os enterococos podem ser usados como organismos probióticos devido à boa taxa de crescimento, habilidade de adesão, produção de ácido láctico e boa estabilidade de suas enterocinas (Strompfová *et al.*, 2004). A cepa

Enterococcus faecium SF 68 tem sido estudada detalhadamente como um probiótico para uso no tratamento de diarreias causadas por gastroenterites (Marteau *et al.*, 2001; Prilassnig *et al.*, 2007) e atualmente já é comercializada como Bioflorin Giuliani® (Sanova Pharma, Áustria).

Eles são encontrados de forma ubíqua em solos, plantas, laticínios e outros alimentos, e estão presentes em grande número na microflora gastrointestinal e nas fezes de vertebrados (Domig *et al.*, 2003). De acordo com este último hábitat, sua capacidade de sobreviver no meio ambiente, resistência ao calor e o fato dos enterococos conseguirem dominar a população microbiana de alimentos tratados com altas temperaturas, eles podem também ser usados como indicadores de contaminação fecal (Stiles & Holzapfel, 1997; Haack *et al.*, 2009).

2.2 Bacteriocinas produzidas por BAL

O primeiro registro da observação de uma interação antagônica entre bactérias foi realizada por Pasteur & Joubert em 1877. Eles perceberam que uma “bactéria comum”, provavelmente a *Escherichia coli*, poderia interferir no crescimento do *Bacillus anthracis* co-inoculado na urina usada como meio de cultura e em animais infectados experimentalmente. Gratia, em 1925, fez a primeira documentação da natureza de um agente antibiótico produzido por *E. coli*, demonstrando que a cepa V (virulenta em infecções experimentais) produziu, em meio líquido, uma substância dialisável e estável ao calor que inibia, em altas diluições, o crescimento de *E. coli* ϕ . Esta substância foi nomeada como colicina V e mais tarde como a bacteriocina microcina (Faith *et al.*, 1992).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por uma bactéria e são ativos contra outra bactéria, tanto da mesma espécie quanto de outros gêneros. Os organismos produtores são imunes a sua própria bacteriocina, uma propriedade que é mediada por proteínas imuno específicas (Cotter *et al.*, 2005). A produção de bacteriocinas ocorre em conjunto com a expressão dessas proteínas e tem sido demonstrado que os genes envolvidos nas funções de imunidade estão associados com o gene estrutural da bacteriocina (Kyoung-Sik *et al.*, 2007).

Os genes das bacteriocinas estão codificados no cromossomo ou em plasmídeos bacterianos e a expressão destes leva a uma variedade de mecanismos de ação, incluindo a formação de poros na membrana citoplasmática, interferência com a parede celular e atividades de nuclease. Tipicamente, a biossíntese de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas é regulada por mecanismos de transporte específicos facilitando sua secreção (Riley *et al.*, 2002).

As bacteriocinas são, usualmente, sintetizadas como um pré-peptídeo inativo que possui uma seqüência líder N-terminal. Este presumivelmente, mantém a bacteriocina na forma inativa no interior da célula produtora, facilita a interação com o transportador e, provavelmente no caso dos lantibióticos, tem a função de reconhecimento da maquinaria modificada (Chen *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004). A seqüência é clivada por um sistema de transporte ou, menos freqüentemente, pela via de secreção da célula. Mas, já foi demonstrado que algumas bacteriocinas parecem não possuir uma seqüência líder (Diep & Nes, 2002).

Entre as BAL, cepas de todos os gêneros têm sido descritas como produtoras de bacteriocinas (Jack *et al.*, 1995). A difusão da produção destes peptídeos é causada pelo fato de que genes relevantes são, freqüentemente, associados a elementos transferíveis, como transposons ou plasmídeos conjugativos, e esta associação natural pode facilitar a produção heteróloga de bacteriocinas (Coakley *et al.*, 1997).

A produção de bacteriocinas por BAL é associada ao crescimento, geralmente ocorre ao longo da fase exponencial e cessa ao final ou às vezes antes do fim desta. A produção é influenciada pelo tipo e quantidade de fontes de carbono, nitrogênio e fosfato no meio de cultivo, assim como por surfactantes catiônicos e outros inibidores. As bacteriocinas podem ser produzidas em meios contendo diferentes fontes de carboidratos (Savadoço *et al.*, 2006), como a Nisina Z que pode ser produzida a partir de meios com glicose, sacarose ou xilose por *Lactococcus lactis* IO-1, mas os melhores resultados foram obtidos com a glicose quando comparado com a produção a partir da xilose (Matsuaki *et al.*, 1996; Chinachoti *et al.*, 1997).

Duas características distinguem a maioria das bacteriocinas dos antibióticos: os antibióticos não são sintetizados ribossomicamente e as bacteriocinas têm espectro limitado (Gillor *et al.*, 2005).

As bacteriocinas produzidas por BAL são divididas em quatro grupos principais (Klaenhammer, 1993; Foulquié Moreno *et al.*, 2006). A classe I consiste em peptídeos pequenos, modificados pós-tradução, catiônicos, hidrofóbicos e que são caracterizados pela presença de aminoácidos tioéster modificado, como a lantionina e β -metil lantionina, e aminoácidos insaturados,

como a deidrolanina e dehidrobutirina. Eles são referidos como lantibióticos e ainda podem ser subdivididos em seis grupos. A nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, é uma bacteriocina que pertence a este grupo.

A classe II compreende um grande grupo de peptídeos pequenos, não-modificados pós-tradução (exceto pela clivagem do peptídeo líder de um peptídeo pré-bacteriocina), estáveis ao calor, catiônicos, hidrofóbicos que também são subdivididos. A classe IIa inclui bacteriocinas tipo pediocina com um forte efeito anti-listerial e possuem uma seqüência N-terminal conservada YGNGV e duas cisteínas, que formam uma ponte dissulfeto na metade N-terminal, sendo a Pediocina Ach produzida por *Pediococcus acidilactici* HA (Bhunja *et al.*, 1988) uma das primeiras representantes do grupo. A classe IIb consiste em bacteriocinas que precisam de dois peptídeos para serem funcionais, como a Enterocina L50 A e B produzidas por *Enterococcus faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998) e a Lactococcin MMT24 produzida por *Lactococcus lactis* MMT24 (Ghraiiri *et al.*, 2005) que precisa de seus dois peptídeos, pep α e pep β , para ter uma atividade antimicrobiana completa. Na classe IIc estão agrupadas as bacteriocinas que não se enquadram aos outros subgrupos. Nesta última encontram-se a Plantaricina A produzida por *Lactococcus plantarum* C11 (Hauge *et al.*, 1998) e Enterocina 62-6 produzida por *Enterococcus faecium* 62-6 (Dezwaan *et al.* 2007), entre outras.

Na classe III é onde estão presentes as proteínas grandes, hidrofílicas e estáveis ao calor, como a Enterolisina A produzida por *Enterococcus faecalis* LMG 2333 (Nilsen *et al.*, 2003). E por fim, a classe IV representa as bacteriocinas complexas que além de peptídeos, possuem

moléculas de carboidratos ou lipídeos, como a Leuconocina S produzida por *Leuconostoc paramesenteroides* (Lewus *et al.*, 1992).

Em 2007, Nes *et al.* sugeriram que fosse acrescentado um quarto subgrupo na classe II, a classe IId, na qual estariam incluídas as bacteriocinas circulares. Nas últimas décadas diferentes pesquisadores descreveram esta família única de proteínas isoladas de diversas fontes, que possuem os terminais N – e C – ligados para formar um esqueleto circular. O termo circular foi adotado para distinguir este grupo de proteínas codificadas geneticamente dos clássicos peptídeos cíclicos, também produzidos por microrganismos, mas via múltiplos passos de síntese enzimática (Craik, 2004).

Entre as bacteriocinas circulares já descritas (Leer *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 2001; Kalmokoff *et al.*, 2003; Kawulka *et al.*, 2004; Wirawan *et al.*, 2007), as mais estudadas são a enterocina AS-48 (Maqueda *et al.*, 2004); a gassericina A e a reutericina 6, duas bacteriocinas hidrofóbicas produzidas por espécies de *Lactobacillus* sp. e que têm 98% de similaridade com a acidocina B, produzida por *Lactobacillus acidophilus* (Kawai *et al.*, 2004a).

O fato de que muitas BAL encontradas em alimentos fermentados e não fermentados produzem uma variedade de diferentes bacteriocinas, tem levado a utilização dessas bactérias como biopreservantes dos alimentos (Tiwari & Srivastava, 2008). A demanda, pelos consumidores, por uma maior segurança nos alimentos de longa vida de prateleira e a preferência pelo uso mínimo de preservantes químicos, torna as bacteriocinas uma opção interessante que seria, no mínimo, parte da solução destas exigências. Isto devido a várias propriedades: (1) não são tóxicas para as células eucarióticas;

(2) são inativadas por proteases digestivas, tendo pequena influência sobre a microbiota estomacal; (3) são estáveis em diferentes valores de pH e tolerantes a altas temperaturas; (4) têm atividade antimicrobiana contra muitas bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos; (5) geralmente agem na membrana citoplasmática, evitando a resistência cruzada com antibióticos; e (6) seus determinantes genéticos são, usualmente, codificados em plasmídeos, facilitando a manipulação genética (Gálvez *et al.*, 2007).

No entanto, atualmente, apenas a nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, e a pediocina PA1/AcH, produzida por *Pediococcus acidilactici*, são usadas nos alimentos (Cotter *et al.*, 2005) e comercializadas como Nisaplin™ (Danisco, Copenhagen, Dinamarca) e ALTA™ e Fargo™ (Kerry Bioscience, Cork, Irlanda), respectivamente.

A nisina é comercializada em mais de 48 países, incluindo o Brasil e tem a aprovação do FDA (Food and Drug Administration). É efetiva em alguns sistemas de alimentos, inibindo uma variedade de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos importantes como *Listeria monocytogenes*. Usada predominantemente em alimentos enlatados e laticínios, principalmente em queijos processados protegendo contra microrganismos formadores de esporos resistentes ao calor, como *Bacillus* spp. e *Clostridium botulinum* (Deegan *et al.*, 2006).

2.2.1 Enterocinas

As bacteriocinas sintetizadas pelas espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. são denominadas enterocinas. Desde 1955, quando Kjems

relatou a primeira substância tipo-bacteriocina dentro do grupo dos estreptococos D, um grande número de enterocinas tem sido estudado.

Geralmente, as enterocinas são ativas contra bactérias patogênicas, principalmente os gêneros *Listeria* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. (Drider *et al.*, 2006). A grande maioria é sintetizada por *E. faecium*, no entanto outras espécies de enterococos têm sido descritas como produtoras de bacteriocinas: *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. columbae* (Jennes *et al.*, 2000; Sabia *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2007).

A partir de 1998 foi caracterizada a primeira bacteriocina produzida por *E. mundtii* e denominada mundticina ATO6 (Bennik *et al.*, 1998). A Mundticina ATO6 pertence à classe IIa das bacteriocinas e tem massa de 4284,21 Da. Inibe o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e uma variedade de bactérias ácido lácticas, através da dissipação do potencial de membrana e a perda de ATP intracelular. É bastante solúvel em água e estável em diferentes valores de pH e temperaturas.

Atualmente, já foram caracterizadas e seqüenciadas outras três bacteriocinas produzidas por *E. mundtii*: mundticina KS (Kawamoto *et al.*, 2002), enterocina CRL35 (Saavedra *et al.*, 2004) e enterocina QU2 (Zendo *et al.*, 2005). Alguns outros isolados de *E. mundtii* também produzem bacteriocinas, mas suas estruturas ainda não foram determinadas (Ott *et al.*, 2001; De Vuyst *et al.*, 2003; Kwaadsteniet *et al.*, 2005; Todorov *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2006; Coetzee *et al.*, 2007).

Inicialmente, relatou-se que a mundticina ATO6 diferia da mundticina KS por dois resíduos de aminoácidos na região C-terminal. Posteriormente, a seqüência da mundticina ATO6 foi corrigida e foi demonstrado que esta é idêntica a mundticina KS, tanto no peptídeo maduro quanto no líder. Já a enterocina CRL35 é idêntica apenas ao peptídeo maduro destas bacteriocinas, pois possui dois resíduos de aminoácidos diferentes no peptídeo líder, enquanto a enterocina QU2 é igual a mundticina ATO6 e KS (Saavedra *et al.*, 2004; Zendo *et al.*, 2005).

As enterocinas, assim como a maioria das bacteriocinas, têm a membrana citoplasmática como primeiro alvo. Elas formam poros na membrana da célula e, desta forma, diminuindo o potencial transmembrana e o gradiente do pH, o que resulta no escoamento de moléculas intracelulares indispensáveis à célula (Cleveland *et al.*, 2001).

As enterocinas podem pertencer à classe I, como as Citolisinas LL e LS (Gilmore *et al.*, 1994), produzidas por *E. faecalis* beta-hemolítico, que além de possuírem atividade antimicrobiana também causam hemólise em células eucarióticas.

Podem pertencer à classe IIa, como a Enterocina A, produzida por *E. faecium* (Aymerich *et al.*, 1996); a Enterocina P, produzida por *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997) e a Enterocina M, produzida por *E. faecium* AL41 (Mareková *et al.*, 2007). Na classe IIc, encontram-se a Enterocina B, produzida por *E. faecium* T136 (Casaus *et al.*, 1997) e a Enterocina 62-6 produzida por *E. faecium* 62-6 (Dezwaan *et al.* 2007) e na II d a Enterocina AS-48 produzida

por *E. faecalis* AS-48 (Martinez-Bueno *et al.*, 1994). A classe III possui apenas a Enterolisina A (Nilsen *et al.*, 2003).

Algumas enterocinas isoladas de diferentes cepas, que foram no princípio consideradas como novas, após serem estudadas verificou-se que eram idênticas a enterocinas já existentes. A Enterocina 4 (Joosten *et al.*, 1996), Enterocina EFS2 (Maisnier-Patin *et al.*, 1996), Bacteriocina 21 (Tomita *et al.*, 1997) e Enterocina 7C5 (Folli *et al.*, 2003) são idênticas a enterocina AS-48 (Martinez-Bueno *et al.*, 1994). Enquanto, a Enterocina AA13 e G16 (Herranz *et al.*, 1999), Enterocina B1 e B2 (Foulquié Moreno *et al.*, 2002) são idênticas a Enterocina P (Cintas *et al.*, 1997). A Enterocina IT (Izquierdo *et al.*, 2009) é idêntica a Bacteriocina 32 (Inoue *et al.*, 2006).

Muitos enterococos produtores de bacteriocinas têm sido avaliados para o uso como biopreservantes em laticínios, carnes e derivados (Franz *et al.*, 2003). Alguns estudos demonstraram o efeito inibitório de cepas *E. faecium* e *E. faecalis* produtoras de enterocinas contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, quando utilizadas artificialmente em queijos (Sulzer *et al.*, 1992), leite (Laukova *et al.*, 1999) e leite de soja (Laukova & Czikkova, 1999). A presença e a atividade anti-listerial das enterocinas mantiveram-se até o final do amadurecimento do queijo; e não foi relatada nenhuma ou apenas mínima influência na atividade das culturas iniciadoras comerciais e nas características organolépticas dos produtos (Giraffa, 2003).

Durante o processo de fermentação de salsichas, Callewaert *et al.* (2000) utilizaram as cepas *E. faecium* CCM 4231 e *E. faecium* RZS C13 como culturas iniciadoras, e verificaram que elas foram parcialmente competitivas

durante a fermentação e inibiram fortemente o crescimento de *Listeria* sp., sem causar alterações no sabor dos produtos.

A enterocina circular AS-48 foi testada contra duas cepas de *Geobacillus stearothermophilus* em amostras de alimentos enlatados (milho e ervilhas) e em leite de coco. A AS-48 reduziu a contagem de células viáveis abaixo dos níveis de detecção das amostras de enlatados estocadas a 45 °C por 30 dias. Já no leite de coco, a inativação bacteriana foi ainda mais rápida. Em todos os alimentos enlatados e amostras de bebidas inoculadas com endósporos intactos de *G. stearothermophilus*, a adição da bacteriocina rapidamente reduziu a contagem de células e impediu o crescimento durante o período de estocagem (Viedma *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados positivos dos estudos citados, algumas pesquisas (Hugas *et al.*, 2003; Sarantinoupoulos *et al.*, 2002) demonstraram, tanto em laticínios quanto em carnes, que muitas vezes o ambiente, a microbiota endógena, a fórmula e a tecnologia usada para a fabricação dos alimentos interferem nos níveis de produção das bacteriocinas e/ou no crescimento das cepas produtoras.

Ainda que a eficiência das enterocinas contra bactérias deteriorantes e patogênicas em vários sistemas de alimentos tenha sido muito demonstrada, apenas algumas informações estão disponíveis sobre as funções das bacteriocinas no ecossistema animal, como a aplicabilidade de enterocinas ou cepas produtoras de enterocinas no controle e/ou redução de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal de animais (Strompfová *et al.*, 2008).

A cepa *Enterococcus faecium* EK13, produtora de enterocina A, foi administrada oralmente em porcos recém-nascidos. Após o tratamento, os porcos apresentaram significativa redução na contagem de *Escherichia coli* quando comparados com o grupo controle que recebeu tampão salina como placebo. A aplicação da cepa EK13 também aumentou a concentração de proteínas totais séricas, hemoglobina, hematócrito, hemácias e o índice de atividade fagocitária dos leucócitos, concomitante a esse efeito ocorreu a redução do colesterol (Strompfová *et al.*, 2006).

Têm sido estudados outros usos de bacteriocinas produzidas por enterococos, como é o caso da Bacteriocina ESL5 produzida por *Enterococcus faecalis* SL-5 (Kang *et al.*, 2009), que apresentou atividade antimicrobiana contra *Propionibacterium acnes*, agente causador de Acne Vulgaris. Esta bacteriocina foi testada em paciente com acne moderada através do uso de uma loção produzida a partir do sobrenadante livre de células da cepa produtora, e demonstrou redução significativa de lesões inflamatórias, como pústulas, quando comparada com a loção de placebo.

2.3 Purificação de proteínas

O interesse crescente pelos processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A indústria de alimentos também apresentou aumento no uso de biomoléculas, como enzimas e outras proteínas, principalmente em cervejarias e em processos de fermentação (Zuñiga *et al.*, 2003).

O processo de purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas, cuidadosamente definidas, e esse processo deve ser associado com o acompanhamento de alguma característica marcante da proteína, como o tipo de atividade ou coloração.

As cromatografias em coluna de gel filtração ou adsorção são os sistemas mais utilizados para a distinção entre proteínas. Apesar de existir uma lógica no emprego desses métodos, geralmente a otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, especialmente pelo fato de que mesmo quando se conhece as características físico-químicas das proteínas a serem purificadas, é muitas vezes imprevisível o comportamento delas no decorrer do processo de purificação. Nesse caso, durante a purificação, não raramente ocorrem mudanças na estrutura das proteínas, que podem provocar desde pequenas alterações nas suas características físico-químicas até modificação ou perda de sua atividade biológica. O grande desafio destes processos é o trabalho para se encontrar as melhores estratégias e, se for o caso, adequar a metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para a sua aplicação (Almeida & Kurtenbach, 2002).

O desenho de um processo otimizado de purificação de uma proteína dependerá de suas características físico-químicas, de suas propriedades biológicas, da fonte da qual a proteína será purificada e da tecnologia de purificação disponível. O produto final deverá ser resultado dos compromissos

definidos no desenho do processo, ou seja: custo, velocidade, volume e pureza (Ho *et al.*, 2000).

2.3.1 Purificação de enterocinas

As enterocinas, geralmente, pertencem a classe IIa das bacteriocinas, possuindo propriedades que tornam os *Enterococcus* sp. bactérias de grande valor industrial para a substituição parcial dos preservantes químicos nos alimentos.

O aumento do número de contaminações de alimentos por *Listeria* sp. tem estimulado pesquisas da classe IIa das bacteriocinas produzidas por BAL. O número de tais compostos peptídicos pode ser limitado, já que muitas das novas cepas isoladas expressam bacteriocinas previamente descobertas (Guyonnet *et al.*, 2000; Holo *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2003). A purificação e caracterização de bacteriocinas como essas, de sua estabilidade e modo de ação antimicrobiano é essencial para avaliar seu possível potencial para várias aplicações.

A purificação de bacteriocinas é um processo que consome tempo e apresenta várias etapas para a realização. Além disso, são substâncias com diferentes características estruturais e propriedades químicas, não sendo possível generalizar um método único de purificação (López *et al.*, 2007). Apesar de muitas bacteriocinas produzidas por BAL terem sido descritas, apenas algumas foram completamente purificadas e caracterizadas (Tiwari & Srivastava, 2008). A maior desvantagem para a realização de análises de muitas bacteriocinas é a dificuldade em obter significantes quantidades de bacteriocinas puras e o baixo rendimento durante as etapas de purificação.

Isso tem limitado, em parte, a caracterização física e bioquímica de compostos ativos em muitos casos (Beaulieu *et al.*, 2006).

Como as bacteriocinas são secretadas no meio de cultura, a maioria das estratégias inicia na etapa de concentração destes peptídeos a partir dos sobrenadantes das culturas. Muitas bacteriocinas não são produzidas em grandes quantidades pela cepa produtora, portanto é muito importante concentrar o sobrenadante que contém essas substâncias antimicrobianas nas etapas iniciais (Pingitore *et al.*, 2007). Para isso, geralmente se realiza a precipitação das bacteriocinas com sulfato de amônio (Folli *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003) ou extração das bacteriocinas utilizando solventes orgânicos, como o clorofórmio (Burianek & Yousef, 2000; Park *et al.*, 2003).

Após estes processos, são utilizados métodos de purificação como a cromatografia de gel filtração (Fleury *et al.*, 1996), de troca-catiônica (Ohmomo *et al.*, 2000), de troca-aniônica (Lee *et al.*, 2007) e a de fase reversa (Uteng *et al.*, 2002) com a finalidade de obter-se um alto grau de pureza da bacteriocina.

Apesar destas etapas levarem à produção de preparações de bacteriocinas altamente puras, o rendimento final é bastante baixo, e em geral, inferior a 20% (Jack *et al.*, 1995).

2.3.2 Cromatografia por gel filtração

Uma das características das proteínas é seu tamanho elevado, o que torna possível a aplicação de métodos simples para a separação de proteínas de moléculas menores, bem como de métodos para separar misturas de proteínas de tamanhos distintos (Pessoa & Kilikian, 2005).

A cromatografia por gel filtração ou exclusão promove uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas e dependentes de uma estrutura estacionária (resina), contendo poros de tamanho controlado, desta forma a separação ocorre de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. As moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros apresentando maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as pequenas são eluídas lentamente pela fase móvel (Irvine, 1997; Zuñiga, 2003).

Esse tipo de cromatografia tem características desejáveis, tais como: simplicidade técnica, insensibilidade a solventes e temperaturas, e versatilidade, pois é possível separar substâncias com diferentes massas moleculares variando a matriz do gel (resina) (Collins *et al.*, 1997).

2.3.3 Cromatografia por troca iônica

A cromatografia de troca iônica é muito utilizada para purificar proteínas, pois é simples, de fácil ampliação de escala, alta resolução, alta capacidade de adsorção e versátil.

Neste tipo de cromatografia a fase estacionária (resina) é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Então, os solutos podem ser eluídos por deslocamento com outros íons com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

A separação de materiais por cromatografia por troca iônica está baseada na adsorção reversível dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da

resina. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e da resina é devido a diferenças de carga, sendo possível o controle desta utilizando fatores como pH e força iônica (Pessoa & Kilikian, 2005; Collins *et al.*, 1997).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Neste trabalho foi utilizado o microrganismo *Enterococcus mundtii* 115, pertencente à coleção de bactérias do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Esta cepa foi isolada de amostras de fezes de humanos e identificada em estudo prévio por Fuentefria em 2004 e caracterizada como produtora de bacteriocina por Ferreira *et al.* (2007).

A cepa foi conservada em caldo BHI (Himedia) com 15% de glicerol (Synth) a -20° C.

3.2 Obtenção do sobrenadante livre de células

3.2.1 Preparação do pré-inóculo

O pré-inóculo do *E. mundtii* 115 foi realizado em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI (Himedia) e 10 μ L da cepa conservada. Os tubos foram incubados por 18 horas a 35° C.

3.2.2 Obtenção do sobrenadante

Uma alíquota do pré-inóculo, na concentração final de 10^5 células/mL (escala de McFarland), foi transferida para um Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de caldo MRS (Acumedia) e incubado por 17 horas a

35°C sob agitação constante (150 rpm). Após o período de incubação, o pH da cultura de *E. mundtii* 115 foi ajustado para 6,2 com NaOH 2M (Vetec) e foi centrifugada por 15 minutos a 3000 x g, separando as células do sobrenadante.

Foram produzidos dois sobrenadantes livres de células em datas diferentes, os quais foram denominados “Sobrenadante A” e Sobrenadante B”. Os sobrenadante livres de células foram esterilizados por filtração em membrana de ésteres mistos com poro de 0,22 µm (S & S) e foram armazenados a – 20°C.

3.3 Concentração das bacteriocinas

A concentração das bacteriocinas foi realizada de acordo com o método de Burianek e Yousef (2000), modificado. Em 2500 mL de sobrenadante livre de células foi adicionado 1250 mL de clorofórmio (Synth), agitado vigorosamente por 30 minutos e a mistura foi colocada em um funil de separação. Após decantação por 18 horas, sob temperatura ambiente, as partículas sólidas na parte inferior foram coletadas e colocadas em dois balões de 1000 mL cada e o restante do solvente foi evaporado em um evaporador rotatório (rotavapor Laborota 4000, Heidolth) sob pressão de 15 psi e aquecido a 45 °C por 60 minutos, aproximadamente.

A fração concentrada obtida do rotavapor foi lavada com água destilada estéril e secada a temperatura ambiente por 48 horas. O precipitado resultante foi reidratado e dissolvido em 6,5 mL de Tris 0,1 M (Invitrogen), pH 7,0 (tampão A). Esta fração foi chamada de concentrado bruto de bacteriocinas.

As concentrações foram realizadas nos dois Sobrenadantes A e B, os quais foram denominados “Concentrado A” e Concentrado B”.

3.4 Purificação parcial das bacteriocinas

3.4.1 Escolha da resina de troca iônica

Para determinar os tipos de resinas que seriam utilizadas nas cromatografias de troca iônica para a purificação das bacteriocinas, foi realizado um teste preliminar, através de cromatografias em batelada.

Em quatro tubos de ensaio foram colocados, respectivamente, 7,5 mL de resinas de troca catiônica e aniônica hidratadas: SP-sepharose, Q-sepharose, DEAE-sepharose e CM-sepharose (GE Healthcare). As resinas de troca catiônica foram equilibradas com tampão Acetato de Sódio 0,01 M (Vetec), pH 5 (tampão B), e as resinas de troca aniônica foram equilibradas com tampão Tris 0,01 M (Invitrogen), pH 8 (tampão C)

Foi aplicado 0,5 mL do concentrado de bacteriocinas em cada tubo com resina. Após suave agitação e decantação das resinas, os sobrenadantes foram coletados e denominados como “fração não-ligada”. Em seguida foram realizadas duas lavagens com cada um dos tampões B e C, de acordo com o tipo de resina, e os sobrenadantes foram coletados.

Por fim, as resinas foram eluídas com seus respectivos tampões contendo 1 M de NaCl (Synth) cada. Após a agitação e decantação das resinas, estes sobrenadantes foram coletados e a atividade antimicrobiana de todos os sobrenadantes foi testada de acordo com o item 3.6.

A escolha das resinas catiônicas e aniônicas utilizadas na purificação das bacteriocinas foi realizada de acordo com os sobrenadantes eluídos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana.

3.4.2 Estratégias de purificação das bacteriocinas

Para verificar diferentes estratégias de purificação das bacteriocinas, foram realizadas cromatografias líquidas com diferentes resinas de troca iônica e de gel filtração e, posteriormente, foi comparado o desempenho de cada uma. As resinas de troca iônica foram escolhidas a partir dos resultados do item 3.4.1.

As resinas utilizadas para os testes foram:

- troca aniônica: DEAE-sepharose (GE Healthcare)
- troca catiônica: SP-sepharose (GE Healthcare)
- gel filtração: Sephadex G-15 (Pharmacia)

A cromatografia das resinas de troca iônica foi realizada através de batelada e a cromatografia de gel filtração em coluna (Figura 1).

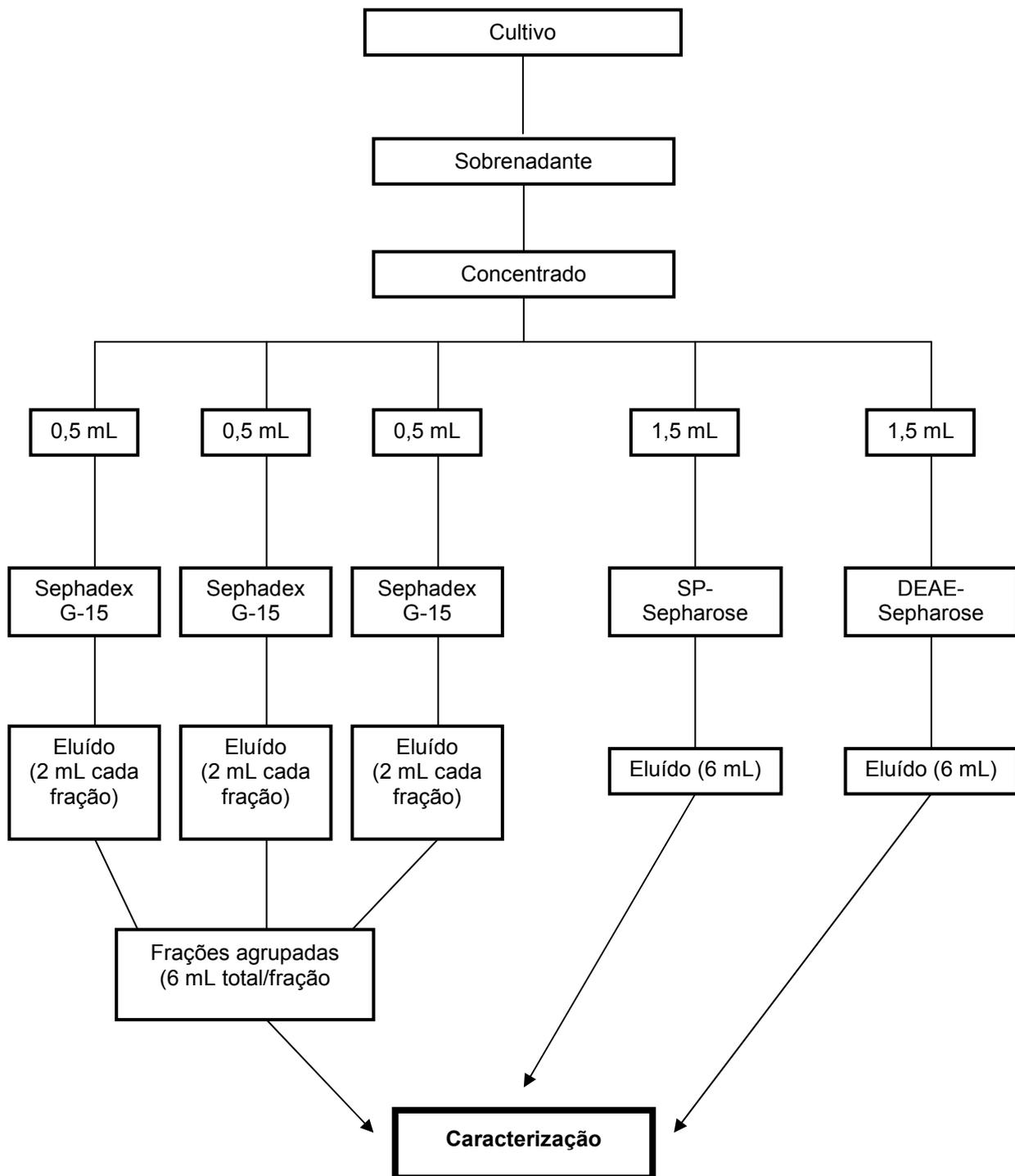


Figura 1: Estratégias para purificação das bacteriocinas produzidas por *Enterococcus mundtii* 115.

3.4.2.1 Cromatografia líquida em resina de gel filtração

Foi realizada a cromatografia líquida em resina de gel filtração do concentrado A e do concentrado B. Em uma coluna (380 x 10 mm) preenchida com resina de gel filtração Sephadex G-15, que foi hidratada e previamente equilibrada com o tampão A, foi aplicado 0,5 mL do concentrado de bacteriocinas. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão A em um fluxo de 24 mL/h. Foram coletadas frações de 2 mL e estas foram monitoradas por espectrofotômetro (Ultrospec 2000, GE Healthcare) a 280 nm. A cromatografia foi realizada em triplicata, totalizando 1,5 mL de concentrado de bacteriocinas purificados e 6 mL de cada fração coletada (Figura 1). A atividade antimicrobiana de todas as frações foi quantificada de acordo com item 3.6.

3.4.2.2 Cromatografia líquida em batelada em resina de troca catiônica

Foi realizada a cromatografia líquida em resina de troca catiônica do concentrado A e do concentrado B. A resina SP-sepharose foi hidratada e previamente equilibrada em tampão B. Foram aplicados 1,5 mL do concentrado de bacteriocinas em 7,5 mL de resina e misturados gentilmente, após a decantação da resina foi coletado o sobrenadante (fração não-ligada) e descartado. Em seguida foram realizadas duas lavagens com 20 mL do tampão B e os sobrenadantes foram coletados e descartados. Por fim, a resina foi eluída com 6 mL de tampão B nas seguintes concentrações de NaCl: 0,1 M (E₁), 0,3 M (E₂), 0,5 M (E₃), 0,8 M (E₄), e 1 M (E₅), após a agitação e decantação da resina com cada molaridade, os respectivos sobrenadantes eluídos (E₁, E₂, E₃, E₄, E₅) foram coletados. Foi realizada uma lavagem da resina

com o tampão B após cada sobrenadante eluído ter sido coletado. A atividade antimicrobiana de todos os sobrenadantes foi quantificada (item 3.6). Ver Figura 1.

3.4.2.3 Cromatografia líquida em batelada em resina de troca aniônica

Foi realizada a cromatografia líquida em resina de troca aniônica do concentrado A e do concentrado B. A resina DEAE-sepharose foi hidratada e previamente equilibrada em tampão C. Foram aplicados 1,5 mL do concentrado de bacteriocinas em 7,5 mL de resina e misturados gentilmente, após a decantação da resina foi coletado o sobrenadante (fração não-ligada) e descartado. Em seguida foram realizadas duas lavagens com 20 mL do tampão C e os sobrenadantes foram coletados e descartados. Por fim, a resina foi eluída com 6 mL de tampão C nas seguintes concentrações de NaCl: 0,1 M (E₁), 0,3 M (E₂), 0,5 M (E₃), 0,8 M (E₄), e 1 M (E₅), após a agitação e decantação da resina com cada molaridade, os respectivos sobrenadantes eluídos (E₁, E₂, E₃, E₄, E₅) foram coletados. Foi realizada uma lavagem da resina com o tampão C após cada sobrenadante eluído ter sido coletado. A atividade antimicrobiana de todos os sobrenadantes foi quantificada (item 3.6). Ver Figura 1.

3.5 Quantificação da concentração de proteínas

As concentrações protéicas do sobrenadante livre de células, do concentrado de bacteriocinas e das frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976)

usando reagentes Bioagency e albumina sérica bovina como padrão (Bioagency).

3.6 Análise quantitativa da atividade antimicrobiana

Para verificar a atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células, do concentrado de bacteriocinas e das frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração foi utilizada a técnica de difusão em poços (Tagg e McGiven, 1971).

Em placas contendo uma fina camada de ágar TSA (Himedia) de volume definido (20 mL) foram fixadas ponteiras de 1000 µL. Após a solidificação desta, foi vertida uma segunda camada de volume definido (20 mL) de ágar TSA (Himedia) semi-sólido (0,7% ágar, Himedia), previamente inoculado com a bactéria indicadora *Listeria innocua* ATCC 33090 na concentração final de 10^5 células/mL. Depois de solidificado o ágar TSA semi-sólido as ponteiras foram retiradas e em cada poço formado foram adicionados 80 µL da amostra a ser testada. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos, após foram incubadas em estufa (Biopar) a 37°C por 18 horas. Após o período de incubação foi verificada a formação de halo de inibição que representa a atividade antimicrobiana das amostras.

A quantificação da atividade foi determinada em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL). Para isto foram realizadas diluições duplas sucessivas das amostras (1:2 a 1:2048). Os halos formados foram medidos em milímetros e o título designado como UA/mL foi definido como a recíproca da maior diluição que apresentou um halo de inibição maior que 2 mm (Kawamoto *et al.*, 2002).

3.7 Caracterização das bacteriocinas

Foi verificada a estabilidade da atividade antimicrobiana dos concentrados de bacteriocinas e das frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração quanto à variação de pH, ao tratamento térmico e a susceptibilidade a enzimas proteolíticas, também foi verificada a manutenção do espectro antimicrobiano.

As frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram utilizadas para a caracterização das bacteriocinas.

3.7.1 Estabilidade ao tratamento térmico da fração purificada

Os concentrados de bacteriocinas e as frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração foram aquecidos em banho-maria (Thermomix BMS, B. Braun Biotec International) a temperaturas entre 50 e 100°C, em intervalos de 10°C, por 30 minutos e autoclavadas a 121°C por 20 minutos. Após os tratamentos foi realizado o teste de difusão em poços (item 3.6) das amostras e dos controles (amostra sem tratamento) e a atividade residual foi determinada utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{A.R. (\%)} = \frac{\text{HT} - \text{P}}{\text{HC} - \text{P}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

A.R. = atividade residual

HT = diâmetro do halo do sobrenadante após tratamento (mm)

HC = diâmetro do halo do controle (fração sem tratamento)

P = diâmetro do poço (9 mm)

3.7.2 Estabilidade à variação do pH

Os concentrados de bacteriocinas e as frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração foram incubados a 35°C por duas horas, em banho-maria (Thermomix BMS, B. Braun Biotec International), nos pHs entre 2 e 10, utilizando os seguintes tampões na concentração de 0,25 M: glicina (pH 2 e 3); citrato (pH 4 e 5); fosfato (pH 6 a 8) e Tris (pH 9 e 10). Uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi adicionada em 100 µL de cada tampão. Após a incubação, foi realizado o teste de difusão em poços (item 3.6) das amostras e dos controles (100µL de amostra e 100 µL de PBS). A atividade residual foi determinada segundo a Equação 1.

3.7.3 Susceptibilidade a enzimas proteolíticas

Alíquotas dos concentrados de bacteriocinas e das frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração foram tratadas com as seguintes enzimas: tripsina; proteinase K e lisozima nas concentrações finas de 1 e 0,1 mg/mL. As alíquotas foram incubadas nas temperaturas ótimas de cada enzima, a 37° C, quando utilizadas as enzimas tripsina e lisozima, e a 56° C, quando utilizada a proteínas K, durante duas horas. Após o período de incubação, as alíquotas foram submetidas a 80°C por 10 minutos para a inativação das enzimas. A atividade das amostras e dos controles (amostra e PBS) foi verificada utilizando o teste de difusão em poços (item 3.6).

3.7.4 Manutenção do espectro antimicrobiano

Foram preparadas culturas das bactérias indicadoras *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; *Listeria monocytogenes* ATCC 19112; *Listeria innocua* ATCC 33090 e *Salmonella enteritidis*.

As bactérias indicadoras foram cultivadas no meio de cultura caldo BHI (Himedia) a 37°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana dos concentrados de bacteriocinas e das frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração contra as bactérias indicadoras foi verificada utilizando o teste de difusão em poços (item 3.6).

3.8 Concentração das frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração

As frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração foram concentradas de acordo com Burianek e Yousef (2000).

Em 2 mL de cada fração foi adicionado 1 mL de clorofórmio (Synth), foi agitado vigorosamente por 5 minutos e a mistura foi centrifugada a 12000 x g. Após foram coletadas as partículas sólidas da interface e lavadas com o tampão A, e secadas a temperatura ambiente por 48 horas. O precipitado resultante de cada fração foi reidratado e dissolvido em 50 µL de tampão A.

3.9 Determinação do peso molecular e grau de purificação

O peso molecular e o grau de purificação do concentrado de bacteriocinas e das frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração foi verificado através da realização de gel de poliacrilamida SDS-PAGE segundo Ausubel *et al.* (1987).

Uma alíquota do concentrado de bacteriocinas e das frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração concentradas foi aplicada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 18% e após a eletroforese metade do gel foi corado com Coomassie Blue (Nuclear) segundo Ausubel *et*

al. (1987) para a determinação do peso molecular e verificação do grau de purificação. Foi utilizado marcador de peso molecular entre 3 a 43 kD (Gibco).

A outra metade do gel foi lavada cinco vezes, por 10 minutos cada, com água destilada estéril e colocada sobre uma placa contendo uma fina camada de ágar TSA (Himedia). Sobre este foi vertida uma camada de ágar TSA (Himedia) semi-sólido (0,7% ágar, Himedia), previamente inoculado com a bactéria indicadora *L. innocua* ATCC 33090. A placa foi incubada por 18 horas a 37°C para observação de zonas de inibição.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração das bacteriocinas

Foram realizadas concentrações com clorofórmio dos dois sobrenadantes livres de células (A e B) obtidos do cultivo da cepa *Enterococcus mundtii* 115, realizados em datas diferentes, os quais foram denominados “Concentrado A” e “Concentrado B”. A atividade antimicrobiana dos concentrados de bacteriocinas A (Figura 2) e B foi quantificada através da técnica de difusão em poços e apresentaram 12800 UA/mL e 25600 UA/mL, respectivamente.

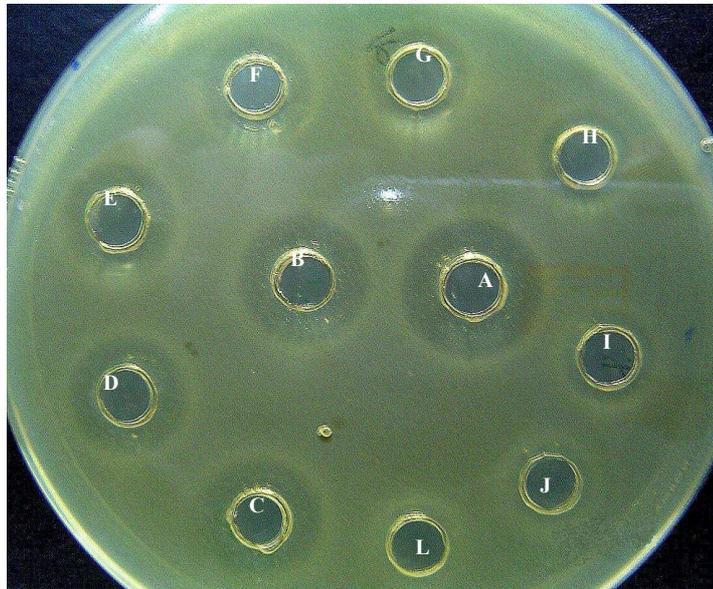


Figura 2: Concentrado A com atividade antimicrobiana de 12800 UA/mL . A (não diluída), B até L (diluições duplas 1:2 até 1:1024).

4.2 Estratégias de purificação das bacteriocina

4.2.1 Escolha da resina

O teste realizado para a escolha das resinas de troca iônica que foram utilizadas no trabalho demonstrou que a resina de troca catiônica SP-sepharose e a resina de troca aniônica DEAE-sepharose, foram as resinas que apresentaram frações eluídas com NaCl 1M, ou seja a fração ligada, com as maiores atividades antimicrobianas (Tabela 1).

Os sobrenadantes referentes à fração não-ligada, ou seja, o sobrenadante coletado após a aplicação do concentrado na resina, de todas as resinas foram testados e apresentaram atividade antimicrobiana.

Tabela 1: Resultado da atividade antimicrobiana dos eluídos das resinas de troca iônica no teste de escolha.

Resina	Atividade Antimicrobiana (UA/mL)
SP-sepharose	12800
CM-sepharose	6400
Q-sepharose	1600
DEAE-sepharose	6400

4.2.2 Cromatografia líquida em resina de gel filtração

A cromatografia em resina de gel filtração foi realizada com os dois concentrados (A e B) obtidos em diferentes datas. Após a aplicação da amostra, foi realizada a eluição de 7 mL de tampão referentes ao volume morto e foram eluídas 25 frações com 2 mL cada. A primeira fração eluída foi a que apresentou a maior atividade antimicrobiana com 1600 UA/mL (Concentrado A) e 3200 UA/mL (Concentrado B), a partir desta as frações apresentaram atividade menor que 200 UA/mL (concentrado A) e menor que 400 UA/mL

(concentrado B). A primeira fração também correspondeu ao maior pico de proteína, como pode ser observado no perfil de eluição (Figura 3), portanto esta primeira fração foi utilizada para a caracterização das bacteriocinas correspondentes a fração eluída da resina de gel filtração.

O perfil de eluição apresentado é a média da absorção em 280 nm e da atividade antimicrobiana das três cromatografias realizadas com o concentrado A, a fim de se obter o volume final de 6 mL de produto purificado, ou seja, três frações coletadas, uma em cada cromatografia. O perfil do concentrado B foi similar.

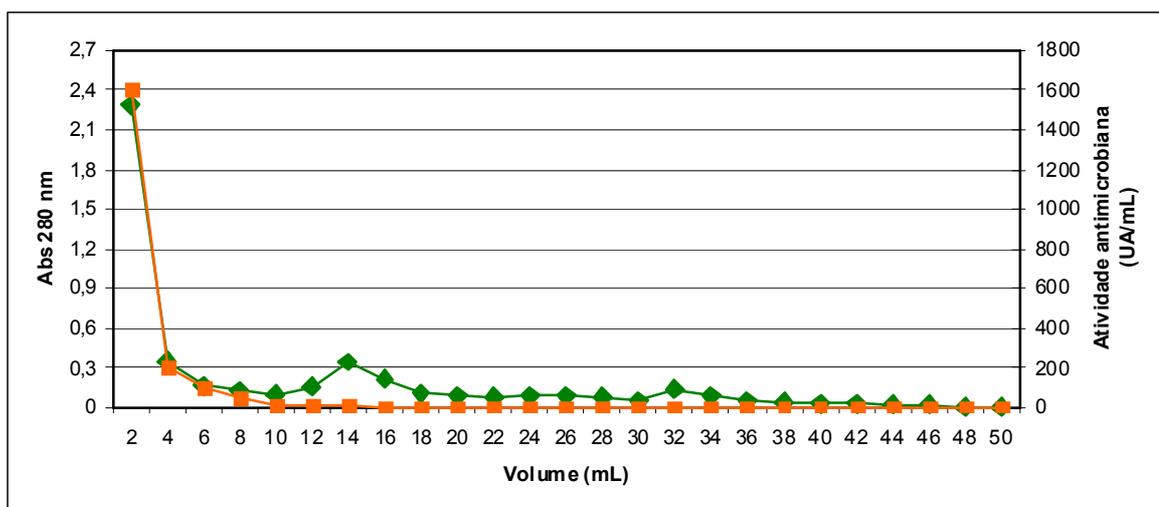


Figura 3: Perfil de eluição das frações coletadas da cromatografia em gel filtração. \blacklozenge = Abs 280 nm, \blacksquare = atividade antimicrobiana (UA/mL).

4.2.3 Cromatografia líquida em batelada com resina de troca catiônica e resina de troca aniônica

As cromatografias em resinas de troca catiônica e aniônica foram realizadas com os dois concentrados (A e B) obtidos em diferentes datas. As frações foram eluídas com seus respectivos tampões e diferentes intervalos de

concentrações de molaridade de NaCl (0,1 a 1 M), para estabelecer qual é o intervalo mais adequado para a eluição das bacteriocinas em cada uma das resinas de troca iônica.

As frações da resina de troca catiônica SP-sepharose que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram as eluídas com 0,8 M de NaCl (Tabela 2), ou seja, a maior parte das bacteriocinas foram eluídas em uma concentração de molaridade entre 0,5 e 0,8 M. Enquanto as frações da resina de troca aniônica DEAE-sepharose que apresentaram a maior atividade antimicrobiana foram eluídas com o tampão contendo 0,5 M de NaCl (Tabela 3), demonstrando que o intervalo entre 0,3 e 0,5 de molaridade é o melhor para eluir a maior parte das bacteriocinas desta resina.

Tabela 2: Resultado da atividade antimicrobiana (UA/mL) das frações eluídas da resina SP-sepharose com diferentes concentrações de molaridade de NaCl.

Molaridade	Atividade antimicrobiana do concentrado A (UA/mL)	Atividade antimicrobiana do concentrado B (UA/mL)
0,1	50	100
0,3	50	100
0,5	400	800
<u>0,8</u>	<u>800</u>	<u>1600</u>
1,0	400	800

Tabela 3: Resultado da atividade antimicrobiana (UA/mL) das frações eluídas da resina DEAE-sepharose com diferentes concentrações de molaridade de NaCl.

Molaridade	Atividade antimicrobiana do Concentrado A (UA/mL)	Atividade antimicrobiana do Concentrado B (UA/mL)
0,1	100	200
0,3	200	400
<u>0,5</u>	<u>1600</u>	<u>3200</u>
0,8	25	50
1,0	200	400

4.2.4 Etapas de purificação das cromatografias

As etapas de purificação das cromatografias realizadas a partir dos concentrados A e B foram bastante similares (Tabelas 4 e 5). Ocorreu um decréscimo da concentração protéica em todas as frações parcialmente purificadas, quando comparadas com a concentração protéica do sobrenadante livre de células e do concentrado de bacteriocinas. A atividade antimicrobiana recuperada também diminuiu ao longo das purificações, sendo que as frações eluídas da resina de troca catiônica SP-sepharose foram as que tiveram menor recuperação, obtendo-se 0,48% da atividade; e nas frações eluídas das resinas de troca aniônica DEAE-sepharose e gel filtração sephadex G-15 foi recuperada 0,96% da atividade. Mas ao verificar o aumento da atividade específica ou fator de recuperação, pode-se observar que a fração purificada que teve maior aumento foi justamente a obtida com a resina SP-sepharose, que aumentou em torno de 20 vezes a atividade, enquanto a fração da resina de troca aniônica DEAE-sepharose e de gel filtração sephadex G-15 aumentaram cerca de 11 e 0,9 vezes, respectivamente.

Tabela 4: Resultados das etapas de purificação das bacteriocinas produzidas por *E. mundtii* 115, a partir do sobrenadante A.

Frações	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (UA)	Atividade específica (UA/mg)	Fator de Purificação	Recuperação (%)
Sobrenadante A	2500	625	$1,0 \times 10^6$	1600	1,0	100
Concentrado A	7	49,5	$89,6 \times 10^3$	1810	1,13	8,96
G-15	6	6,5	$9,6 \times 10^3$	1477	0,93	0,96
SP	6	0,15	$4,8 \times 10^3$	32000	20	0,48
DEAE	6	0,53	$9,6 \times 10^3$	19200	11,3	0,96

Tabela 5: Resultados das etapas de purificação das bacteriocinas produzidas por *E. mundtii* 115, a partir do sobrenadante B.

Frações	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (UA)	Atividade específica (UA/mg)	Fator de Purificação	Recuperação (%)
Sobrenadante B	2500	1100	$2,0 \times 10^6$	1818	1,0	100
Concentrado B	7	95,8	$179,2 \times 10^3$	1871	1,03	8,96
G-15	6	12	$19,2 \times 10^3$	1600	0,88	0,96
SP	6	0,24	$9,6 \times 10^3$	40000	22	0,48
DEAE	6	0,88	$19,2 \times 10^3$	21818	12	0,96

4.3 Caracterização das bacteriocinas

4.3.1 Estabilidade dos concentrados e das frações parcialmente purificadas ao tratamento térmico

Os concentrados de bacteriocinas e as frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração foram aquecidos em diferentes temperaturas para verificar a estabilidade da atividade antimicrobiana quanto ao aquecimento.

Tanto os concentrados quanto as frações parcialmente purificadas foram considerados termoestáveis, pois mantiveram suas atividades residuais entre 100 e 92%, quando submetidos às temperaturas entre 50 e 100° C por 30 minutos. No tratamento à 121°C por 20 minutos, os concentrados e as frações das resinas sephadex G-15, SP-sepharose e DEAE-sepharose apresentaram

atividades residuais menores de 80%; 76,5%; 72% e 55%, respectivamente, demonstrando que a fração eluída pela resina DEAE-sepharose foi a mais instável ao aquecimento entre as frações parcialmente purificadas (Figura 4).

Os halos de inibição dos concentrados de bacteriocinas foram os que apresentaram maior tamanho em milímetros, enquanto os halos das frações parcialmente purificadas pela resina DEAE-sepharose foram os menores (Figura 5). Os valores dos dados apresentados nas figuras 4 e 5 são as médias das duplicatas. Pode-se observar uma tendência a diminuição da atividade residual e do tamanho dos halos de todas as amostras quando estas foram aquecidas a 121° C.

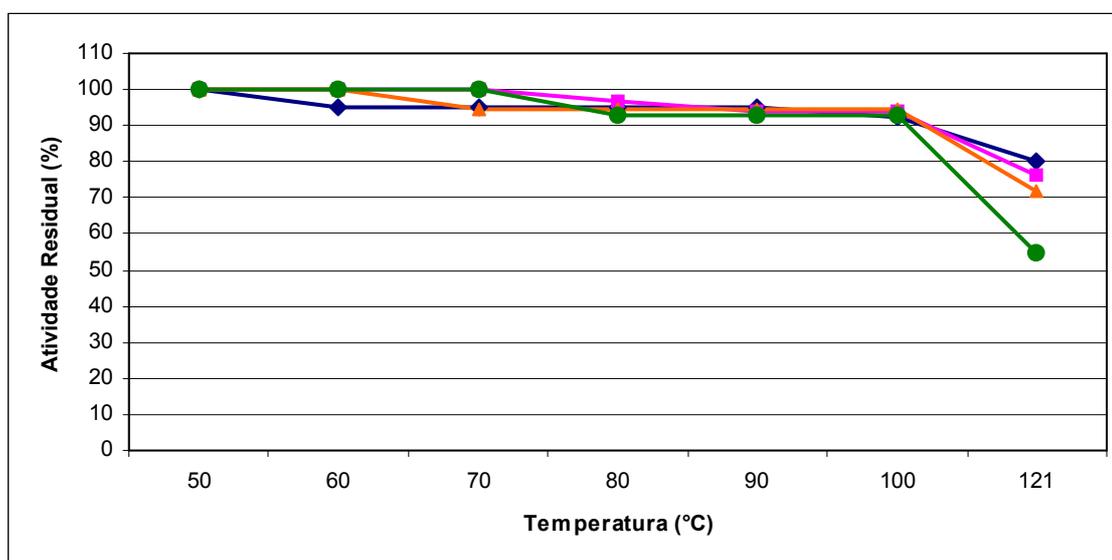


Figura 4: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana do concentrado de bacteriocinas e das frações parcialmente purificadas sob diferentes temperaturas, de acordo com a atividade residual ♦ = concentrado de bacteriocinas, ■ = fração G-15, ▲ = fração SP, ● = fração DEAE.

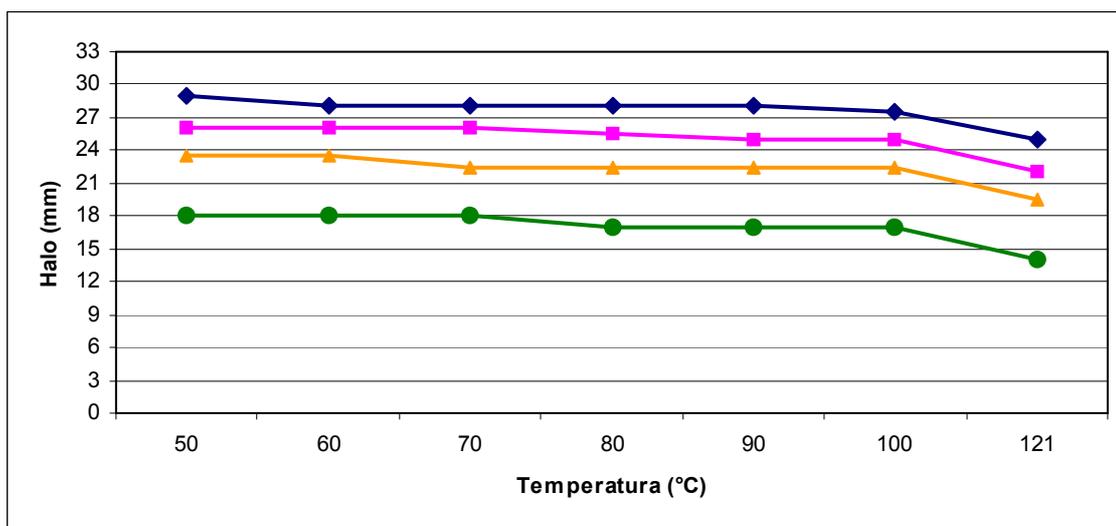


Figura 5: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana do concentrado de bacteriocinas e das parcialmente purificadas sob diferentes temperaturas, de acordo com o tamanho do halo (mm). ◆ = concentrado de bacteriocinas, ■ = fração G-15, ▲ = fração SP, ● = fração DEAE.

4.3.2 Estabilidade dos concentrados e das frações parcialmente purificadas à variação de pH

Os concentrados de bacteriocinas e as frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração foram incubados a 35°C por 2 horas, em banho-maria, com tampões com pHs entre 2 e 10.

Os concentrados e as frações eluídas da sephadex G-15 foram bastante estáveis à variação de pH, mantendo suas atividades residuais entre 95 e 87,5%. Enquanto as frações eluídas das resinas de troca iônica foram mais instáveis a variação do pH, observou-se uma tendência a diminuição da atividade residual destas frações quando incubadas em pH alcalino. A resina de troca catiônica SP-sepharose apresentou atividade de 64,5% nos pHs 9 e 10, e a resina de troca aniônica DEAE-sepharose manteve apenas 55% de sua atividade antimicrobiana quando incubada com o tampão pH 10. Todas as amostras apresentaram melhor estabilidade da atividade residual nos pHs

ácidos 2 a 5, sendo que as frações eluídas da resina DEAE-sepharose foi a mais estável, mantendo sua atividade entre 100 e 95% (Figura 6).

Assim como no tratamento com diferentes temperaturas, no tratamento com diferentes pHs os halos de inibição dos concentrados de bacteriocinas também foram os que apresentaram maior tamanho em milímetros, enquanto os halos das frações parcialmente purificadas pela resina DEAE-sepharose foram os menores (Figura 7).

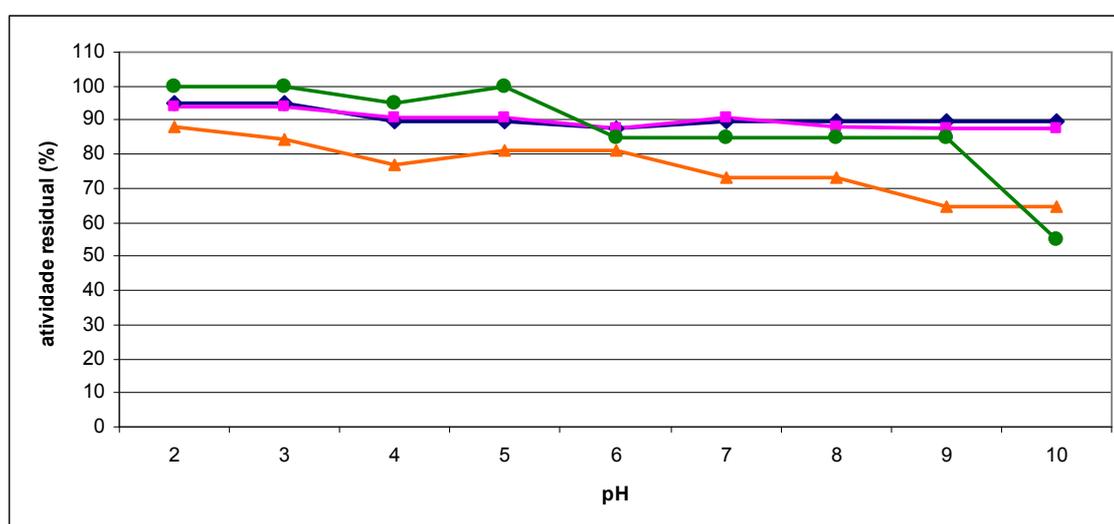


Figura 6: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana dos concentrados de bacteriocinas e das frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração sob diferentes valores de pH, de acordo com a atividade residual (%). ♦ = concentrado de bacteriocinas, ■ = fração G-15, ▲ = fração SP, ● = fração DEAE.

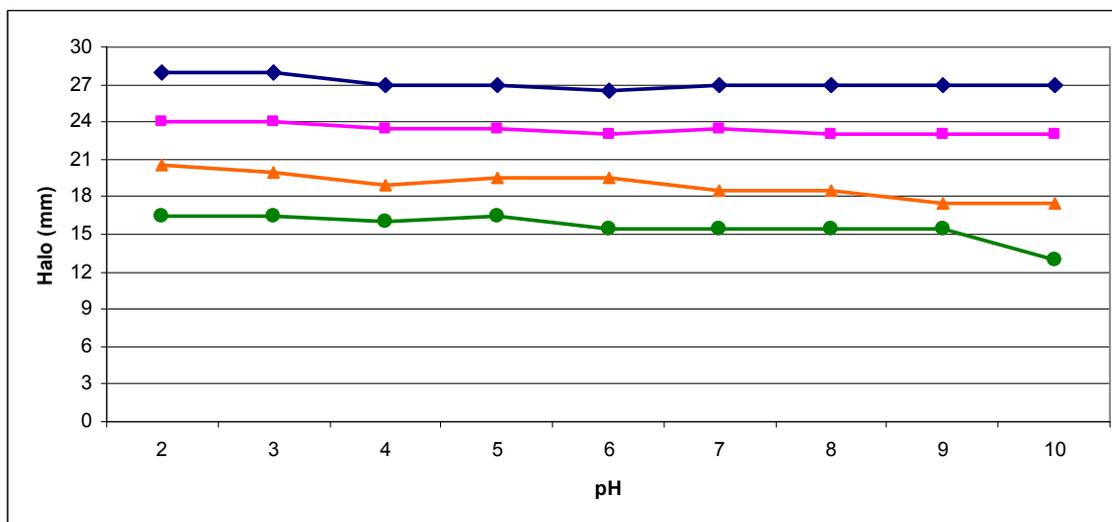


Figura 7: Resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana dos concentrados de bacteriocinas e das frações eluídas coletadas das resinas de troca iônica e de gel filtração sob diferentes valores de pH, de acordo com o tamanho do halo (mm). ◆ = concentrado de bacteriocinas, ■ = fração G-15, ▲ = fração SP, ● = fração DEAE.

4.3.4 Manutenção do espectro antimicrobiano

Para determinar se houve a manutenção do mesmo espectro antimicrobiano após a concentração e purificação das bacteriocinas do sobrenadante livre de células, foi realizado o teste de difusão em poços com as mesmas cepas que haviam sido utilizadas por Ferreira *et al.* (2007), e que foram testadas apenas com o sobrenadante livre de células.

Tanto os concentrados de bacteriocinas quanto as frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 e *Listeria innocua* ATCC 33090, mas perderam a atividade contra a *Salmonella enteritidis*.

4.3.5 Susceptibilidade a enzimas proteolíticas

Os concentrados de bacteriocinas e as frações parcialmente purificadas pelas resinas de troca iônica e de gel filtração foram tratados com as enzimas tripsina, proteinase K e lisozima para verificar a natureza protéica e polissacarídica das bacteriocinas. Após o tratamento, a atividade antimicrobiana das amostras tratadas foi verificada pela técnica de difusão em poços.

As proteases proteinase K e a tripsina, nas concentrações finais de 0,1 e 1mg/mL inativaram as bacteriocinas das frações parcialmente purificadas e diminuíram a atividade do concentrado, demonstrando a natureza protéica de todas as amostras. Os concentrados e as frações parcialmente purificadas foram resistentes à lisozima, o que demonstra que as bacteriocinas produzidas pela cepa *E. mundtii* 115 não requerem uma associação com moléculas de carboidratos para manter sua atividade antimicrobiana (Tabela 6).

Tabela 6: Resultado da atividade residual (%) obtidas após o tratamento enzimático do concentrado e das frações parcialmente purificadas.

Frações	Proteinase K 1 mg/mL	Proteinase K 0,1mg /mL	Tripsina 1 mg/mL	Tripsina 0,1mg /mL	Lisozima 1 mg/mL	Lisozima 0,1mg /mL
Concentrado	0	0	10	74	100	100
G-15	0	0	0	0	100	100
SP	0	0	0	0	100	100
DEAE	0	0	0	0	100	100

4.4 Determinação do peso molecular e grau de purificação

As frações parcialmente purificadas pelas resinas de troca iônica e de gel filtração foram concentradas com clorofórmio, a fim de aumentar a concentração protéica destas. Alíquotas do concentrado de bacteriocinas e

destas frações concentradas foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 18%, para verificar o peso molecular e o grau de purificação de cada uma das amostras.

O peso molecular foi de aproximadamente 3 kD em todas as amostras, de acordo com a zona de inibição no gel de atividade. Não foram observadas bandas de proteínas correspondentes a zona de inibição no gel corado com Coomassie blue (Figura 8).

Quanto ao grau de purificação observou-se que a fração mais pura, ou seja, a que apresentou menor número de bandas de proteínas, foi a eluída da resina de troca catiônica SP-sepharose, seguida da fração eluída da resina de troca aniônica DEAE-sepharose. A fração eluída da resina de gel filtração sephadex G-15 apresentou baixo grau de pureza, pois o padrão de bandas coradas no gel é muito similar ao padrão de bandas do concentrado.

Também se observou que foram coradas no gel bandas, da fração eluída da resina sephadex G-15, com peso molecular superior a 42 kD. A resina de gel filtração separa proteínas de acordo com o peso molecular, como a eluição das bacteriocinas ocorreu, em sua maioria, na primeira fração coletada da coluna e, nesta fração apareceram bandas de proteínas de peso molecular muito superior ao esperado para uma resina sephadex G-15, pode-se sugerir que as bacteriocinas estavam sendo eluídas no volume morto, ou muito próximas a ele, juntamente com outras proteínas de peso molecular mais alto.

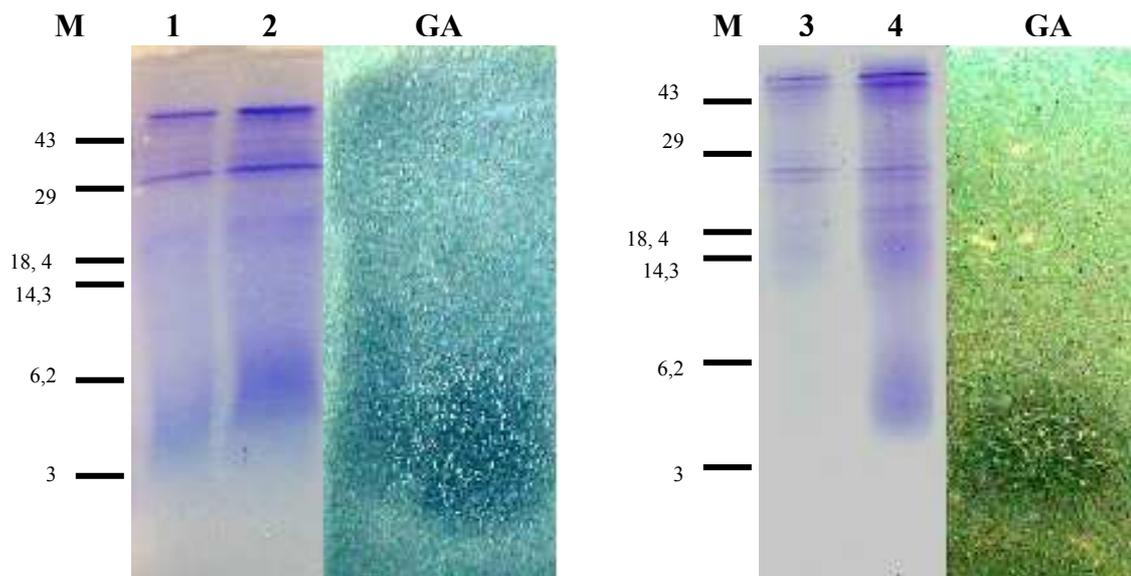


Figura 8. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com Coomassie blue e gel de atividade (GA). M: marcado de peso molecular, valores em kDa; Linha 1: concentrado de bacteriocinas; Linha 2: fração eluída da resina sephadex G-15; Linha 3: fração eluída da resina SP-sepharose; Linha 4: fração eluída da resina DEAE-sepharose.

5 DISCUSSÃO

As concentrações com clorofórmio realizadas dos sobrenadantes A e B, denominados concentrado A e B, apresentaram atividade antimicrobiana de 12800 AU/mL e 25600 UA/mL, respectivamente. Ferreira *et al.* (2007), quando realizaram o estudo da cepa *Enterococcus mundtii* 115, verificaram que esta cepa também apresentou uma variação quanto a atividade antimicrobiana quantificada em UA/mL, contra a mesma bactéria indicadora *Listeria innocua* 33090, em três sobrenadantes livres de células produzidos em datas diferentes, os quais foram quantificados entre 100 e 400 UA/mL.

Os métodos de extração de bacteriocinas podem ser baseados na sua afinidade a solventes orgânicos e na sua variação de solubilidade em soluções salinas concentradas, entre outros. O clorofórmio tem um índice de polaridade de 4,1 e a solubilidade em água é de apenas 0,815%, sendo considerado quase imiscível em água. Estas propriedades tornam o clorofórmio adequado para a concentração de bacteriocinas do meio de cultura, pois a interface entre o clorofórmio e o meio aquoso gera um ambiente ideal para a concentração de substâncias anfifílicas como as bacteriocinas. A mistura do sobrenadante da cultura com o clorofórmio permite a migração das bacteriocinas do meio aquoso para a camada interfacial (Burianek & Yousef *et al.*, 2000).

Outros autores também utilizaram a extração por clorofórmio para concentrar as bacteriocinas do sobrenadante livre de células. Park *et al.* (2003) usaram o clorofórmio para concentrar as bacteriocinas produzidas pela cepa de *Enterococcus faecium* JCM 5804 e Rai *et al.* (2009) usaram esta técnica para concentrar as bacteriocinas produzidas pela cepa isolada de curtumes *Enterococcus faecium* HAB01.

As resinas utilizadas neste trabalho foram: sephadex G-15, resina de gel filtração; SP-sepharose, resina de troca catiônica e DEAE-sepharose, resina de troca aniônica. As cromatografias destas resinas foram realizadas separadamente e as frações eluídas de cada uma puderam ser comparadas e caracterizadas. Poucos autores utilizam a resina de sephadex G-15 para purificação de bacteriocinas, provavelmente por esta ter uma faixa de separação muito pequena. Gibson & Wang (1994) utilizaram a resina para purificar compostos antimicrobianos produzidos por *Bifidobacterium infantis* e Anand *et al.* (1985) purificaram através da sephadex G-15 a bacteriocina Bifidina produzida por *Bifidobacterium bifidum*. Hou *et al.* (2007) purificaram um peptídeo antimicrobiano com peso molecular de 8 kD extraído de larvas de moscas, utilizando esta mesma resina. Quanto ao uso de resinas de troca iônica, a maioria dos estudos com bacteriocinas utilizam resinas catiônicas para realizar a purificação, em geral a SP-sepharose (Hata *et al.*, 2009; Izquierdo *et al.*, 2008; Line *et al.*, 2008). Mas alguns autores utilizaram DEAE-sepharose para purificação das bacteriocinas em seus trabalhos (Eraso & Inês, 2004; El-Shafie *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2007). Todos os autores utilizaram estas resinas como uma das etapas do processo total de purificação, nenhum

trabalho até o momento comparou o desempenho das cromatografias separadamente.

Não existem protocolos específicos e já determinados que possam ser realizados, sem riscos de ocorrerem situações imprevisíveis, para a purificação de bacteriocinas. Os protocolos de purificação, geralmente, são realizados na forma “tentativa e erro”, até que se estabeleçam passos a serem seguidos para a obtenção do peptídeo puro. O processo para a obtenção de uma bacteriocina altamente pura é bastante complexo e, geralmente, envolve várias etapas desde a concentração até o uso de diferentes cromatografias. A realização de apenas uma etapa após a concentração, dificilmente promove a purificação total de uma bacteriocina, mas utilizar diferentes cromatografias separadamente é muito útil no intuito de se obter informações sobre o desempenho de cada uma. Poder comparar o rendimento, o grau de purificação e a estabilidade em diferentes tratamentos, pode facilitar muito a escolha dos métodos cromatográficos no desenvolvimento de um protocolo que atinja os objetivos finais, sejam para a aplicação da bacteriocina na indústria ou para estudos futuros.

Neste trabalho foram realizadas cromatografias em batelada em resinas de troca iônica. A partir do estabelecimento de um intervalo de concentração de molaridade, para a eluição adequada das bacteriocinas, a cromatografia em resina de troca iônica, em forma de batelada, pode tornar o processo de purificação mais rápido e muito mais fácil, sendo desnecessário o uso de vários instrumentos específicos, quando comparado com a cromatografia em coluna,

já que após o valor do intervalo ser conhecido, podem-se realizar apenas duas eluições para se obter a bacteriocina parcialmente purificada.

Após a cromatografia em batelada das resinas de troca iônica, verificou-se que os sobrenadantes (fração não-ligada) apresentaram atividade antimicrobiana, o que sugere a presença de moléculas catiônicas e aniônicas. Já que a “fração não-ligada” coletada da resina catiônica SP-sepharose representa as moléculas com carga aniônica, e o contrário ocorre na “fração não-ligada” coletada da resina aniônica DEAE-sepharose. Como as frações eluídas (fração ligada) de cada resina de troca iônica apresentaram atividade antimicrobiana, pode-se sugerir que a cepa *E. mundtii* 115 produza bacteriocinas com peso molecular muito similar, de acordo com o resultado do gel SDS-PAGE, mas com cargas iônicas diferentes.

Várias bacteriocinas com grande potencial industrial têm sido purificadas e caracterizadas. Os resultados promissores destes estudos enfatizam a importante função que as cepas de BAL bacteriocinogênicas e funcionais podem representar na indústria de alimentos. Sendo utilizadas como culturas iniciadoras, culturas adjuntas ou biopreservantes, quando as bacteriocinas são adicionadas diretamente, melhorando a qualidade e segurança dos alimentos. No processo de purificação de bacteriocinas, do ponto de vista industrial, uma maior recuperação é mais vantajosa do que um fator de purificação maior. Em geral, a maior recuperação implica em um menor custo de produção e menor tempo de obtenção do produto. A nisina, que é a única bacteriocina liberada pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e utilizada como aditivo na indústria alimentícia, é aplicada nos alimentos como um concentrado

parcialmente purificado obtido do leite fermentado pela cepa produtora *Lactococcus lactis* (Gálvez *et al.*, 2008). Portanto, as bacteriocinas produzidas pela cepa *E. mundtii* 115 poderiam ser usadas na indústria apenas concentradas, já que a recuperação é maior quando comparada com a recuperação após a realização das cromatografias. Mas seria necessário utilizar outra técnica, pois apesar de o clorofórmio ser um solvente de baixo custo, ele também é extremamente tóxico e de difícil manuseio por ser muito volátil.

Quanto ao ponto de vista científico, um fator de purificação alto é muito importante, pois, geralmente, o objetivo é estudar a molécula, suas características bioquímicas e genéticas, possível toxicidade, desenvolver ensaios clínicos e testar novas aplicações e, para que isso seja possível é necessário um alto grau de purificação. As frações purificadas utilizando a resina catiônica SP-sepharose foram as que apresentaram maior fator de purificação, que foi em torno de 20 vezes, quando comparadas com as frações obtidas das outras resinas e dos concentrados.

Os concentrados e as frações parcialmente purificadas através das resinas de troca iônica e gel filtração foram aquecidos entre 50 e 121° C. As amostras demonstraram grande estabilidade térmica, mantendo até 92% de suas atividades antimicrobianas quando aquecidas por 30 minutos até 100° C, mas quando aquecidas a 121° C, mantiveram entre 80 e 55% de sua atividade, sendo que a fração eluída da resina DEAE-sepharose foi a mais instável. Uma das principais características das bacteriocinas produzidas por BAL é sua estabilidade a diferentes temperaturas, em geral todas se mantêm estáveis até

100 °C e podem perder mais da metade de sua atividade antimicrobiana quando aquecidas acima de 120 °C. A Enterocina SE-K4, produzida por *Enterococcus faecalis* K-4 (Eguchi *et al.*, 2001), manteve 100% de sua atividade em 60, 80 e 100 °C até 30 minutos, mas quando aquecida a 120 °C por 10 minutos sua atividade residual foi de apenas 25%. A Enterocina HJ35, produzida por *E. faecium* HJ35 (Yoon *et al.*, 2005), manteve 100% de sua atividade entre 40 e 100°C, mas ficou inativa quando incubada a 121 °C por 15 minutos. O mesmo aconteceu com a bacteriocina ST15, produzida por *E. mundtii* ST15 (Kwaadsteniet *et al.*, 2005), que foi estável por 90 minutos a 30, 60 e 100 °C, mas também perdeu sua atividade quando aquecida a 121°C por 20 minutos.

Essa estabilidade térmica confere uma grande vantagem no uso das bacteriocinas em alimentos que durante o processo de fabricação precisam ser aquecidos a altas temperaturas. Rouse & Van Sinderen (2008) destacam que durante a fabricação da cerveja, o mosto antes de ser fervido fica suscetível ao crescimento de bactérias Gram-positivas termofílicas. Mas, ao acrescentar bacteriocinas termoestáveis neste ponto da produção pode-se prevenir ou até eliminar o crescimento destes microrganismos, evitando problemas nos próximos estágios da fermentação.

Os concentrados e as frações parcialmente purificadas também foram incubados com tampões de diferentes pHs e apresentaram boa estabilidade, mas as bacteriocinas foram mais ativas na presença dos pHs ácidos 2 a 5. As frações eluídas das resinas SP-sepharose e DEAE-sepharose apresentaram grande diminuição da atividade residual nos pHs alcalinos 9 e 10, chegando a

manter 64,5 e 55% de suas atividades, respectivamente. A maioria das bacteriocinas é estável a variação de pH, sendo que muitas são mais ativas em pH baixo. As bacteriocinas produzidas por *Enterococcus faecium* isolado de queijo tunisiano (Ghraiiri *et al.*, 2005), foram estáveis em uma faixa de pH 2 a 10, mas sua atividade antimicrobiana foi mais alta quando incubada nos pH ácidos. A bacteriocina E 50-52, produzida por *E. faecium* E 50-52 (Svetoch *et al.*, 2008) foi incubada em tampões com pH entre 3 e 10 e foi inativada nos pH 9 e 10. Foulquié Moreno *et al.* (2003) isolaram e caracterizaram várias enterocinas de diferentes fontes e todas apresentaram maior atividade antimicrobiana quando incubadas com pHs ácidos, sugeriram que esta característica poderia estar envolvida com os valores de ponto isoelétrico (pI) de bacteriocinas, que geralmente fica entre 8 e 11, o que implica no aumento da solubilidade desses peptídeos a medida que o pH diminui. Existem outras características que explicariam o aumento da atividade antimicrobiana em pHs ácidos: poucas moléculas ficam adsorvidas às células, aumentando também o número de moléculas disponíveis e a interação das bacteriocinas com receptores de membrana podem ser inibidos na presença de pH alcalinos (Jack *et al.*, 1995).

Tanto os concentrados de bacteriocinas quanto as frações eluídas das resinas de troca iônica e de gel filtração apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 e *Listeria innocua* ATCC 33090, mas perderam a atividade contra a *Salmonella enteritidis*. Essa mudança no espectro, após a concentração e purificação das bacteriocinas, pode ter ocorrido por vários

motivos: o sobrenadante livre de células após concentração e purificação pode ter perdido alguma substância, que é diferente das bacteriocinas, e que estava inibindo o crescimento da *S. enteritidis* ou o que também pode ter ocorrido é que devido a cepa de *S. enteritidis*, utilizada para testar a manutenção do espectro antimicrobiano neste trabalho, não ter sido a mesma utilizada por Ferreira *et al.* (2007), a cepa utilizada anteriormente pertencia a coleção do DMIC (Departamento de Microbiologia – UFRGS) e não pôde ser recuperada durante os novos experimentos. Possivelmente, esta cepa diferente de *S. enteritidis* é resistente as bacteriocinas produzidas por *E. mundtii* 115. Algumas cepas de uma mesma espécie de bactéria podem apresentar resistência a determinadas bacteriocinas enquanto outras cepas são sensíveis. As cepas de *Listeria* sp., como a *L. monocytogenes* V7 e a *L. innocua* LB1, foram descritas como resistentes às bacteriocinas Enterocina A, Mesentericina Y105, Divercina V41 e Pediocina AchH, que pertencem a classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000). Vadyvaloo *et al.* (2004) e Calves *et al.* (2008) encontraram mudanças em subunidades do sistema fosfotransferase de cepas de *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* resistentes a Divercina V41.

As bacteriocinas produzidas por *E. mundtii* 115 possuem atividade antimicrobiana contra o gênero *Listeria*, assim como as bacteriocinas da classe IIa, que tem como principal característica a atividade anti-listerial, e muitas enterocinas já caracterizadas pertencem a esta classe. As bacteriocinas com largo espectro antimicrobiano podem ser vistas como biopreservantes melhores para o uso na conservação de alimentos, mas sob determinadas condições, bacteriocinas com estreito espectro antimicrobiano podem ser mais

indicadas para a conservação. Como a Sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1994), que possui um espectro limitado contra BAL, mas é muito efetiva contra *L. monocytogenes*, podendo ser aplicada em produtos fermentados por BAL e que tendem a ser contaminados por bactérias do gênero *Listeria*.

Por definição, as bacteriocinas são inativadas por pelo menos um tipo de protease (Minamikawa *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana dos concentrados foi diminuída e das frações parcialmente purificadas foi inativada após o tratamento com as proteases proteinase K e tripsina, e não foi alterada após o tratamento com a lisozima. Estes resultados demonstraram a característica protéica das amostras e que não existem associações com moléculas de carboidratos nas bacteriocinas. Outros trabalhos obtiveram resultados similares, como a Bacteriocina E 50-52 (Svetoch *et al.*, 2008), produzida por *Enterococcus faecium*, a Enterocina E-760 (Line *et al.*, 2008), produzida por *E. durans*, e a Enterocina MR99 (Sparo *et al.*, 2006), produzida por *E. faecalis*, que foram degradadas por beta-quimiotripsina, proteinase K e papaína, mas foram resistentes a lisozima e lipase. Algumas bacteriocinas podem ser sensíveis a lisozima, como a Bacteriocina N15, produzida por *E. faecium* N15 (Losteinkit *et al.*, 2001), o que sugere que a atividade antimicrobiana desta bacteriocina depende de moléculas de carboidratos.

O peso molecular das bacteriocinas em todas as amostras foi de aproximadamente 3 kD. Entre as enterocinas melhor caracterizadas até o momento, a maioria pertence a classe IIa e apresentam um peso molecular de 3 a 6 kD. Não foram observadas bandas de proteínas correspondentes as bacteriocinas, isto pode ter acontecido devido à baixa concentração destas nas

amostras, não sendo possível corar as bandas com o corante Coomassie blue, que tem poder de detecção a partir de 100 ng de proteína.

A fração eluída da resina sephadex G-15 continha proteínas de peso molecular muito maior que o peso das bacteriocinas, demonstrando a possibilidade das bacteriocinas estarem sendo eluídas da coluna no volume morto. Algumas bacteriocinas podem permanecer como agregados com alto peso molecular, em torno de 30 a 300 kD, quando estão no seu estado natural. Estes agregados acabam induzindo a determinação errada do peso molecular durante as purificações com resinas de gel filtração. Isso geralmente acontece com bacteriocinas apolares e de baixo peso molecular, que interagem com material extracelular de células lisadas, como debris da parede celular e micelas dos ácidos lipoteicóicos, e com outros compostos apolares do meio de cultura (Cintas *et al.*, 2001). Estes agregados também podem estar associados com a natureza hidrofóbica dos peptídeos (Oscáriz & Pisabarro, 2000).

Através do gel de poliacrilamida pôde ser verificado o grau de pureza das amostras parcialmente purificadas. De acordo com o número de bandas, a fração eluída da resina SP-sepharose foi a que apresentou maior grau de pureza e a resina sephadex G-15 apresentou o menor grau, pois o padrão de bandas foi quase igual ao do concentrado de bacteriocinas. Estes resultados demonstram que utilizar a resina sephadex G-15 como primeira etapa, no desenvolvimento de um protocolo de purificação, não é vantajoso, visto que não ocorre uma boa separação das bacteriocinas produzidas pela cepa *E. mundtii* 115, o ideal seria utilizar esta resina como segunda etapa. Enquanto a resina SP-sepharose poderia ser utilizada como primeira etapa, já

que a separação da bacteriocina de outras proteínas contaminantes foi maior que as outras resinas testadas.

6 CONCLUSÕES

1 – As bacteriocinas produzidas por *Enterococcus mundtii* 115 se ligam a resinas de troca catiônica e aniônica, sugerindo que sejam produzidas diferentes bacteriocinas com carga positiva e com carga negativa, mas com peso molecular similar.

2 – As cromatografias em batelada podem ser utilizadas para purificação parcial de bacteriocinas, tornando essa etapa mais rápida e fácil durante o processo de purificação.

3 – Os concentrados e as bacteriocinas parcialmente purificadas foram estáveis ao tratamento térmico entre 50 e 100° C e apresentaram maior atividade antimicrobiana quando incubados em pH ácido.

4 – Os concentrados e as bacteriocinas parcialmente purificadas foram suscetíveis à ação de proteases e resistentes a lisozima, demonstrando a natureza protéica e que não há associações com moléculas de carboidratos relacionadas a atividade antimicrobiana.

5 – Com base nos resultados obtidos foi possível comparar o desempenho das resinas:

- Verificou-se que as frações parcialmente purificadas com a resina SP-sepharose foram as que apresentaram maior grau de

purificação, maior fator de purificação e menor recuperação da atividade.

- As frações parcialmente purificadas com a resina DEAE-sepharose foram as que apresentaram maior instabilidade ao aquecimento a 121° C e quando incubadas em pH 10, mas demonstraram a maior estabilidade nos pHs 2 a 5.

- As frações parcialmente purificadas com a resina sephadex G-15 foram as que apresentaram menor grau de purificação, menor fator de purificação, maior recuperação da atividade, melhor estabilidade térmica e melhor estabilidade a variação de pH, provavelmente, devido a semelhança do seu perfil protéico (SDS-PAGE) ao do concentrado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das bacteriocinas tem muito a nos oferecer, pois o uso destas em diferentes aplicações pode ser infinita. Muitos estudos já realizados demonstram a aplicabilidade em diversos tipos de alimentos, o que talvez falte ainda é a interação da indústria com o meio acadêmico.

A partir dos resultados deste trabalho, podem ser desenvolvidos protocolos para a purificação total, seqüenciamento dos aminoácidos e ponto isoelétrico das bacteriocinas produzidas pela cepa *E. mundtii* 115 e a aplicação tanto da cepa quanto das bacteriocinas concentradas em alimentos. Ainda poderiam ser realizados testes de toxicidade e citotoxicidade, otimização da produção, escalonamento para produção industrial e novas aplicações.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R. Safety of industrial lactic acid bacteria. **J Biotechnol**, Amsterdam, v. 68, p. 171 - 178, 1999.

ALMEIDA, M.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Bioteconlog Cienc Desenvolv**, Brasília, v. 24, p.30 – 35, 2002.

ANAND, S.K.; SRINIVASAN, R.A.; RAO, L.K. Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-II. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 2, p. 21 – 23, 1985.

ANDREWES, F.; HORDER, T. A study of the estreptococos pathogenic for man. **Lancet**, p. 708–713, 1906.

AUSUBEL, F. *et al.* **Curr prot mol biol**. New York: John Wiley Sons, v. 2, 1987.

AYMERICH, T.; HOLO, H.; HAVARSTEIN, L.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; NES, I.. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 62, p. 1676 – 1682, 1996.

BEAULIEU, L.; AOMARI, H.; GROLEAU, D.; SUBIRADE, M. An improved and simplified method for the large-scale purification of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici*. **Biotechnol Appl Biochem**, San Diego, v. 43, p. 77 – 84, 2006.

BENNIK, M.; VANLOO, B.; BRASSEUR, R.; GORRIS, L.; SMID, E. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. **Biochem Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1373, p. 47 – 58, 1998.

BHUNIA, A.; JOHNSON, M.; RAY, B. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v. 65, p. 261 – 268, 1988.

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

BURIANEK, L.; YOUSEF, A. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. **Let App Microbiol**, Oxford, v. 31, p. 193 – 197, 2000.

CALLEWART, R.; HUGAS, M.; DE VUYST, L. Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococcus* in the production of spanish-style dry fermented sausages. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 57, p. 33– 42, 2000.

CALVEZ, S.; PRÉVOST, H.; DRIDER, D. Identification of a new molecular target of class IIa bacteriocins in *Listeria monocytogenes* EGDe. **Folia Microbiol**, Praga, v. 53, p. 417 – 422, 2008.

CAMPOS, C.A.; RODRÍGUEZ, O.; CALO-MATA, P.; PRADO, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Res Int**, Ottawa, v. 39, p. 356 – 364, 2006.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey Critical. **Crit Rev Microbiol**, Boca Raton, v. 28(4), P.281–370, 2002.

CASSAUS, P.; NILSEN, T.; CINTAS, L.; NES, I.; HERNANDEZ, P.; HOLO, H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiology**, Reading, v. 143, p. 2287–2294, 1997.

CHEN, P.; QI, F. X.; NOVAK, J.; KRULL, R. E.; CAUFIELD, P. W. Effect of amino acid substitutions in conserved residues in the leader peptide on biosynthesis of the lantibiotic mutacin II. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 195, p. 139 – 144, 2001.

CHINACHOTI, N.; MATSUAKI, H.; SONOMOTO, K.; ISHIKAZI, A. Utilization of xylose as an alternative carbon source for nisin Z produced by *Lactococcus lactis* I0-1. **J Fac Agric Kyushu Univ**, Fukuoka, v. 42, p. 171 – 181, 1997.

CINTAS, L.; CASSAUS, P.; HAVERSTEIN, L.; HERNANDEZ, P.; NES, I.. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel secdependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 63, p. 4321–4330, 1997.

CINTAS, L.; CASAUS, P.; HOLO, H.; HERNANDEZ, P.; NES, I.; HÅVARSTEIN, L. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. **J Bacteriol**, Washington, v. 180, p. 1988 – 1994, 1998.

CINTAS, L. M.; HERRANZ, C.; HERNÁNDEZ, P. E.; CASAUS, M. P.; NES, L. F. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Sci Tech Int**, v. 7, p. 281 – 305, 2001.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.; NES, I.; CHIKINDAS, M. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 71, p. 1 – 20, 2001.

COAKLEY, M.; FITZGERALD, G.; ROS, R. P. Application and evaluation of the phage resistance and bacteriocin encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 63, p. 1434-1440, 1997.

COETZEE, J.; TODOROV, S.; GÖRGENS, J.; DICKS, L. Increased production of bacteriocin ST4SA by *Enterococcus mundtii* ST4SA in modified corn steep liquor. **Ann Microbiol**, Milão, v. 57, p. 617 – 622, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Unicamp, Campinas, 1997, 279 p.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing in innate immunity for food. **Nat Rev Microbiol**, Londres, v. 3, p. 777-88, 2005.

CRAIK, D. J. Prefácio. **Curr Prot Pept Sci**, Amsterdam, v. 5, 2004.

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

DEEGAN, L.; COTTER, P.; HILL, C.; ROSS, P.; Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Int Dairy J**, Barking, v. 16, p. 1058 – 1071, 2006.

DEZWAAN, D.; MEQUIO, M.; LITTELL, J.; ALLEN, J.; ROSSBACH, S.; PYBUS, V.; Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. **Microb Ecol Health Dis**, Londres, v.19, p. 241 – 250, 2007.

DIEP, D. B. & NES, I. F.; Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. **Curr Drug Targets**, Hilversum, v. 3, p. 107 – 122, 2002.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W.; Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.88, p. 147 – 164, 2003.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L.M.; PRÉVOST, H.. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiol Mol Biol Rev**, Washington, v. 70, p. 564 – 582, 2006.

EGUCHI, T.; KAMINAKA, K.; SHIMA, J.; KAWAMOTO, S.; MORI, K.; CHOI, S.; DOI, K.; OHMOMO, S.; OGATA, S.; Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. **Biosci Biotechnol Biochem**, Tóquio, v.65, p. 247-53, 2001.

EL-SHAFIE, H.; IBRAHIM, N.; ABD EL-SABOUR, H.; MOSTAFA, Y. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by Isolated Strain of *Lactococcus lactis*. **J Appl Sci Res**, Faisalabad, v. 4, p. 1315 – 1321, 2008.

ENNAHAR. S.; DESCHAMPS, N.; RICHARD, J.; Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. **Current Microbiol**, Nova York, v. 41, p. 1 – 4, 2000.

ERASO, A. J. & INÊS, A.; Bacteriocin of *Enterococcus* from lactoserum able to cause oxidative stress in *Staphylococcus aureus*. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego, v. 314, p. 897 – 901, 2004.

FAITH, M. J.; SKVIRSKY, R.; GILSON, L.; MAHANTY, H. K.; KOLTER, R.; The secretion of colicin V. **Bacteriocins, microcins, and lantibiotics**, R. James, C. Lazdunski, and F. Pattus (ed.), Springer-Verlag, New York, p. 331–348, 1992.

FERREIRA, A.; CANAL, N.; MORALES, FUENTEFRIA, D.; CORÇÃO, G. Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans feces. **Braz arch biol technol**, São Paulo, vol.50, pp. 249-258, 2007.

FLEURY, Y.; DAYEM, M.A.; MONTAGNE, J.J.; CHABOISSEAU, E.; LE CAER, J.P.; NICOLAS, P.; DELFOUR, A. Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. **J Biol Chem**, v. 271, p. 14421 – 14429, 1996.

FOLLI, C.; RAMAZZINA, I.; ARCIDIACO, P.; STOPPINI, M.; BERNI, R.; Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 221, p. 143–149, 2003.

FOULQUIÉ MORENO, M.; LEISNER, J.; TEE, L.; RADU, S.; RUSUL, G.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 92, p. 147– 157, 2002.

FOULQUIÉ MORENO, M.; CALLEWAERT, R.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; DE VUYST, L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 94, p. 214 – 29, 2003.

FOULQUIÉ MORENO, M.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 106, p 1 – 24, 2006.

FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W.; STILES, M. Enterococos at the crossroads of food safety. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 47, p. 1 – 24, 1999.

FRANZ, C.; STILES, M.; SCHLEIFER, K.; HOZAPFEL, W.; Enterococos in foods – a conundrum for food safety. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 88, p. 105–122, 2003.

FUENTEFRIA, D.; Caracterização molecular de isolados de *Enterococcus* sp. através da amplificação e clivagem da região intergênica 16S – 23S do rRNA. **Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.**

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B.; Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 120, p. 51 – 70, 2007.

GALVEZ, A.; LOPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR N.B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Crit Rev Biotechnol**, Boca Raton, v. 28, p. 125 – 152, 2008.

GHRAIRI, T.; FRÈRE, J.; BERJEAUD, J.; MANAI, M.; Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 105, p. 389 – 98, 2005.

GIBSON, G.R. & WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J Appl Bacteriol**, v. 77, p. 412 – 420, 1994.

GILLOR, O.; NIGRO, L. M.; RILEY, M. A.; Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. **Curr Pharm Des**, Schiphol, v. 11, p. 1067 – 1075, 2005.

GILMORE, M.; SEGARRA, R.; BOOTH, M.; BOGIE, Ch.; HALL, L.; CLEWELL, D.; Genetic structure of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. **J Bacteriol**, Washington, v. 176, p. 7335 – 7344, 1994.

GIRAFFA, G.; Functionality of enterococos in dairy products. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 88, p. 215 – 222, 2003.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANE, E.; Enterococos isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **J Food Prot**, Ames, v. 60, p. 732– 738, 1997.

GRATIA, A. ; Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. **C R Seances Soc Biol Fil**, Masson, v. 93, p. 1040 –1041, 1925.

GUYONNET, D.; FREMAUX, C.; CENATIEMPO, Y.; BERJEAUD, JM. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p.1744 – 1748, 2000.

HAACK, S. K.; DURIS, J. W.; FOGARTY, L. R.; KOLPIN, D. W.; FOCAZIO M. J.; FURLONG E. T.; MEYER, M. T.; Comparing wastewater chemicals, indicator bacteria concentrations, and bacterial pathogen genes as fecal pollution indicators. **J Environ Qual**, Madison, v. 38 p. 248 – 58, 2009.

HATA, T.; ALEMU, M.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, C.; NITISINPRASERT, S.; OHMOMO, S. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* N1-33 and its application as a food preservative. **J Food Prot**, Ames, v.72, p. 524 – 530, 2009.

HAUGE, H. H.; MANTZILAS, D.; MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J.; EIJSINK, V. G. et al.; Plantaricin A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. **Biochemistry**, Washington, v. 37, p. 16026 – 16032, 1998.

HERRANZ, C.; MUKHOPADHYAY, S.; CASSAUS, P.; MARTINEZ, J.; RODRIGUEZ, J.; NES, I.; CINTAS, L.; HERNANDEZ, P. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. **Cur Microbiol**, New York, v. 39, p. 282– 290, 1999.

HO, P.L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.; SILVA, A.R.; Ramos, C.R.; Nascimento, A. A arte de purificar proteínas: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biotecnolog Cienc Desenvol**, Brasília, v. 3, p. 24 – 26, 2000.

HOLO, H.; JEKNIC, Z.; DAESCHEL, M.; STEVANOVIC, S.; NES, I.; Planaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two peptide lantibiotics. **Microbiology**, Washington, v. 147, p. 643 – 651, 2001.

HOU, L.; SHI, Y.; ZHAI, P.; LE, G. Inhibition of foodborne pathogens by Hf-1, a novel antibacterial peptide from the larvae of the housefly (*Musca domestica*) in medium and orange juice. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 1350 – 1357, 2007.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M. Functionality of enterococci in meat products. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 88, p. 223 – 233, 2003.

INOUE, T.; TOMITA, H.; IKE, Y. Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 50, p. 1202 – 1212, 2006.

IRVINE, G. B. Size-exclusion high performance liquid chromatography of peptides— a review. **Anal Chim Acta**, Amsterdam, v. 352, p. 387–397, 1997.

IZQUIERDO, E.; BEDNARCZYK, A.; SCHAEFFER, C.; CAI, Y.; MARCHIONI, E.; VAN DORSSELAER, A.; ENNAHAR, S. Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 52, p. 1917 –1923, 2008.

IZQUIERDO, E.; CAI, Y.; MARCHIONI, E.; ENNAHAR, S. Genetic identification of the bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* IT62 and evidence that bacteriocin 32 is identical to enterocin IT. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 53, p. 1907 – 1911, 2009.

JACK, R.; TAGG, J.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol Rev**, Washington, v. 59, p. 171–200, 1995.

JENNES, W.; DICKS, L.M.T.; VERWOERD, D.J.; Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 88, p. 349 – 357, 2000.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococcos. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 7, p. 462– 478, 1994.

JOOSTEN, H.; NUÑEZ, M.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; MARUGG, J. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocina produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 62, p. 4220– 4223, 1996.

KALMOKOFF, M.L.; CYR, T.D.; HEFFORD, M.A.; WHITFORD, M.F.; TEATHER, R.M. Butyrivibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. **Can J Microbiol**, Ottawa, v. 49, p. 763 – 773, 2003.

KANG, B.S.; SEO, J.G.; LEE, G.S.; KIM, J.H.; KIM, S.Y.; HAN, Y.W.; KANG, H.; KIM, H.O.; RHEE, J.H.; CHUNG, M.J.; PARK, Y.M. .Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. **J Microbiol**, Seoul, v. 47, p. 101 – 109, 2009.

KAWAI, Y.; KEMPERMAN, R.; KOK, J.; SAITO, T. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. **Curr Prot Pept Sci**, Hilversum, v. 5, p. 393 – 398, 2004^a.

KAWAI, Y.; ISHII, Y.; ARAKAWA, K.; UEMURA, K.; SAITOH, B.; NISHIMURA, J.; KITAZAWA, H.; YAMAZAKI, Y.; TATENNO, Y.; ITOH, T.; SAITO, T. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 70, p. 2906 – 2911, 2004^o.

KAWAMOTO, S.; SHIMA, J.; SATO, R.; EGUCHI, T.; OHMOMO, S.; SHIBATO, J.; HORIKOSHI, N.; TAKESHITA, K. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 68, p. 3830 – 3840, 2002.

KAWULKA, K.; SPRULES, T.; DIAPER, C.M.; WHITTAL, R.M.; MCKAY, R.T.; MERCIER, P.; ZUBER, P.; VEDERAS, J.C. Structure of subtilosin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to R-carbon cross-links: formation and reduction of R-thio-R-amino acid derivatives. **Biochemistry**, Washington, v. 43, p. 3385 – 3395, 2004.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococcos from the medical point of view. **International Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 88, p. 255– 262, 2003.

KEMPERMAN, R.; KUIPERS, A.; KARSENS, H.; NAUTA, A.; KUIPERS, O.; KOK, J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 69, p. 1589 – 1597, 2003.

KJEMS, E. Studies on streptococcal bacteriophages: I. Techniques for isolating phage producing strains. **Pathology and Microbiology Scandinavia**, Oslo, v. 36, p. 433– 440, 1955.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, Amsterdam, v.12, p. 39–86, 1993.

KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol**, Londres, v. 14, p. 232–237, 2003.

KWAADSTENIET, M.; TODOROV, S.D.; KNOETZE, H.; DICKS, L.M.T. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 105, p. 433– 444, 2005.

KYOUNG-SIK, H.; YOUNGHOON, K.; SAE-HUN, K.; SEJONG, O. Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. **J Microbiol Biotechnol**, Seoul, v. 17, p. 774 – 783, 2007.

LAUKOVA, A.; CZIKKOVA, S. The use of enterocin CCM 4231 in soymilk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 87, p. 182–186, 1999.

LAUKOVA, A.; CZIKKOVA, S.; DOBRANSKY, T.; BURDOVA, O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiol**, Londres, v. 16, p. 93– 99, 1999.

LEE, K.H.; PARK, J.Y.; JEONG, S.J.; KWON, G.H.; LEE, H.J.; CHANG, H.C.; CHUNG, D.K.; LEE, J.H.; KIM, J.H. Characterization of paraplantarin C7, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paraplanarum* C7 isolated from kimchi. **J Microbiol Biotechnol**, Seoul, v. 17, p.287 – 296, 2007.

LEER, R.J.; VAN DER VOSSSEN, J.M.; VAN GIEZEN M.; VAN NOORT, J.M.; POUWELS, P.H. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Microbiol**, Washington, v. 141, p. 1629 – 1635, 1995.

LEWUS, C.; SUN, S.; MONTVILLE, T. Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. **Appl environ microbiol**, Washington, v. 58, p. 143-149, 1992.

LINE, J.; SVETICH, E.; ERUSLANOV, B.; PERELYGIN, V.; MITSEVICH, E.; MITSEVICH, I.; LEVCHUK, V.; SVETICH, O.; SEAL, B.; SIRAGUSA, G.; STERN, N. Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 52, p. 1094-1100, 2008.

LÓPEZ, R.; GARCÍA, M.T.; ABRIOUEL, H.; BEN OMAR, N.; GRANDE, M.J.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A. Semi-preparative scale purification of enterococcal bacteriocin enterocin EJ97, and evaluation of substrates for its production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, Houndmills, v. 34, p. 779 – 785, 2007.

LOSTEINKIT, C.; UCHIYAMA, K.; OCHI, S.; TAKAOKA, T.; NAGAHISA, K.; SHIOYA, S. Characterization of Bacteriocin N15 Produced by *Enterococcus faecium* N15 and Cloning of the Related Genes. **J Biosci Bioeng**, Osaka, v. 91, p. 390 – 395, 2001.

MAISNIER-PATIN,S.; FORNI, E.; RICHARD, J. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcosin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 30, p. 255– 270, 1996.

MALDONADO, A.; RUIZ-BARBA, J.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 69, p. 383 - 389, 2003.

MAQUEDA, M.; GÁLVEZ, A.; SÁNCHEZ-BARRENA, M.J.; GONZÁLEZ, C.; ALBERT, A.; RICO, M.; VALDIVIA, E. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. **Curr Prot Pept Sci**, Hilversum, v. 5, p. 399 – 416, 2004.

MAREKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; SKAUGEN, M.; NES, I. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. **J Ind Microbiol Biotechnol**, Houndmills, v. 34, p. 533 – 537, 2007.

MARTEAU, P.R.; DE VRESE, M.; CELLIER, C.; SCHREZENMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 73, p. 430–436, 2001.

MARX, R.; STEIN, T.; ENTIAN, K.D.; GLASER, S.J. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by 1H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Protein Chem**, New York, v. 20, p. 501 – 506, 2001.

MATÍNEZ-BUENO, M., MAQUEDA, M.; GÁLVEZ, A.; SAMYN, B.; VAN BEEUMEN, J.; COYETTE, J. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. **J Bacteriol**, Washington, v. 176, p. 6334– 6339, 1994.

MATSUAKI, H.; ENDO, N.; SONOMOTO, K.; ISHIKAZI, A. Lantibiotic nisin Z fermentaire product by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between product of the lantibiotic and Lactate and all growth. **Appl Microbiol Biotechnol**, Berlin, v. 45, p. 36 – 40, 1996.

MINAMIKAWA, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; YAMAZAKI, K. Purification and Characterization of Warnericin RB4, Anti-Alicyclobacillus Bacteriocin, Produced by *Staphylococcus warneri* RB4. **Curr Microbiol**, Nova York, v. 51, p. 22 – 26, 2005.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **J Dig Dis**, Carlton, v. 9, p. 190 – 198, 2008.

MOTTA, A.S.; LORENZINI, D.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin. **Curr Microbiol**, Nova York, v. 54, p. 282 – 286, 2007.

NES, I. F., DIEP, D. B., HOLO, H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **J Bacteriol**, Washington, v. 189, p. 1189 – 98, 2007.

NILSEN, T.; NES, I.; HOLO, H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. **App Environ Microbiol**, Washington, v. 69, p. 2975–2984, 2003.

OHMOMO, S.; MURATA, S.; KATAYAMA, N.; NITISINPRASART, S.; KOBAYASHI, M.; NAKAJIMA, T.; YAJIMA, M.; NAKANISHI, K. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 88, p. 81–89, 2000.

OSCÁRIZ, J.C.; PISABARRO, A.G. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 89, p. 361 – 369, 2000.

O’SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Paris, v. 84, p. 593-604, 2002.

OTT, E.M.; MÜLLER, T.; MÜLLER, M.; FRANZ, C.M.A.P.; ULRICH, A.; GABEL, M.; SEYFARTH, W. Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 91, p. 54–66, 2001.

PARK, S.H.; ITOH, K.; FUJISAWA, T.; Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. **J App Microbiol**, Oxford, v. 95, p. 294 – 300, 2003.

PASTEUR, L.; JOUBERT, J. F. Charbon et septicémie. **C R Seances Soc Biol Fil**, Masson, v. 85, p. 101–115, 1877.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B.V.; **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1º ed., Ed. Manole LTDA, Barueri/SP, 2005, p. 456.

PINGITORE, E.; SALVUCCI, E.; SESMA, F.; NADER-MACIAS M. E. **Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB)**. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Editor: A. Méndez-Vilas, vol. 2, 2007, p. 557 – 568.

POLLMAN, B. Transporters and their roles in LAB cell physiology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 82, p. 147–164, 2002.

PRILASSNIG, M.; WENISCH, C.; DAXBOECK, F.; FEIERL, G. Are probiotics detectable in human feces after oral uptake by healthy volunteers? **Wien Klin Wochenschr**, Viena, v. 119, p. 456 – 462, 2007.

RAI, A.K.; BHASKAR, N.; HALAMI, P.M.; INDIRANI, K.; SURESH, P.V.; Mahendrakar, N.S. Characterization and application of a native lactic acid

bacterium isolated from tannery fleshings for fermentative bioconversion of tannery fleshings. **Appl Microbiol Biotechnol**, Berlin, v. 83, p. 757 – 766, 2009.

RAY, B. **Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives**. Food Biopreservatives of Microbial Origin B, CRC Press, Boca Raton, 1992.

RILEY, M.A. & WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v. 56, p. 117 – 137, 2002.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.79, p. 3 – 16, 2002.

ROUSE, S. & VAN SINDEREN, D. Bioprotective Potential of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing. **J Food Prot**, Ames, v. 71, p. 1724 – 1733, 2008.

SAAVEDRA, L.; MINAHK, C.; DE RUIZ HOLGADO, A.P.; SESMA, F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH₂-terminal sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 48, p. 2778 – 2781, 2004.

SABIA, C.; MESSI, P.; DE NIEDERHAUSERN, S.; MANICARDI, G.; BONDI, M. Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus faecalis*. **Lett Appl Microbiol**, Oxford, v. 38, p. 99 – 105, 2004.

SÁNCHEZ, J.; DIEP, D.B.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; CINTAS, L.M.; HERNÁNDEZ, P.E. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 270, p. 227 – 236, 2007.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 72, p. 125– 136, 2002.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, A.T; BASSOLE, H. N.; TRAORE, S. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African J Biotechnol**, Nairobi, v. 5, p. 678 - 683, 2006.

SCHLEIFER, K.H.; KILPPER-BÄLZ, R.. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **Int J Syst Bacteriol**, Ames, v. 34, p. 31– 34, 1984.

SHERMAN, J. M. The streptococci. **Bacteriol Rev**, Washington, v. 1, p. 3 – 97, 1937.

SPARO, M.D.; CASTRO, M.S.; ANDINO, P.J. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 100, p.123 – 134, 2006.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 36, p. 1 –29, 1997.

STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A.; OUWEHAND, A. C. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. **Vet Microbiol**, Amsterdam, v. 100(1-2), p. 107-14, 2004.

STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A.; SIMONOVÁ, M.; MARCINÁKOVÁ, M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. **Vet Microbiol**, v. 132, p. 293 – 301, 2008.

STROMPFOVÁ, V.; MARCINÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; GANCARCÍKOVÁ, S.; JONECOVÁ, Z.; SCIRANKOVÁ, L.; KOSCOVÁ, J.; BULECA, V.; COBANOVÁ, K.; LAUKOVÁ, A. Enterococcus faecium EK13--an enterocin a-producing strain with probiotic character and its effect in piglets. **Anaerobe**, Londres, v. 12, p. 242 – 248, 2006.

SULZER, G.; BUSSE, M.; ROSEMBERG, M. Inhibition of *Listeria* spp. in Camembert cheese by inhibitory starter cultures. **J Dairy Sci**, Champaign, v.75, s. 1, p. 94, 1992.

SVETICH, E.A.; ERUSLANOV, B.V.; PERELYGIN, V.V.; MITSEVICH, E.V.; MITSEVICH, I.P.; BORZENKOV, V.N.; LEVCHUK, V.P.; SVETICH, O.E.; KOVALEV, Y.N.; STEPANSHIN, Y.G.; SIRAGUSA, G.R.; SEAL, B.S.; STERN, N.J. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. **J Agric Food Chem**, Washington, v. 26, p. 1942-1948, 2008.

TAGG, J.; MCGIVEN, R. Assay system for bacteriocins. **Appl Microbiol**, Washington, v. 21, p. 943, 1971.

THIERCELIN, M. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. **C R Seances Soc Biol Fil**, Masson, v. 5, p. 269– 271, 1899.

THIERCELIN, M.; JOUHAUD, L. Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations périphériques et microblastes. **C R Seances Soc Biol Fil**, Masson, v. 55, p. 686– 688, 1903.

TICHACZEK, P.S.; VOGEL, R.F.; HAMMES, W.P. Cloning and sequencing of sakP encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 361 – 367, 1994.

TIWARI, S. & SRIVASTAVA, S. Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. **Appl Microbiol Biotechnol**, Berlin, v. 79, p. 759 – 767, 2008.

TODOROV, S.D.; WACHSMAN, M.; KNOETZE, H.; MEINCKEN, M.; DICKS, L.M. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. **Int J Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, p. 508 – 513, 2005.

TOMITA, H.; FUJIMOTO, S.; TANIMOTO, K.; IKE, Y. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. **J Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 7843– 7855, 1997.

UTENG, M., HAUGE H., BRONDZ, I., NISSEN-MEYER, J., FIMLAND, G. Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture Medium. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. fev., p. 952–956, 2002.

VADYVALOO, V.; SNOEP, J.L.; HASTINGS, J.W.; RAUTENBACH, M. Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 335 – 340, 2004.

VIEDMA, P.M.; ABRIOUEL, H.; BEN OMAR, N.; LÓPEZ, R.L.; VALDIVIA, E.; GÁLVEZ, A. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. **Food Microbiol**, Londres, v. 26, p. 289 – 293, 2009.

WILAI PUN, P.; ZENDO, T.; SANGJINDAVONG, M.; NITISINPRASERT, S.; LEELAWATCHARAMAS, V.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. The Two-synergistic Peptide Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 Isolated from Thai Fermented Fish (Pla-ra). **ScienceAsia**, Bangkok, v. 30, p. 115-122, 2004.

WIRAWAN, R.U.; SWANSON, K.M.; KLEFFMANN, T.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. **Microbiology**, Reading, v. 153, p. 1619 – 1630, 2007.

XIE, L.; MILLER, L.M.; CHATTERJEE, C.; AVERIN, O.; KELLEHER, N.L.; VAN DER DONK, W.A. Lacticin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. **Science**, Nova York, v. 303, p. 679 – 681, 2004.

YAMAMOTO, Y.; TOGAWA, Y.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* Strain RJ-11. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 69, p. 5746 – 5753, 2003.

YOON, Y. C.; PARK, H. J.; LEE, N.; PAIK, H. Characterization and enhanced production of Enterocin HJ35 by *Enterococcus faecium* HJ35 isolated from human skin. **Biotechnol Bioprocess Eng**, Seul, v. 10, p. 296 – 303, 2005.

ZENDO, T.; EUNGRUTTANAGORN, N.; FUJIOKA, S.; TASHIRO, Y.; NOMURA, K.; SERA, Y.; KOBAYASHI, G.; NAKAYAMA, J.; ISHIZAKI, A.; SONOMOTO, K. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 99, p. 1181 – 1190, 2005.

ZUNIGA, A.; PEREIRA, J.; COIMBRA, J.; MINIM, L. ; ROJAS, E. Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 65-72, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)