



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO

***SCIENZE DEI SISTEMI AGRARI E FORESTALI E DELLE
PRODUZIONI ALIMENTARI XXII CICLO***

(Direttore: Prof. Piero Deidda)

Indirizzo: Biotecnologie microbiche agroalimentari
(Coordinatore di Indirizzo: Prof. G. A. Farris)

Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tutor:
Prof. Pietrino Deiana

Tesi di dottorato di:
Dott. Stefano Schirru

Anno Accademico 2008-2009

Indice

<u>INDICE</u>	I
<u>RINGRAZIAMENTI</u>	VI
<u>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</u>	1
1.1 Le batteriocine	2
1.2 Caratterizzazione e sintesi	3
1.3 Aspetti molecolari	6
1.4 Modalità di azione	7
1.5 Regolazione della produzione delle batteriocine	9
<u>CAPITOLO 2: CLASSIFICAZIONE DELLE BATTERIOCINE</u>	10
2.1 Batteriocine di classe I o Lantibiotici	10
2.2 Batteriocine di classe II	12
2.3 Batteriocine di classe III	13
2.4 Batteriocine di classe IV	13
<u>CAPITOLO 3: LE COLICINE</u>	14
<u>CAPITOLO 4: LE BATTERIOCINE DA BATTERI LATTICI</u>	15
4.1 La nisina	18
4.2.1 Meccanismo d'azione della nisina	19

<u>CAPITOLO 5: RUOLO ECOLOGICO DELLE BATTERIOCINE</u>	21
5.1 Le batteriocine come potenziali bioconservanti degli alimenti	21
5.2 Applicaz. attuali delle batteriocine in campo clinico ed alimentare	23
<u>CAPITOLO 6: GLI ENTEROCOCCHI</u>	27
6.1 Le batteriocine da enterococchi	29
6.2 Enterocine lantibiotici, Classe I.	34
6.2.1 La Citolisina	34
6.3 Enterocine della classe II	35
6.3.1 Classe II.1 Enterocine della famiglia delle pediocine	35
6.3.1.1 Enterocina A	36
6.3.1.2 Mundticina e Mundticina KS	37
6.3.1.3 Enterocina CRL35	37
6.3.1.4 Batteriocina 31	38
6.3.1.5 Batteriocina RC714	38
6.3.1.6 Batteriocina T8/batteriocina 43	38
6.3.1.7 Enterocina SE-K4	39
6.3.1.8 Enterocina P	39
6.3.2 Classe II.2. Enterocine sintetizzate senza un peptide	40
6.3.2.1 Enterocina L50	40
6.3.2.2 Enterocina RJ-11	41
6.3.2.3 Enterocine MR10A ed MR10B	41
6.3.2.4 Enterocina Q	41
6.3.2.5 Enterocina EJ97	42
6.3.3 Classe II.3. Altre enterocine lineari, non pediocina-simili	42
6.3.3.1 Enterocina 1071	42
6.3.3.2 Enterocina B	43
6.3.3.3 Batteriocina 32	44
6.4 Enterocine della classe III. Peptidi ciclici antibatterici	44
6.4.1 Enterocina AS-48	45
6.4.2 Enterocina AS-48RJ	45

6.4.3 Circularina A	45
6.5 Classe IV. Proteine grandi	46
6.5.1 L'enterolisina A	46
<u>CAPITOLO 7: LA LISTERIA MONOCYTOGENES</u>	47
7.1 Prevenzione	49
7.2 Normativa di riferimento	50
<u>CAPITOLO 8 SCOPO DEL LAVORO</u>	53
<u>CAPITOLO 9: MATERIALI E METODI</u>	56
9.1 Isolamento dei ceppi microbici	57
9.2 Attività inibitoria	57
<u>9.3 Test svolti sui campioni con evidente attività antimicrobica</u>	60
9.3.1 Identificazione dei ceppi microbici	61
9.3.2 Identificazione genetica dei gruppi microbici	62
9.3.3 Preparazione dei supernatanti	63
9.3.4 Spettro di attività	64
9.3.5 Esclusione dell'attività inibitoria dovuta ai fagi litici	64
9.3.6 Calcolo dell'unità arbitraria	64
9.3.7 Effetto dei trattamenti col calore	65
9.3.8 Effetto degli enzimi	65
9.3.9 Effetto del pH	66
9.3.10 Effetto dei tensioattivi e dei sali	66
9.3.11 Stabilità delle batteriocine nel tempo	67
9.3.12 Produzione delle batteriocine a diversi tempi e temperature	67
9.3.13 Produzione delle batteriocine in diversi terreni di crescita	67
9.3.14 Curva di produzione delle batteriocine in MRS	67
9.3.15 Produzione delle batteriocine a differenti pH iniziali di crescita	68
9.3.16 Effetto della composizione del mezzo di crescita sulla	

produzione delle batteriocine	68
9.3.17 Crescita del microrganismo target in presenza delle batteriocine	69
9.3.18 Riduzione delle cellule vitali del microrganismo target in presenza delle batteriocine	70
9.3.19 Adsorbimento delle batteriocine sulle cellule target	70
9.3.20 Influenza del pH e della temperatura sull'adsorbimento delle batteriocine	71
9.3.21 Effetto dei sali inorganici e dei composti organici sull'adsorbimento delle batteriocine	71
9.3.22 Isolamento e parziale purificazione delle batteriocine	71
9.3.23 Determinazione della dimensione in Tricine SDS-PAGE	72
<u>CAPITOLO 10: RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	74
10.1 Capacità antimicrobica e spettro di attività	75
10.2 Esclusione dell'attività inibitoria dovuta a fagi litici	85
10.3 Calcolo dell'Unità Arbitraria	85
10.4 Effetto dei trattamenti col calore	87
10.5 Effetto degli enzimi	90
10.6 Effetto del pH	92
10.7 Effetto dei tensioattivi e dei sali	97
10.8 Stabilità delle batteriocine nel tempo	100
10.9 Produzione delle batteriocine a diversi tempi e temperature	100
10.10 Produzione delle batteriocine in differenti terreni ed a diversi pH iniziali di crescita	102
10.11 Effetto della composizione del mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine	113
10.12 Crescita del microrganismo target in presenza delle batteriocine	122
10.13 Riduzione delle cellule vitali del microrganismo target in presenza delle batteriocine	124
10.14 Adsorbimento delle batteriocine sulle cellule target	125
10.15 Influenza del pH sull'adsorbimento delle batteriocine	126

10.16 Influenza della temperatura sull'adsorbimento delle batteriocine	126
10.17 Effetto dei sali inorganici e dei composti organici sull' adsorbimento delle batteriocine	127
10.18 Determinazione della dimensione in Tricine SDS-Page	130
<u>CAPITOLO 11: CONCLUSIONI</u>	134
<u>LISTA TABELLE E FIGURE</u>	139
<u>LISTA TABELLE</u>	140
<u>LISTA FIGURE</u>	141
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	144

Ringraziamenti

Alla fine di questi tre anni di Scuola di Dottorato vorrei esprimere i più sentiti ringraziamenti verso i Professori, i Ricercatori e tutto il Personale della Sezione di Microbiologia Agraria della Facoltà di Agraria di Sassari; vorrei anche ringraziare tutti i Dottorandi ed i Tesisti con i quali ho condiviso questo percorso formativo, fatto di studio, di confronto e scambio di esperienze.

Porgo un ringraziamento particolare al mio Docente guida il Prof. Pietrino Deiana ed alla Dr.ssa Nicoletta Mangia per tutto quanto messi a disposizione, ed al Coordinatore della Scuola di Dottorato il Prof. Giovanni Antonio Farris.

Infine un pensiero va' alla mia famiglia, ai miei fratelli, a mia sorella, a Teresa ed ai miei genitori; a tutti loro dedico, con affetto e tanta gratitudine, questa Tesi di Dottorato.

Grazie

Stefano Schirru

INTRODUCTION

Introduzione

Le batteriocine

I microrganismi, per loro stessa natura, sono in grado di attivare una serie di sistemi difensivi estremamente varia. Tra questi sistemi rientrano i classici antibiotici, svariati agenti litici, diversi prodotti del metabolismo batterico, varie tipologie di esotossine e le batteriocine.

L'antagonismo esistente tra i microrganismi viene citato sul finire del XIX secolo da Pasteur e Joubert, i quali osservarono come un isolato batterico fosse in grado d'interferire sulla crescita di *Bacillus anthracis* (Jack et al., 1995). Allo stesso modo, fu osservata un'azione inibitoria esercitata da un isolato di *Staphylococcus* spp. posto in interazione con *Corynebacterium diphtheriae*. Questa scoperta condusse, in quel tempo, ad un uso terapeutico di isolati stafilococcici, sotto forma di vapore, come utile strumento nel trattamento della difterite (Florey, 1996). Gátia (1925) fu il primo a chiarire i meccanismi d'inibizione che avvengono in questi processi d'interazione microbica. Fu osservato che cellule di *E. coli* erano in grado di produrre, quando cresciute in mezzo liquido, una sostanza stabile alle oscillazioni di temperatura e che mostrava attività inibitoria sulla crescita di altri microrganismi tassonomicamente simili. Quello, fu molto probabilmente, il primo passo verso lo studio riguardante le batteriocine (Jack et al., 1995), ed inizialmente queste sostanze furono chiamate colicine, poiché la maggior parte degli studi riguardavano la loro sintesi da parte di *E. coli*.

Solo successivamente, fu scelto il nome batteriocine (Jacob et al., 1953), dopo che la sintesi di queste molecole con azione inibitoria, fu rilevata anche in altri batteri, sia Eubatteri che Archebatteri (Torrebranca et al., 1995).

Col termine “batteriocine”, vengono indicate quelle molecole proteiche di produzione batterica generate indifferentemente da Gram-positivi e da Gram-negativi e dotate di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici diversi dal ceppo produttore, ma a questo strettamente correlati.

Le batteriocine, di fatto, furono scoperte all'inizio del 1928, un anno prima della penicillina e proprio per questo motivo furono poco studiate e messe da parte poiché gli antibiotici mostrarono subito un'attività antimicrobica notevolmente superiore, anche se questo ha determinato, in seguito ad uso eccessivo sia nella medicina umana che in quella animale, la comparsa di multiresistenza negli organismi bersaglio.

Caratterizzazione e sintesi

Le Batteriocine sono state definite come sostanze batteriche con la capacità d'inibire, anche in basse concentrazioni, la moltiplicazione di altri batteri tassonomicamente vicini (Stainer et al., 1986; Brock, 1995). Queste formano un gruppo eterogeneo comprendente le specie produttrici, la dimensione molecolare, lo spettro antimicrobico, la stabilità, le caratteristiche fisiche e chimiche, il modo d'azione ed i meccanismi immunitari indotti. Si ritiene che vengano prodotte dal 99% delle specie batteriche presenti in natura (Davidson and Hoover, 1993; De Vuyst and Vandame, 1994). Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi sono generalmente proteine ad elevato peso molecolare con un dominio caratteristico, specifico per l'adesione, la traslocazione o l'attività di *killing* della batteriocina stessa, mentre quelle prodotte dai batteri Gram positivi sono generalmente peptidi cationici, di piccole dimensioni e termostabili, inizialmente sintetizzati come pre-peptidi e che, in seguito a fenomeni di scissione, si trasformano nelle molecole biologicamente attive.

Potrebbero anche essere indicate per definizione come antibiotici, anche se di fatto presentano alcune differenze (Tabella 1) (Klement et al., 1990; Davis, 1999). Le batteriocine sono molecole con attività antibiotica tra le più abbondanti e diversificate prodotte dai batteri, sia Gram positivi che Gram negativi (Riley, 1998).

Gli antibiotici vengono definiti come specie molecolari prodotte da un organismo e attive contro la crescita di altri. Tuttavia in pratica, gli antibiotici sono generalmente considerati metaboliti secondari attivi in basse concentrazioni nel bloccare la crescita di microrganismi. Gli antibiotici sono molecole, anche peptidiche (penicillina), prodotte da sistemi multi-enzimatici e la cui biosintesi non è bloccata da inibitori della sintesi proteica al contrario delle batteriocine.

Tabella 1 – Aspetti caratteristici delle batteriocine ed altri antibiotici convenzionali.

Caratteristiche	Batteriocine	Altri antibiotici
Applicazione	alimenti	clinica
Sintesi	ribosomale	metabolismo secondario
Attività	spettro limitato	ampio spettro
Modalità d'azione	la maggior parte attraverso la formazione di canali nella membrana citoplasmatica	bersaglio specifico
Tossicità od altri effetti nelle cellule eucariotiche	assente	presente

Con il termine antibiotico si indica qualsiasi sostanza di origine microbica, animale, vegetale od ottenuta per sintesi che a basse concentrazioni deve avere le seguenti proprietà: I) attività inibitoria o letale contro specie microbiche; II) abilità nel prevenire la comparsa di forme di resistenza; III) assenza nell'ospite di effetti indesiderati; IV) stabilità chimica. In generale, gli antibiotici possono essere definiti come agenti di grande interferenza sulla crescita e sulle attività microbiche. Le sostanze riconosciute come antibiotiche esercitano la loro attività in diversi modi, internamente ed esternamente alla cellula sensibile ed agendo su diversi bersagli, come:

I) danneggiando la parete cellulare; II) destabilizzando la membrana citoplasmatica; III) modificando la struttura degli acidi nucleici; IV) inibendo l'attività enzimatica; V) esercitando un'azione antimetabolica; VI) influenzando la sintesi degli acidi nucleici (Pelczar et al., 1980). Alcuni batteri, trovandosi a competere per i nutrienti e per lo spazio, sono in grado di secernere molecole peptidiche di sintesi ribosomale, le batteriocine appunto, che possono anche essere associate a lipidi o carboidrati e che possono portare ad una morte selettiva le altre cellule competitori (Tagg et al., 1976; Tadashi and Schneewind, 1998). Questo tipo di molecole sono prodotte da un ampio numero di organismi viventi: mammiferi, uccelli, anfibi, insetti, piante e microrganismi (Cammue et al., 1994; Sahl, 1994; Boman, 1995). Secondo Boman (1995, 1996) i piccoli peptidi antimicrobici quali le batteriocine sono una prima linea di difesa ideale

nei confronti dei patogeni in quanto vengono prodotti 100 volte più velocemente degli antibiotici ed inoltre diffondono molto più rapidamente delle grandi molecole.

L'informazione genetica che codifica per la produzione di batteriocine può essere contenuta sia a livello plasmidico, sia a livello cromosomico e tale produzione può avvenire spontaneamente oppure conseguire ad una stimolazione operata da agenti ambientali, fisici o chimici.

I geni che codificano per le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi risultano localizzati a livello plasmidico, mentre i geni che codificano per le batteriocine prodotte dai Gram positivi possono essere presenti sia a livello plasmidico che cromosomico, ed inoltre si localizzano specificamente in strutture multigene operone-simili; il corredo genetico deputato alla produzione delle batteriocine ad opera dei Gram positivi risulta anche estremamente più ampio rispetto a quello dei Gram negativi.

Tra le batteriocine una delle più studiate e note è la colicina che è prodotta da *Escherichia coli*, ha un peso di circa 20 kDa ed inibisce un ristretto numero di batteri (Nissen-Meyer and Nes, 1997). I primi studi hanno dimostrato che la sintesi delle batteriocine da *Escherichia coli* è codificata in geni localizzati in plasmidi (plasmide Col in *E. coli*) a differenza degli antibiotici veri e propri che, come già detto, sono generalmente prodotti del metabolismo secondario (Ker and Tate, 1984; Hancock and Chapple, 1999). Inoltre, sempre sul plasmide di *Escherichia coli*, oltre ai geni che codificano per la batteriocina, è stato individuato anche un gene immunitario che conferisce all'organismo produttore della tossina l'immunità verso quella sostanza. La colicina è prodotta principalmente quando il batterio è in condizioni di "stress" (Riley and Wertz, 2002).

Successivamente, sono stati identificati i determinanti genetici di diverse batteriocine, alcuni di essi sono correlati a plasmidi di diverse dimensioni, come la pediocina prodotta dal genere *Pediococcus* e la lactocina prodotta dal *Lactococcus lactis*. Altre sono codificate da geni localizzati sui cromosomi come la plantaracina A e la sakacina 674, mentre altre ancora sono correlate a trasposoni, come la nisina prodotta dal *L. lactis* (Ray, 1996). Inoltre, per molte batteriocine sono stati individuati i geni strutturali, in altre parole, i geni codificanti coinvolti nella sintesi di questi peptidi antimicrobici. Questi geni strutturali sono, generalmente, situati in un operone, che è direttamente coinvolto nel processamento e nel trasporto delle batteriocine attraverso la

membrana citoplasmatica procariotica (Jack et al., 1995). La molecola batteriocinica viene trasportata attraverso la cellula batterica sotto forma di peptide inattivo (preptide) contenente una porzione C-terminale ed un prepeptide leader N-terminale. Durante il processamento, il peptide leader N-terminale viene rimosso da peptidasi specifiche con la conseguente attivazione della molecola che viene successivamente riversata nell'ambiente esterno alla cellula. Comunque, alcune batteriocine rimangono adsorbite sulla superficie della cellula produttrice quando i valori di pH all'esterno sono uguali o superiori a pH 5.0, poiché presentano cariche positive e la tendenza a formare aggregati (Klaenhamer, 1993).

Aspetti molecolari

Ad oggi, sono state condotte molte ricerche riguardanti la batteriocine nel tentativo di capire le loro caratteristiche molecolari, nel significato ampio del termine. Queste molecole presentano generalmente natura proteica che varia da peptidi a basso peso molecolare come quelli sintetizzati dalle specie fitopatogene di *Corynebacterium*, fino a grosse molecole proteiche come quelle sintetizzate da *Pseudomonas syringae* (Gross and Vidaver, 1979; Stainer et al., 1986; Klement et al., 1990). In contrasto con i batteri Gram negativi (-), i batteri Gram positivi (+) molto spesso producono batteriocine più piccole di 6 kDa. Queste molecole hanno spesso carica positiva e proprietà anfotera, con capacità di penetrare nella membrana citoplasmatica.

Inoltre sono ancora definite come sostanze cationiche ed idrofobiche, alcune delle quali presentano un ponte di solfuro nella loro struttura molecolare e la maggior parte di esse sono piccole molecole con meno di 50 aminoacidi, come ad esempio la nisina (batteriocina più studiata) che è costituita da 35 aminoacidi. Si contano 44 aminoacidi nella pediocina AcH prodotta da *Pediococcus acidilactici*, 43 aminoacidi nella sakacina prodotta da *Lactobacillus sakei* LB 706 e 37 aminoacidi nella lactacina prodotta da *Lactobacillus lactis* subsp. *cremosis* 9B4 (Daeschel, 1989; Daeschel and Ray, 1992; Klaenhammer, 1993).

Queste molecole, come caratteristiche generali, sono: stabili al calore, a bassi valori di pH, alla refrigerazione, al congelamento ed anche a diversi solventi organici deboli, sali ed enzimi e sono sensibili agli enzimi proteolitici (Ray, 1996).

Modalità di azione

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi si differenziano rispetto a quelle elaborate da microrganismi Gram positivi in quanto le prime agiscono mediante formazione di canali ionici a livello di membrana citoplasmatica e mostrano, una volta penetrate nella cellula sensibile/*target*, una spiccata attività nucleasica, mentre le seconde sono “membrana-attive”, ossia operano direttamente a livello di membrana (Bruno and Montville 1993).

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi, aderiscono alle cellule bersaglio grazie alla presenza di specifiche unità recettoriali, presenti a livello di membrana esterna delle cellule sensibili coinvolte. Quelle prodotte dai microrganismi Gram positivi non mostrano invece alcun adsorbimento specifico, pur non potendosi escludere a priori la possibilità di una via di adsorbimento preferenziale per quelle specifiche batteriocine caratterizzate da uno spettro d'azione più limitato (Yang et al., 1992).

Lo spettro d'inibizione delle batteriocine prodotte dai Gram negativi è strettamente correlato alla specie produttrice, mentre le batteriocine prodotte dai Gram positivi si dimostrano attive non solo verso altri batteri Gram positivi ma, occasionalmente, anche verso microrganismi Gram negativi. Risulta poi di un certo interesse la constatazione che il *range* di sensibilità può ampliarsi, anche notevolmente, al variare del pH, così come in presenza di particolari sostanze chimiche che agiscono alterando l'integrità della parete batterica. Sebbene, alcune batteriocine prodotte da batteri Gram-positivi (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) possiedano spettri di inibizione limitati ad alcuni ceppi appartenenti alla stessa specie del microrganismo produttore, la maggior parte di esse mostra un ampio spettro d'azione contro diverse specie batteriche sia Gram + che Gram -. Inoltre l'attività antibatterica nei confronti dei ceppi sensibili può essere determinata anche a concentrazioni picomolari e nanomolari. L'azione biologica delle batteriocine si attua dapprima, attraverso il legame con recettori specifici situati sulla superficie della cellula microbica bersaglio e successivamente per mezzo di meccanismi diversi, che possono essere adottati sia singolarmente che sinergicamente, portando a morte la cellula microbica (Paker et al., 1989; Daw and Falkiner, 1996; Brashears et al., 1998).

Le batteriocine sono tossine molto potenti spesso molto specifiche e prodotte solitamente quando le cellule microbiche, specialmente quelle di alcuni gruppi, vengono

sottoposte a condizioni di stress. Una volta rilasciate nell'ambiente, provocano una rapida eliminazione delle cellule microbiche vicine che non siano immuni o resistenti alla loro azione (Tadashi and Schinneewind, 1998). L'azione di antagonismo esercitata dai batteri produttori di batteriocine verso altri batteri presenti nello stesso ambiente viene definita antibiosi (Hayes, 1993) e si ha quando due o più microrganismi presenti appunto nello stesso ambiente, possono interferire sfavorevolmente sulla crescita e sulla sopravvivenza reciproca (Ray, 1996). Possono essere coinvolti nell'antagonismo la competizione per i nutrienti essenziali, l'accumulo di D-aminoacidi, l'abbassamento del potenziale di ossido-riduzione e la coaggregazione (Schillinger, 1990; Sinell, 1989), mentre la morte cellulare dovuta alle batteriocine può essere conseguenza dell'alterazione del regolare funzionamento della membrana citoplasmatica (con relativa perdita della permeabilità), l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici, l'interferenza nella sintesi delle proteine e variazione del meccanismo di traduzione cellulare. Ci sono, inoltre, alcuni gruppi microbici che subiscono una vera e propria lisi cellulare (Daw and Falkiner, 1996). I microrganismi batteriocina-produttori non subiscono l'azione della batteriocina da loro stessi prodotta grazie allo sviluppo di un'immunità specifica mediata da una proteina (Hancock and Chapple, 1999). Una volta secreta ed attivata, la batteriocina possiede una notevole capacità nello scoprire ed uccidere le cellule batteriche, mentre provoca danni molto limitati o nulli alle cellule che l'hanno prodotta (Tadashi and Schinneewind, 1998). Le batteriocine sono normalmente efficaci contro batteri Gram positivi sia appartenenti a generi diversi che a specie tra loro strettamente correlate (Ker and Tate, 1984, Moreno et al., 2000). La nisina e la pediocina AcH sono esempi di batteriocine che possiedono un ampio spettro antimicrobico ed esercitano la loro attività inibitoria sulla crescita di batteri quali *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes* and *Micrococcus luteus* (Ray, 1996). La capacità inibitrice di individui nei confronti di altri viene considerata come superiorità concorrenziale e si ha quando i microrganismi, che stanno sviluppando le loro attività metaboliche, si contendono nell'ambiente determinate nicchie ecologiche (Stockewell et al., 1993). Riguardo alla loro azione, si considera che il ruolo primario delle batteriocine sia quello di mediatori intra-specifici o di promotori d'interazioni fra le popolazioni microbiche (Cleveland et al., 2001).

Regolazione della produzione di batteriocine

Per quanto concerne la regolazione della produzione di batteriocine, i microrganismi Gram positivi elaborano uno specifico e personale sistema di regolazione, mentre i batteri Gram negativi si basano su diversi sistemi regolatori.

In entrambi i casi risulta di particolare rilevanza un sistema di regolazione batterica denominato *quorum sensing system*; tale sistema risulta essere influenzato dalla densità cellulare presente nel substrato (Fuqua et al., 2001; Miller and Bassler, 2001; Lerat and Moran, 2004).

Esistono nel mondo procariotico alcuni sistemi di controllo globale che consentono ad un microrganismo di rispondere in modo estremamente efficace ai segnali offerti dall'ambiente. Un interessante "segnale" è, per l'appunto, quello riportabile alla presenza di altri organismi appartenenti alla stessa specie. Alcune specie batteriche, infatti, possiedono sistemi regolatori che si basano sulla percezione della densità batterica di cellule appartenenti alla stessa specie nell'ambito della popolazione. È questa forma di controllo che viene appunto definita *quorum sensing*. Si stabilisce, in altri termini, una sorta di *network* di comunicazione tra cellula e cellula, basata su fattori solubili (N-acil-L-omoserina per i batteri Gram negativi e varie unità peptidiche per batteri Gram positivi) che spesso determinano la formazione di biofilm microbici. Questo mezzo di comunicazione intercellulare viene innescato per regolare la trascrizione genica di strutture coinvolte in differenti processi fisiologici come la bioluminescenza, il trasferimento di materiale plasmidico per via coniugativa e la produzione di specifici fattori di virulenza. Svariate specie microbiche impiegano questa strategia di comunicazione per mantenere una crescita organizzata nell'ambiente, situazione indispensabile per la sopravvivenza di taluni patogeni nell'ospite. Ciascun batterio Gram negativo che possieda questo sistema di controllo, risulta dotato di un enzima che sintetizza omoserina lattone acilato (AHL), molecola che diffonde all'esterno della cellula. All'interno della cellula l'AHL si concentra in modo specifico soltanto nel momento in cui ve ne siano numerose altre nelle vicinanze produttrici della stessa molecola. Queste molecole "segnale" a basso peso molecolare possono venire considerate come induttori che attivano la trascrizione genica da parte del cromosoma, producendo opportuni fattori di virulenza, batteriocine incluse.

Classificazione delle batteriocine

L'attuale classificazione delle batteriocine si basa sia sulla loro natura chimica che sul loro spettro d'azione; sulla base di queste caratteristiche sono state individuate quattro classi (Kleanhammer, 1988; Papagianni, 2003; Cotter et al., 2006).

Batteriocine di classe I o Lantibiotici sono così chiamate perché contengono aminoacidi non tradizionali come lantionina (Skaugen et al., 1994; Ryan et al., 1999 a, b) e β -metil lantionina oltre a residui deidratati e infine due gruppi contenenti D-alanina (Sahl et al., 1995). Sono piccole batteriocine composte da uno o due peptidi cationici, a basso peso molecolare (circa 3 kDa), attivi sulle membrane cellulari, termostabili, prodotti della sintesi ribosomale e sottoposti a modificazioni post-traduzionali, che si manifestano nella formazione di amminoacidi inusuali, quali la lantionina e la metillantionina, contenenti gruppi tioeteri che sono essenziali per l'assunzione di una adatta struttura funzionale. I lantibiotici sono prodotti da una vasta gamma di batteri Gram-positivi, che mostrano un'azione battericida contro altri batteri Gram-positivi. A concentrazioni nanomolari mostrano un duplice meccanismo di azione, che implica la formazione di pori nelle membrane cellulari e l'inibizione della biosintesi dello strato peptidoglicanico, grazie a un'interazione specifica con il lipide II, un precursore della parete cellulare. La nisina rappresenta il classico prototipo delle batteriocine appartenenti a questa classe (Twomey et al., 2002).

La struttura di tali peptidi contiene vari anelli attraverso la formazione di ponti con residui di lantionina (Lan) o β -metillantionina (Me-Lan).

Nel 1991 il gruppo dei lantibiotici è stato suddiviso a seconda della loro struttura in due sottogruppi (Jung, 1991; Sahl et al., 1995; Sahl and Bierbaum, 1998):

1. Il sottogruppo A contiene molecole allungate e flessibili, con carica positiva e sembra che agiscano depolarizzando la membrana citoplasmatica e favorendo quindi la formazione di pori, con perdita di costituenti essenziali della cellula batterica antagonista. Hanno un peso molecolare compreso tra i 2 e i 5 kDa. La Nisina appartiene a questo sottogruppo.
2. Il sottogruppo B: sono rappresentati da molecole con una struttura globulare e dimensioni di 2 kDa, cariche negativamente o elettricamente neutre. Esse interferiscono con le reazioni enzimatiche essenziali per la crescita e la sopravvivenza

del batterio bersaglio, ad esempio impedendo la sintesi della parete cellulare (Sahl *et al.*, 1995). Tra i lantibiotici di tipo B sono comprese la mersacidina e l'actagardina.

La continua scoperta di lantibiotici che non appartengono a nessuno dei due sottogruppi sopra descritti fa sì che la classificazione sia continuamente aggiornata (Sahl and Bierbaum, 1998; Gudder *et al.*, 2000; Ross P.R. *et al.*, 2002). Twomey *et al.* (2002) hanno recentemente diviso i lantibiotici in sei sottogruppi. Appartengono: al 1° sottogruppo la Nisina A e Nisina Z; al 2° sottogruppo la lactacina 481 (Piard *et al.*, 1992; Rince *et al.*, 1994) e la lactacina J49 (Hout *et al.*, 1996); al 3° sottogruppo, chiamato mersacidino, la plantaricina C (Turner *et al.*, 1999), LtnA1 (Ryan *et al.*, 1999_{a, b}) e Plw β (Holo *et al.*, 2001); al 4° sottogruppo LtnA2; al 5° sottogruppo Cy1L₁ e Cy1L_s (Gilmore *et al.*, 1994); al 6° sottogruppo lactocina S (Mortvert *et al.*, 1991).

I lantibiotici sono sintetizzati a partire da prepeptidi che hanno nella parte N-terminale dei peptidi anionici capaci di formare un'elica anfotera (figura 1).

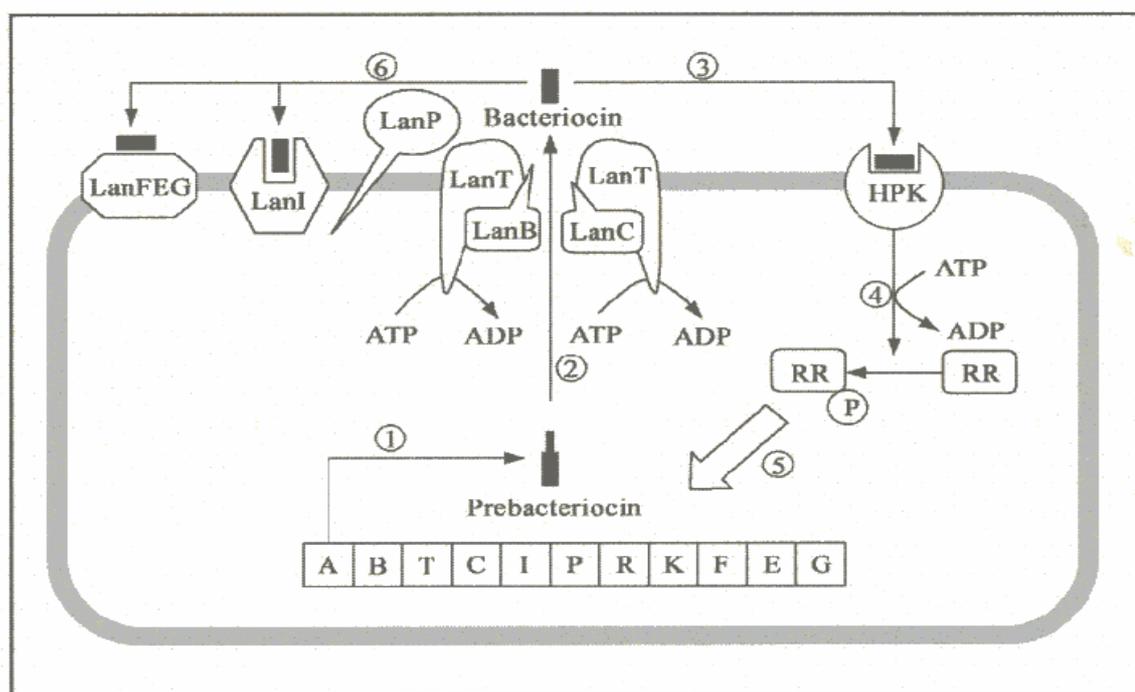


Figura 1. Un diagramma schematico della biosintesi dei lantibiotici: (1) Formazione della prebatteriocina; (2) La prebatteriocina è modificata da Lan B e LanC, trasportata attraverso un ABC-trasportatore dedicato LanT e processata da LanP, risultando in una batteriocina matura; (3) La proteina Istidina chinasi (HPK) reagisce alla presenza della batteriocina attivando un processo di fosforillazione; (4) Il gruppo fosfato (P) è trasferito a un regolatore (RR); (5) RR attiva la trascrizione del gene regolatore; e (6) produce immunità alla cellula mediante proteine che legandosi alla batteriocina ne impediscono l'attività antibatterica, LanI.

Batteriocine di classe II: molecole di piccole dimensioni (< 5 kDa), idrofobiche, relativamente termostabili, che non contengono aminoacidi modificati.

Questa classe viene, a sua volta, suddivisa in 3 sottoclassi:

classe IIa (Kaur et al., 2004), le batteriocine che rientrano in questa sottoclasse, che è la più ampia ed importante della classe II per la sua attività anti-*Listeria*, sono caratterizzate dalla sequenza YGNGV nella regione N-terminale (tipo pediocina). La parte N terminale idrofila è fortemente conservata da ciò risulta che le batteriocine tipo pediocina (36 – 48 amminoacidi) prodotte da diversi batteri hanno tutte un'alta similitudine (40 – 60%). Le prime batteriocine di questo tipo ad essere caratterizzate furono: la pediocina PA1 (Henderson et al., 1992; Nieto Lozano et al., 1992); la sakacina A (Holck et al., 1992), la sakacina P (Holck et al., 1992; Tichaczek et al., 1992), la leucocina A (Hastings et al., 1991), la curvacina A (Tichaczek et al.) e la mesentericina Y105 (Hécharad et al., 1992). Più recentemente sono state identificate in questo gruppo la carnobatteriocina BM1 e B2 (Quadri et al., 1994), l'enterocina A (Aymerich et al., 1996) e la piscicolina 126 (Jack et al., 1996).

Attraverso la costruzione di batteriocine ibride si è capito che la regione C terminale è importante nel determinare la specificità verso l'organismo target (Chikindas et al., 1995; Fimland et al., 1996).

Classe IIb, batteriocine non modificate non pediocin-like, come la lactococcina A e batteriocine denominate two-peptide, che consistono in due differenti peptidi cationici entrambi di 25 – 40 residui. L'attività antibatterica richiede la presenza di entrambi i peptidi, l'ottimo si ottiene quando sono presenti approssimativamente in quantità equivalenti. Le prebatteriocine vengono prodotte all'interno della cellula (Fig. 2) mentre la batteriocina matura si forma durante il trasporto fuori dalla cellula.

Il trasporto prevede la rimozione enzimatica del peptidi leader N-terminale (Garneau et al., 2002; Higgins, 1992; Buchman et al., 1988; Kaletta et al., 1989).

Le batteriocine due-peptidi sono: ABP-118 (*Lactobacillus salivarius*), recentemente descritto da Flynn et al. (2002); Brochocin-C (*Brochothrix campestris*), originariamente scoperto da Siragusa e Nettles Cutter (1993) e parzialmente purificato e caratterizzato da McCormick et al. (1998); Enterocine 1071 e L50 (*Enterococcus* spp.); Lactacins F e 705 (*Lactobacillus* spp.); Lactococcins G e MN (*Lactococcus* spp.).

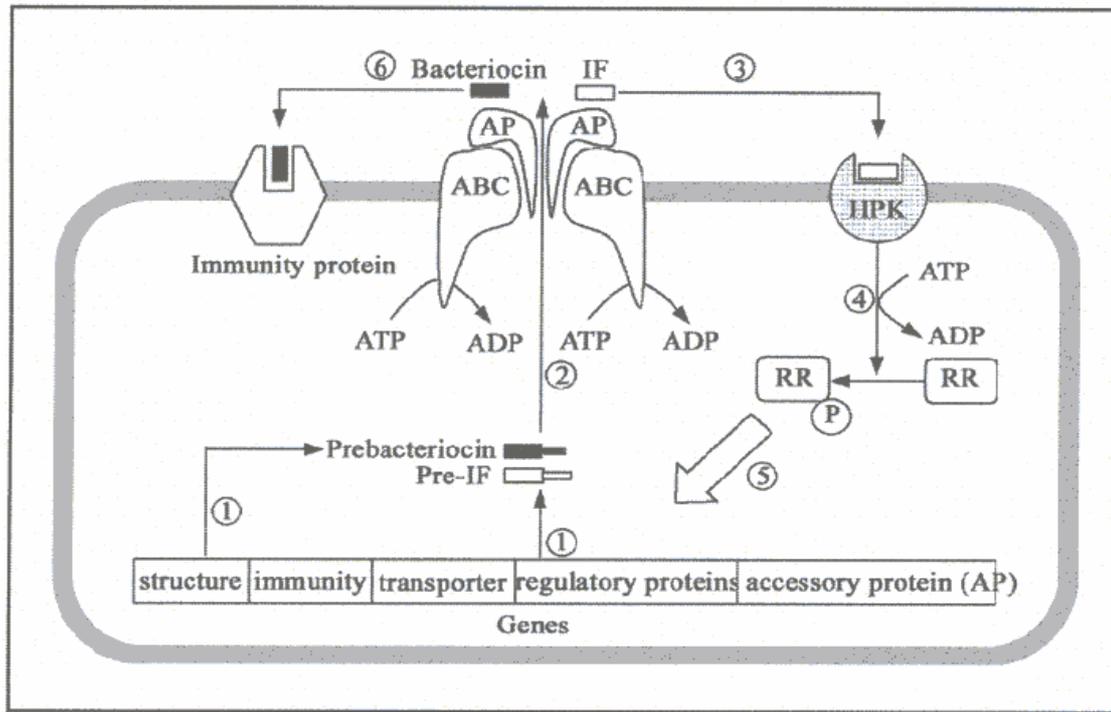


Figura 2. Un diagramma schematico della biosintesi delle batteriocine della classe II: (1) Formazione della prebatteriocina e del prepeptide del Fattore d'induzione (IF); (2) La prebatteriocina e il pre-IF sono processate e traslocate dal ABC-trasportatore risultando una batteriocina matura e IF; (3) La proteina Istidina chinasi (HPK) reagisce alla presenza del IF attivando un processo di fosforillazione; (4) Il gruppo fosfato (P) è trasferito a un regolatore (RR); (5) RR attiva la trascrizione del gene regolatore; e (6) produce immunità alla cellula mediante proteine che legandosi alla batteriocina ne impediscono l'attività antibatterica.

Classe IIc, la loro attività necessita di residui ridotti di cisteina (Cys), lattococcina B.

Batteriocine di classe III: proteine di notevoli dimensioni e termolabili (dimensioni > 30 kDa). Appartengono a questa classe di batteriocine l'helveticina J, l'helveticina V-1829, l'acidofilina A, lattacina A e B.

Batteriocine di classe IV: molecole complesse nella cui struttura si riconoscono componenti sia di natura lipidica che glucidica che sono indispensabili per la loro attività. Appartengono a questa classe di batteriocine la plantaricina S, leucocina S, lattacina 27 e pediocina SJ-1.

Le colicine

Le colicine, batteriocine prodotte da cellule di *E. coli*, sono state oggetto di diversi studi di ecologia microbica riguardanti i microrganismi (Paker et al., 1989; Gordon and Riley, 1999). In particolari condizioni di stress come la mancanza di nutrienti o la sovrappopolazione, le cellule di *E. coli* eventualmente presenti in una popolazione microbica e capaci di produrre le colicine vengono stimulate a sintetizzarle, ed il loro rilascio nell'ambiente avviene, generalmente, attraverso la lisi delle stesse cellule produttrici. La colicina, dapprima si lega ai recettori di membrane situati sulla cellula batterica sensibile e successivamente viene trasportata all'interno della stessa cellula batterica bersaglio, provocandone la morte attraverso tre meccanismi principali: i) la formazione di canali nella membrana plasmatica; ii) la degradazione del DNA; iii) l'inibizione della sintesi proteica. Il riconoscimento ed il trasporto delle colicine sono meccanismi altamente specifici in grado di causare un'azione letale solo sulle cellule di *E. coli*, infatti, le colicine hanno un'azione inibitoria molto bassa sugli altri batteri enterici. La resistenza alle colicine che si ha all'interno della famiglia delle *Enterobacteriaceae* suggerisce che queste molecole agiscono principalmente in modo intra-specifico. Le cellule colicina-produttrici sintetizzano una proteina auto-immune che è codificata in un operone (Figura 3) e che conferisce protezione od immunità dalla batteriocina da esse stesse prodotta.



Figura 3. Le colicine sono codificate in un operone. Generalmente, questo operone comprende tre geni intimamente connessi: 1) un gene che codifica la colicina, che funziona da killer verso le cellule avversarie; 2) un gene immunitario che codifica la sintesi della proteina che è in grado di conferire alla cellula produttrice una immunità specifica nei confronti dell'azione della colicina; 3) un gene di lisi, che codifica la sintesi di una proteina in grado di provocare la produzione di cellule che lisano. Essa esercita la funzione di liberare la colicina nell'ambiente in cui è inserita la popolazione microbica. Questi geni si trovano in un operone, e sono codificati dal processo di replicazione del plasmide nella cellula di *E. coli*.

Una volta che la batteriocina è stata riconosciuta, s'instaura un legame fra la proteina che conferisce l'immunità e la porzione C-terminale della colicina e questo protegge la cellula produttrice (Ray, 1996). Si pensa che il meccanismo dello sviluppo della resistenza mediato dalla proteina auto-immune, possa apportare alcune modificazioni nei recettori di superficie della cellula, dato che questi recettori vengono

solitamente utilizzati dalle colicine come strutture di accesso all'interno delle cellule bersaglio. Questo meccanismo viene riconosciuto ed indicato come resistenza vera. Un altro meccanismo di sopravvivenza può essere dovuto ad una modificazione nella procedura di trasporto, usata solitamente dalla batteriocina per attraversare la membrana citoplasmatica della cellula bersaglio, e che produce nella cellula colina-produttrice un aumento nella tolleranza (Cleveland et al, 2001). Solo le cellule che sviluppano l'immunità, sia come resistenza o sia come tolleranza, sono in grado di sopravvivere alle condizioni ambientali create dall'azione della colicina. A tutt'oggi sono state caratterizzate oltre 25 tipi di colicine e si pensa che circa il 30% della popolazione naturale di *E. coli* le produca (Tadashi and Schneewind, 1998). Comunque, ogni popolazione microbica studiata differisce per le diverse colicine sintetizzate e generalmente, fra tutte quelle prodotte esiste sempre un tipo dominante. In una popolazione microbica naturale di *E. coli* vi sono numerose cellule che sono resistenti ad una o più colicine, con una media del 70% che è resistente ad alcune colicine ed un 30% che risulta essere resistente a tutte quelle prodotte all'interno della popolazione (Gordon and Riley, 1999). Nel tempo, in una popolazione microbica naturale vi è sempre un costante flusso di frequenze relative di cellule di *E. coli* capaci di produrre colicine, come di cellule sensibili e di cellule resistenti all'azione delle colicine (Riley, 1998).

Le batteriocine dei batteri lattici

La fermentazione lattica e l'attività antimicrobica dei batteri lattici sono conosciute ed apprezzate da tempo ed applicate dagli esseri umani per l'ottenimento di diversi prodotti alimentari. Le proprietà antagonistiche dei batteri lattici connesse con la loro storica salubrità d'impiego nei processi fermentativi, ne rende molto interessante l'utilizzo per la bioconservazione. Esiste un interesse crescente nell'uso dei batteri lattici come conservanti naturali, per la loro potenziale produzione di metaboliti con attività antimicrobica come gli acidi organici (lattico ed acetico), il perossido d'idrogeno, la CO₂, il diacetile (2, 3-butandione), gli enzimi antimicrobici e le batteriocine. Le batteriocine prodotte dai batteri lattici, conosciuti generalmente come sicuri (GRAS), suscitano un grosso interesse nel controllo di batteri degradativi e

patogeni nelle derrate alimentari. La ricerca sulle batteriocine dei batteri lattici si è estesa durante le ultime decadi, con l'intento di utilizzare le batteriocine o gli organismi produttori come conservanti alimentari naturali. Le batteriocine sono state scoperte in molti microrganismi ma negli ultimi anni hanno ricevuto particolare attenzione soprattutto quelle prodotte dai batteri lattici (Klaenhammer, 1988; Jack *et al.*, 1995) perché potendo inibire anche l'accrescimento di batteri patogeni, potenzialmente presenti negli alimenti quali la *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e sia le spore che le forme vegetative di *Clostridium botulinum* (Chen & Hoover, 2003; Cleveland *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006; O'Sullivan *et al.*, 2002; Tagg *et al.*, 1976), possono essere utilizzate nell'industria alimentare come conservante naturale (Tab. 2).

Tabella 2. Esempi di batteriocine prodotte da batteri lattici

Batteriocine dei LAB	Spettro d'inibizione	Bibliografia
<i>Lactococcus</i> sp.		
Nisina	ampio	(Delves-Broughton, 1990; Ruhr <i>et al.</i> , 1985)
Lacticina 3147	ampio	(Ryan, 1999 ^{a, b})
Lacticina 481	medio	(Piard, 1992)
Lactococcina A, B e M	ristretto	(van Belkum, 1991)
<i>Lactocacilus</i> sp.		
Lactocina 27	ristretto	(Upreti <i>et al.</i> , 1975)
Sakacina A	ristretto	(Schilinger <i>et al.</i> , 1989)
Sakacina B	ristretto	(Samelis <i>et al.</i> , 1994)
Plantaricina C	ampio	(Gonzales <i>et al.</i> , 1994)
<i>Pediococcus</i> sp.		
Pediocina A	ampio	(Piva <i>et al.</i> , 1994)
Pediocina Ach (PA-1)	ampio	(Bhunja <i>et al.</i> , 1988; Marugg <i>et al.</i> , 1992)
<i>Leuconostoc</i> sp.		
Leucocina A-UAL187	ampio	(Leisner <i>et al.</i> , 1996)
<i>Enterococcus</i> sp.		
Enterocina A	ristretto	(Aymerich <i>et al.</i> , 1996; Ennahar <i>et al.</i> , 2000)
<i>Carnobacterium</i> sp.		
Carnocina U149	ampio	(Stoffels <i>et al.</i> , 1993)
Piscicolina 126	ampio	(Jack <i>et al.</i> , 1996)
Divercina V41	ampio	(Duffes <i>et al.</i> , 1999)

La maggior parte delle batteriocine fino ad oggi descritte sono prodotte da microrganismi dei generi *Lactobacillus* spp., seguite da *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* spp. (De Vuyst and Vandamme, 1994). Le batteriocine vengono definite come peptidi che vengono sintetizzati a livello dei ribosomi e la cui attività

antimicrobica è di solito diretta contro specie batteriche filogeneticamente vicine (Klaenhammer, 1988; Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996). Comunque, sono state riportate alcune eccezioni a questa regola, come ad esempio l'attività verso batteri gram negativi. Ne sono esempi la plantaricina 35d, prodotta da *Lactobacillus plantarum* (Messi et al., 2001); la batteriocina ST151BR, prodotta da *Lactobacillus pentosus* ST151BR (Todorov and Dicks., 2004); una batteriocina prodotta da *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Caridi, 2002); la thermophylina, prodotta da *Streptococcus thermophylus* (Ivanova et al., 1998); la batteriocina AS-48, prodotta da *Enterococcus faecalis* (Abrionel et al., 2001); una batteriocina prodotta da *Lactococcus lactis* KCA2386 (Ko and Ahn., 2000).

La nisina, prodotta da *L. lactis* subsp. *lactis*, è attiva contro batteri Gram-negativi, ma solo quando viene usata ad alte concentrazioni (Mattic and Hirsch 1947; Ogden and Tubb, 1985) oppure quando le cellule del microrganismo bersaglio vengono previamente pre-trattate con EDTA (Stevens et al., 1992; Stevens et al., 1991). Questo interesse riflette inoltre l'incremento della domanda da parte del consumatore, di prodotti sicuri non solo per assenza di microrganismi patogeni ma anche senza conservanti chimici (Abee et al., 1995). Infatti l'uso di questi batteri e dei loro metaboliti è generalmente accettato dal consumatore come qualcosa di "naturale" e "health-promoting" (Montville and Winkowski, 1997). Conseguentemente negli ultimi anni c'è stato un rinnovato interesse per quelle che vengono chiamate "tecnologie verdi" includendo in queste l'utilizzo delle batteriocine come bio-conservanti.

Questi composti possono essere utilizzati in tre modi: il primo consiste nell'incorporare la batteriocina nel prodotto come un normale additivo (per far questo bisogna produrre la batteriocina in grandi quantità, purificarla e stabilizzarla); il secondo consiste nell'utilizzare il ceppo produttore della batteriocina come un vero e proprio starter che produrrà la batteriocina direttamente nell'alimento (il ceppo produttore può sostituirsi completamente al ceppo starter nel caso in cui abbia anche le qualità tecnologiche per portare a conclusione con successo il processo biotecnologico, oppure essere incluso in un mix di microrganismi alcuni dei quali si occuperanno principalmente del processo altri della salubrità del prodotto, naturalmente in questo secondo caso prima dell'utilizzo dovranno essere testate tutte le possibili complicazioni nell'associazione tra microrganismi diversi; il terzo modo ovvia agli inconvenienti del

precedente ricorrendo, ove possibile, alla produzione della batteriocina per via eterologa, cioè ricorrendo al trasferimento del determinante o dei determinanti genetici del microrganismo produttore in un ospite, che sia possibilmente il microrganismo in possesso delle caratteristiche richieste dallo specifico processo tecnologico (O'Sullivan *et al.*, 2002).

In generale quando si selezionano ceppi di batteri produttori di batteriocine per utilizzarli negli alimenti, questi dovrebbero essere ben conosciuti, sicuri e portare effetti positivi al prodotto incrementandone i sapori e i profumi; le batteriocine dovrebbero avere un ampio spettro d'azione con alta specificità verso batteri patogeni come la *Listeria monocytogenes* e il *Clostridium botulinum*, stabili al calore, nessun rischio per la salute.

La nisina

Ad oggi è l'unica batteriocina commercialmente ammessa come agente naturale in ambito alimentare, per la conservazione degli alimenti (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Riley and Wertz, 2002; Ross Paul *et al.*, 2002), mentre altre batteriocine possono essere eventualmente presenti negli alimenti prodotte dalle colture microbiche utilizzate come starter. La nisina è considerata sicura dal World Health Organization (WHO) ed ha ricevuto la denominazione di Generally Recognized as Safe (GRAS) ed anche dal Food and Drug Administration (FDA). La nisina è prodotta da *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ed è ammessa in più di 60 paesi (Abee *et al.*, 1994). La Nisina può essere addizionata agli alimenti in quantità variabili da 10 a 750 mg/Kg di prodotto commerciale che equivalgono a 0,25-18,7 µg nisina/g (Ruhr, *et al.*, 1985). La Nisina viene generalmente addizionata ad alimenti acidi anche se esplica la sua attività a pH variabili da 3,5 a 8,0. In alcuni casi questa molecola è stata addizionata anche nella formulazione di involucri di PVC e in film biodegradabili derivati dal mais. Il limite d'uso per la Nisina nei paesi UE è di 10 µg/g di alimento.

Di seguito vengono elencati alcuni alimenti dove è prevista l'addizione di nisina: cibi in scatola, formaggi, formaggi fusi o trattati, dessert pastorizzati preparati con latte, ricotta, prodotti derivati del latte, preparazioni liquide a base di uovo, nella preparazione della fermentazione della birra e succhi di frutta, sui vegetali e nei gelati.

Il termine Nisina deriva dalla vecchia nomenclatura tassonomica dei batteri in cui sono state individuate. Questi batteri, appartenenti oggi al genere *Lactococcus* erano un tempo classificati come *Streptococcus* appartenenti al sierotipo N, da cui Nisina sta per “Group N Inhibitory Substance” dove il suffisso “INA” era quello comunemente utilizzato per gli antibiotici (all’epoca, 1928-44, il termine batteriocina non era stato ancora coniato). La Biosintesi è suddivisa in tre fasi:

1-modificazioni intracellulari post-traduzionali di alcuni aminoacidi della molecola peptidica (deidratazioni, formazioni di tioesteri e addizione di gruppi sulfidrilici);

2-trasporto del peptide attraverso la membrana citoplasmatica;

3-azione proteolitica (attivazione) a carico della pre-nisina e asporto del peptide leader.

La Nisina è senza dubbio il lantibiotico più studiato e conosciuto, diversi studi sono stati eseguiti sulla sua struttura e sui geni che la regolano (De Vuist and Vandamme, 1994; Dutton *et al.*, 2002). La Nisina è composta di 34 aminoacidi ed ha una struttura pentaciclica (Shiba *et al.*, 1991) con un residuo di lantionina (anello A) e quattro residui di b metil-lantionina (anelli B, C, D ed E). La Nisina Z è una variante naturale della nisina contenente asparagina al posto della istidina in posizione 27 (Kuipers *et al.*, 1993; Mulders *et al.*, 1991).

La Nisina può risultare efficace anche a concentrazioni nanomolari.

Meccanismo d’azione della nisina

I primi studi dimostrarono che inibiva la biosintesi del peptidoglicano (Linnet and Strominger, 1973), e che interagiva con i lipidi di tipi I e II (Reisinger *et al.*, 1980). Più tardi è stato osservato che poteva causare la formazione di pori nella membrana dei batteri sensibili, alterando l’equilibrio osmotico e il potenziale di membrana della cellula (Ruhr and Sahl, 1985; Sahl *et al.*, 1987; Benz *et al.*, 1991).

L’inserzione della Nisina sulla membrana cellulare determina la formazione di piccoli fori e la conseguente fuoriuscita di piccole molecole (<9400 Da), tale inserzione avviene in regioni non specifiche (Fig. 4).

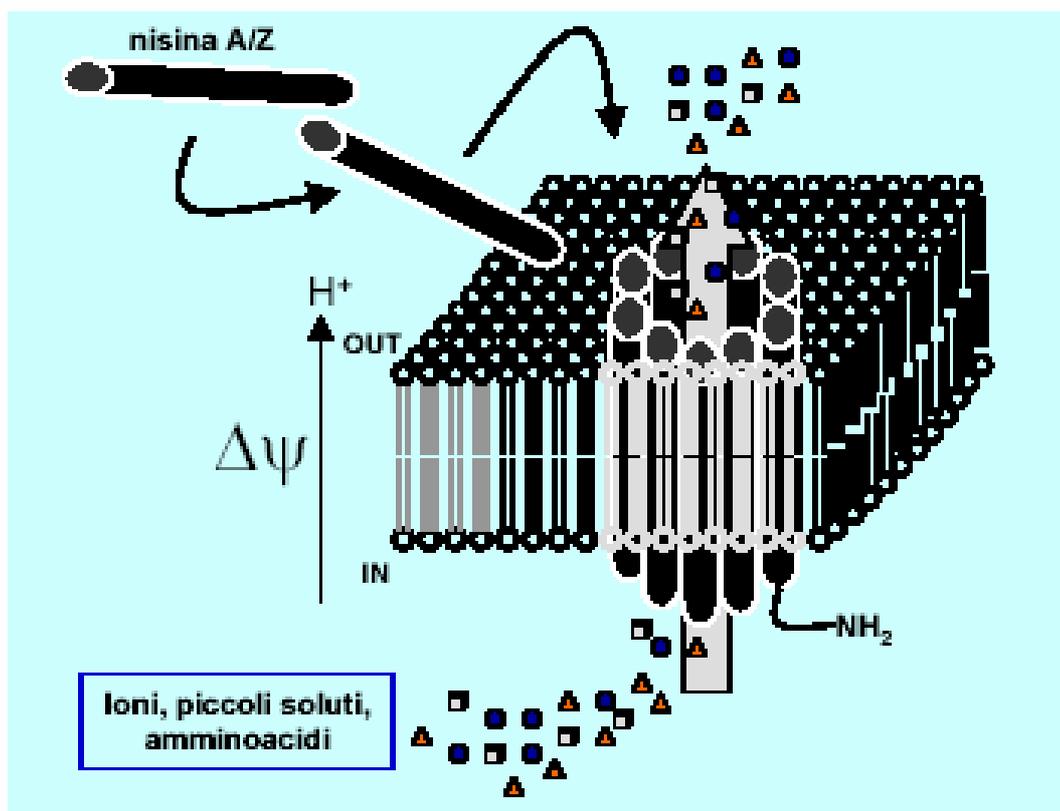


Figura 4. Modello dell'inserzione della Nisina nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare.

Più recentemente è stato mostrato che la Nisina interagisce con i lipidi II presenti nella membrana cellulare, molecole coinvolte nella biosintesi della parete cellulare (Breukink *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2002).

Le Nisine sono attive nei confronti di altri batteri lattici e soprattutto nei confronti di diverse specie di *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. butyricum*) e di *Listeria*. Alcuni ceppi di clostridi possono essere resistenti alle Nisine perché producono proteasi in grado di inattivare la molecola peptidica.

Tra le specie di interesse alimentare sensibili alle Nisine si possono annoverare: *Alycyclobacillus acidoterrestris*; *Bacillus brevis*; *Bacillus cereus*; *Bacillus coagulans*; *Bacillus licheniformis*; *Enterococcus faecalis* e *faecium*; *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus casei*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus helveticus*; *Lactobacillus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*; *Oenococcus oeni*; *Pediococcus*; *Micrococcus*; *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (Delves-Brughton, J., 1990; Maisnier-Patin *et al.*, 1992, Ferreira and Lund, 1996).

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

Ruolo ecologico delle batteriocine

Come già menzionato, le batteriocine svolgono una funzione chiave in termini “relazionali” all’interno delle diverse comunità batteriche, anche se il ruolo di queste sostanze antimicrobiche non è stato ancora definitivamente chiarito.

La sintesi batteriocinica, talvolta estremamente elevata sotto l’aspetto quantitativo, potrebbe suggerire un possibile coinvolgimento di tali sostanze sia nei meccanismi difensivi (impedisce l’invasione ad opera di altri ceppi o specie batteriche all’interno dell’*habitat* del batterio produttore), che offensivi, mettendo in atto strategie invasive con conseguente stanziamento in una particolare nicchia ecologica (Miller and Bassler, 2001).

Le batteriocine come potenziali bioconservanti degli alimenti

Nella produzione degli alimenti è fondamentale adottare tutte le misure atte a garantirne la salubrità e la stabilità durante la shelf-life che, come conseguenza delle tendenze attuali adottate dal consumatore moderno e dal legislatore alimentare, sono diventate tema di grande sfida per l’industria alimentare (Brul and Coote, 1999). Infatti oggi, il consumatore richiede cibi di alta qualità, possibilmente senza conservanti chimici, sicuri dal punto di vista igienico sanitario ed in grado di avere una lunga shelf-life ed il legislatore ha contemporaneamente imposto una riduzione nell’uso dei conservanti chimici in differenti alimenti (Brul and Coote, 1999). Naturalmente tutto questo ha causato per l’industria alimentare diversi problemi ed ha stimolato un rinnovato interesse, non scevro da grandi discussioni, verso nuovi agenti antimicrobici idonei ad essere utilizzati per la conservazione degli alimenti. Questi nuovi agenti ad azione antimicrobica dovrebbero possedere diversi requisiti, tra i quali la possibilità di poter essere impiegati in combinazione con i diversi trattamenti di risanamento tradizionalmente applicati nell’industria alimentare, ed inoltre poter assicurare ai cibi la protezione necessaria contro la flora microbica patogena e degradativi (Peck, 1997). Allo stesso tempo, una nuova prospettiva nella conservazione degli alimenti esalta l’adozione di diciture come “sistema antimicrobico naturale”, dove possono essere utilizzate le azioni sinergiche di diversi elementi. Sono compresi i prodotti animali,

vegetali e microbici che possiedono proprietà antimicrobiche, associati a procedure fisiche naturali di produzione, d'imballaggio e di conservazione degli alimenti. Queste azioni in un uso associato, possono produrre un effetto sinergico nel creare un ambiente sfavorevole alla sopravvivenza dei microrganismi (Gould, 1995). Ciò ha generato grande pressione sull'industria alimentare al fine di adottare alternative naturali per raggiungere gli obiettivi relativi alla conservazione dei cibi (Brul and Coote, 1999).

Nella ricerca di nuove tecnologie utilizzabili per la conservazione degli alimenti, assumono un posto di grande rilievo le sostanze prodotte dai microrganismi e tra queste sostanze meritano particolare attenzione le batteriocine (Daw and Falkner, 1996). Queste molecole rientrano all'interno della classe dei bioconservanti e della sottoclasse delle molecole biologiche a basso peso molecolare (Brul and Coote, 1999). I generi *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* and *Propionibacterium* includono specie microbiche produttrici di batteriocine impiegate o potenzialmente impiegate nei processi fermentativi degli alimenti.

Qualsiasi batteriocina dovrebbe essere studiata esaurientemente nelle sue caratteristiche, prima di poter essere impiegata come bioconservante (Cleveland et al., 2001) e segnatamente, sono sei gli aspetti che dovrebbero essere valutati prima del loro utilizzo come additivi alimentari: I) tutti gli additivi proposti devono essere testati tossicologicamente, inclusi gli effetti potenziali sinergici e di accumulo; II) deve essere autorizzato l'utilizzo solo di quegli additivi considerati sicuri nel senso reale del termine; III) quando si riscontrano nuove informazioni circa la loro sicurezza ed il loro uso, qualsiasi additivo alimentare deve essere nuovamente sottoposto a valutazione; IV) tutti gli additivi alimentari devono essere sempre tenuti in conformità con quanto indicato dalla Commissione Alimentare del CODEX; V) l'uso giustificato degli additivi deve essere fortemente basato sui requisiti di sicurezza alimentare delle differenti caratteristiche dei consumatori, e deve essere anche una flessibile alternativa economica e tecnica; VI) l'autorizzazione temporanea o permanente dell'uso di un additivo, deve considerare la limitazione per alimenti specifici, lo scopo, le condizioni di utilizzo, la riduzione del livello necessario per conseguire gli effetti desiderati ed il livello assumibile quotidianamente dall'uomo, ed ancora devono essere considerati le possibili assunzioni di categorie speciali di consumatori (Concon, 1980). Per alcune batteriocine è stata ben chiarita la loro azione come potenziali agenti antimicrobici ed anche le loro

possibili applicazioni nella conservazione degli alimenti, come la già citata nisina A che ha mostrato effetti inibitori sulla crescita, in formaggio, della *Listeria monocytogenes* in un periodo di otto settimane. Anche l'enterocina, ha mostrato la capacità d'inibire la crescita della *L. monocytogenes* una volta inoculata in carne di maiale, prosciutto, carne di pollo ed insaccati, così come la lattocina sempre sullo stesso microrganismo quando inoculato su terreno a base di carne (Vignolo et al., 1996; Davies, 1999; Aymerich et al., 2000). Come già riportato, sono numerose le applicazioni della nisina come conservante degli alimenti, inclusa l'estensione della shelf-life dei prodotti caseari, dei cibi in scatola, della carne sotto vuoto e del salmone affumicato (Hurst, 1981; Davies, 1999; Nilsson et al., 2000). La nisina presenta diverse caratteristiche positive, infatti risulta essere: I) priva di tossicità; II) prodotta naturalmente dal *Lactococcus lactis*; III) stabile al calore; IV) stabile alla conservazione; V) degradabile mediante enzimi digestivi; VI) di sapore e odore neutro (non conferisce sapori ed odori sgradevoli al prodotto); VII) ad ampio spettro d'azione contro i microrganismi Gram positivi (Kominsky, 1999; Fiorentini et al., 2001), ma è meno attiva nell'inibire la maggior parte dei batteri Gram negativi, dei lieviti e delle muffe (Harris et al., 1997).

Sebbene il ruolo antimicrobico delle batteriocine sia stato ampiamente riconosciuto, esse non sono ancora usate nella conservazione degli alimenti, probabilmente perché, la conoscenza delle loro caratteristiche peculiari è ancora insufficiente. Infatti, le più studiate e conosciute quali la nisina, l'acidocina, la bavaracina, la curvaticina, la saracina non sono ancora state ben caratterizzate.

Applicazioni attuali delle batteriocine in campo clinico ed alimentare

Negli ultimi 15 anni c'è stato un rinnovato interesse verso queste molecole a spiccata attività antimicrobica soprattutto per il loro possibile impiego sia in campo clinico che in quello tecnologico/alimentare.

Per quanto attiene alle applicazioni in campo clinico, le batteriocine potrebbero rappresentare una valida soluzione alternativa agli antibiotici. Infatti, grazie al loro limitato spettro d'azione, possono essere considerate "farmaci d'elezione" che agiscono specificatamente su determinati agenti patogeni; ciò consentirebbe, per lo meno in linea teorica, una drastica diminuzione dell'utilizzo degli antibiotici, riducendo in tal modo da

un lato lo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte dei ceppi patogeni e dall'altro il depauperamento della flora apatogena commensale presente nell'organismo.

Ne sia d'esempio la latticina 3147, batteriocina prodotta da *Lactococcus lactis*, che ha mostrato una spiccata attività nei confronti dei principali agenti mastitogeni Gram positivi (Crispie et al., 2004; Galvin et al., 1999; Mc Auliffe et al., 1998; Ross et al., 1999; Ryan et al., 1998). Appare quindi evidente come la latticina 3147 presenti interessanti potenzialità di utilizzo sia in fase di trattamento terapeutico che in fase di prevenzione e controllo della mastite bovina.

Le batteriocine potrebbero essere vantaggiosamente utilizzate nell'industria alimentare per soddisfare ad una crescente domanda da parte del consumatore di alimenti privi di conservanti e/o additivi chimici (Ohlsson, 1994; Holzapfel et al., 1995; McMullen & Stiles, 1996; Muriana, 1996; Schillinger et al., 1996; Stiles, 1996; Cleveland et al., 2001; Chen & Hoover, 2003; Deegan et al., 2006). Per questo motivo sono state intraprese numerose ricerche sulle batteriocine, in quanto costituiscono un "additivo naturale," in grado di risolvere i problemi igienico-sanitari degli alimenti. In futuro queste sostanze potrebbero sostituire completamente gli additivi chimici quali nitrati, nitriti, acido benzoico e sorbico, anidride solforosa ecc. normalmente impiegati nell'industria alimentare.

Le batteriocine, quindi, possono essere utilizzate come bio-conservanti per controllare e contenere la popolazione batterica indesiderata e responsabile di intossicazioni e deterioramento della matrice alimentare.

Allo stato attuale delle cose, tuttavia, le sole batteriocine utilizzate in campo alimentare sono quelle prodotte dai batteri lattici.

In particolare la prima batteriocina, approvata nel 1988 dall'FDA (*Food and Drug Administration*) in qualità di bio-conservante, è stata la nisina, sostanza antimicrobica prodotta da *Lactococcus lactis* e appartenente alla classe dei cosiddetti lantibiotici.

Attualmente la nisina viene impiegata come bio-conservante alimentare in oltre 60 paesi, e rimane la sola batteriocina che può essere aggiunta ai prodotti alimentari (Delves-Broughton et al., 1996). Questo bio-conservante ha trovato larga applicazione nei prodotti di origine lattiero-casearia, nelle carni, nei prodotti vegetali (frutta

compresa), nei prodotti di panetteria e pescheria, così come in talune tipologie di bevande (Twomey et al., 2002; Ross et al., 1999; Luchansky, 1999).

Oltre che per prevenire la contaminazione da parte di batteri patogeni nei prodotti alimentari, le batteriocine possono essere impiegate anche per migliorare le caratteristiche qualitative intrinseche del prodotto stesso (Morgan et al., 1995).

Come diretta conseguenza di quanto finora sottolineato, l'utilizzo delle batteriocine potrebbe costituire uno strumento "tecnologicamente" corretto ed efficace, impiegabile nella produzione di quei prodotti definiti "di alta qualità" che si conservano per lunghi periodi di tempo in assenza di alterazioni ed in totale sicurezza mantenendo le caratteristiche organolettiche intrinseche.

Anche nell'ambito della produzione di differenti prodotti lattiero-caseari, la nisina si è dimostrata in grado di agire inibendo la produzione di spore da parte dei batteri dei generi *Bacillus* e *Clostridium*, presenti nel latte precedentemente sottoposto al solo processo di pastorizzazione (Cortezzo et al., 2004; Lopez-Pedemonte et al., 2003; Hakovirta et al., 2006).

La nisina, inoltre, si è dimostrata attiva ed efficace nei confronti di una vasta gamma di batteri Gram positivi, compresa *Listeria monocytogenes*, agente eziologico di una delle intossicazioni alimentari più frequenti e pericolose in termini sanitari, la listeriosi (Martinez and Rodriguez, 2005; Schillinger et al., 2001).

Per completare il quadro relativo alle possibilità applicative di queste sostanze antimicrobiche, va ricordato l'utilizzo di colture batteriche produttrici di batteriocine in qualità di probiotici alimentari.

Il concetto che sostiene la strategia probiotica, parte da Elia Metchnikoff, vale a dire circa cento anni fa, e si è sviluppato con gli studi di microbiologia intestinale; da una popolazione autoctona residente valutata in 1014 cellule batteriche per grammo e composta da più di 500 specie di microrganismi diversi, si sono fatti emergere i bacilli e i bifidobatteri probiotici, in quanto in grado di conferire benefici salutistici per l'uomo. È stato dimostrato che, come probiotici esogeni, questi microrganismi durante il loro transito riescono effettivamente a manifestare effetti positivi per la salute umana, anche quando non riescono ad insediarsi nel tratto digestivo, o comunque non nello stesso modo della microflora autoctona. Col termine di probiotico si intende, in modo

estremamente schematico, una preparazione a base di particolari microrganismi: anche in questo caso i batteri lattici sono quelli più ampiamente utilizzati a tale scopo infatti, una volta somministrati, migliorano le proprietà della microflora autoctona dell'organismo ricevente.

L'incorporazione dei microrganismi probiotici può essere estesa ai prodotti lattiero-caseari, alle formulazioni per l'infanzia, ai succhi di frutta, ai prodotti a base di cereali ed a taluni prodotti farmaceutici (Salminen et al., 1996, Soomro et al., 2002).

È stata inoltre evidenziata la capacità per alcune specie batteriche, nello specifico *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, di inibire la crescita di *Helicobacter pylori*, uno dei principali agenti eziologici responsabili di ulcere gastro-duodenali, grazie alla liberazione di molecole proteiche riconducibili a specifiche batteriocine. La somministrazione in forma probiotica di queste specie batteriche in soggetti geneticamente predisposti previene, in primo luogo, la formazione di ulcere a livello gastroenterico e, secondariamente, ha esitato in un diretto coinvolgimento nella stabilizzazione della barriera gastrica oltre che nella riduzione dell'infiammazione mucosale.

Dati sperimentali hanno rivelato come l'utilizzo di probiotici non porti all'eradicazione definitiva e completa di *H. pylori*, ma sia in grado di contenere il livello gastrico del patogeno, inibendo in tal modo la sintomatologia clinica (Gotteland et al., 2006; Ghosh et al., 2004; Le Duc et al., 2004).

Gli enterococchi

Gli enterococchi sono batteri Gram-positivi, catalasi-negativi, di forma coccica, hanno un contenuto nel DNA di G+C < 40 mol %, non formanti spore, ossidasi negativi, anaerobi facoltativi, singoli, a coppie od a catenelle e producono acido lattico come principale prodotto finale della fermentazione del glucosio; per questo motivo si annoverano all'interno del gruppo dei batteri lattici (LAB). Da un punto di vista tassonomico, il genere *Enterococcus* è stato rivisitato diverse volte (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1987; Stackebrandt and Teuber, 1988; Devriese and Pot, 1995; Hardie and Whiley, 1997). Originariamente, gli enterococchi erano conosciuti come streptococchi del gruppo D ma negli anni 80, in seguito a studi basati sull'ibridazione DNA-DNA e DNA-RNA, lo *Streptococcus faecalis* e lo *Streptococcus faecium* sono stati classificati nel nuovo genere *Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984, 1987); d'allora si sono avuti sviluppi significativi sia nella classificazione che nel numero di specie degli enterococchi (Devriese et al., 1993; Devriese and Pot, 1995; Stiles and Holzapfel, 1997; Franz et al., 2003; Franz and Holzapfel, 2004). Ad oggi, sulla base della vicinanza filogenetica determinata sugli studi d'ibridazione DNA-DNA e sequenziamento 16SrDNA, le specie all'interno del genere *Enterococcus* risultano 28 ed agli *E. faecium*, *E. faecalis* si sono aggiunti: *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, and *E. villorum*. Gli enterococchi presentano l'ottimo di crescita a temperatura di 35°C, anche se la maggior parte delle specie cresce a temperature comprese tra 10°C ed 45°C. Possono crescere in presenza del 6.5% di NaCl, svilupparsi a pH 9.6, e possono sopportare temperature di 60°C per 30 minuti.

Gli enterococchi, pur essendo microrganismi commensali del tratto intestinale degli animali mammiferi e dell'uomo (Noble, 1978; Devriese and Pot, 1995), sin dagli anni 80 sono stati associati ad infezioni del tratto urinario, endocarditi, bacteremia, (Murray, 1990; Morrison et al., 1997; Franz and Holzapfel, 2004) e riconosciuti come patogeni emergenti. Inoltre, possiedono un'elevata e multipla resistenza agli antibiotici,

specialmente alla vancomicina, antibiotico che insieme all'ampicillina ed alla gentamicina hanno un'ampia rilevanza clinica (Foulquiè Moreno, 2006).

Per via del loro habitat gli enterococchi possono essere utilizzati come organismi indicatori di contaminazione fecale degli alimenti e la loro presenza viene solitamente presa come indice di scarsa igiene nella preparazione delle derrate alimentari, sulle quali possono causare processi alterativi. Per contro, studi condotti su formaggi tradizionali del bacino del Mediterraneo, prodotti principalmente da latti di pecora e capra, hanno dimostrato che gli enterococchi svolgono un importante ruolo nella maturazione dei formaggi. Infatti, sono buoni produttori di sostanze aromatiche, promuovono importanti trasformazioni biochimiche e hanno buona attività lipolitica e proteolitica e quindi contribuiscono alla formazione di sapori e profumi tipici (Coppola et al., 1990; Franz et al., 1999; Giraffa et al., 1997; Giraffa G., 2003; Ledda et al., 1994; Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992; Manolopoulou et al., 2003). Gli enterococchi sono anche presenti in altri prodotti alimentari fermentati, come gli insaccati (Franz et al., 1999a, 2003; Giraffa, 2002; Hugas et al., 2003) e le olive (Fernández-Díaz, 1983; Franz et al., 1996, 1999a; Floriano et al., 1998; Ben Omar et al., 2004), ed a dispetto della preoccupazione che suscitano come patogeni opportunisti, sono stati e sono utilizzati come probiotici, in quanto produttori di batteriocine.

Inoltre, alcuni ricercatori hanno evidenziato che ceppi appartenenti alla stessa specie, isolati dal latte, risultano diversi da quelli presenti nelle feci, mettendo quindi in dubbio la fonte di contaminazione fecale (Gelsomino et al., 2002). Quindi, se si esclude che la fonte di contaminazione siano le feci degli animali stessi, l'origine degli *Enterococcus* nel latte crudo non è certa, anche se recentemente, Kagi et al. (2007), hanno confermato l'esclusione dell'inquinamento fecale degli enterococchi ma indicano l'ambiente di mungitura, le attrezzature ed il personale come fonte di contaminazione.

Le attività legate alla mungitura del latte costituiscono pertanto la principale fonte di contaminazione del latte in accordo con quanto riportato da Foschino et al. (2002) per il latte di capra crudo, da Deiana e Leori (dati non pubblicati) per il latte di pecora, da Michel et al. (2001), Polentarutti et al. (2001), Bonfoh et al. (2003) e Delbès et al. (2007) su latte crudo di vacca.

Le batteriocine da enterococchi

Gli enterococchi producono batteriocine chiamate generalmente enterocine. Il loro studio e la loro classificazione richiedono una circostanziata premessa ed un richiamo a quella che è l'attuale classificazione delle batteriocine, tra l'altro in continua evoluzione. Come precedentemente detto, Le batteriocine prodotte dai LAB sono state da [Klaenhammer \(1993\)](#) classificate in quattro classi.

Le batteriocine della classe I o 'lantibiotici' sono peptidi di piccole dimensioni, sintetizzati dai ribosomi e che subiscono una estesa modificazione post-traduzionale. Sono peptidi, attivi sulle membrane cellulari, ed hanno la caratteristica di possedere amminoacidi non tradizionali come lantionina e b-metil lantionina oltre a residui deidratati.

Le batteriocine della classe II sono piccoli peptidi (4–6 kDa), stabili al calore, non contenenti aa modificati, la cui sintesi avviene nei ribosomi, non sottoposti ad ampie modificazioni post-traduzionali ad eccezione della perdita di un peptide leader durante il trasporto all'esterno della cellula. Sono prodotte come prepeptidi che generalmente contengono una sequenza leader costituita da 14–30 aminoacidi, e sono caratterizzate dalla presenza del motivo Gly-Gly nelle posizioni -2 e -1, bersaglio del processamento post-traduzionale della pre-batteriocina. La classificazione di [Klaenhammer](#) suddivide la classe II in tre sotto gruppi (Tabella 3), mentre [Nes et al. \(1996\)](#) hanno raggruppato la classe II, mantenendo le due classi IIa e IIb ma cambiando la classe IIc includendovi le batteriocine che contengono un tipico peptide segnale e che sono inquadrate come *sec-dependent*, sulla base del loro intrinseco meccanismo di secrezione ([Pugsley, 1993](#); [Economou, 1998](#)).

[Nes et al. \(1996\)](#) hanno escluso la classe IV poichè le batteriocine di questa classe non sono state caratterizzate chimicamente. Nel sistema di classificazione proposto da [van Belkum & Stiles \(2000\)](#), le batteriocine della classe II sono state suddivise in base al numero dei residui di cisteina, usando la nomenclatura proposta da [Jack et al. \(1995\)](#). In questa classificazione, le batteriocine che sono secrete dalla via metabolica del prepeptide translocase (sec) (tipo IIc di [Nes et al., 1996](#)) non sono classificate come secrete per questa via.

Tabella 3. Confronto di sistemi classificazione per le batteriocine dei batteri lattici.

Classe	Klaenhammer (1993)	Nes et al. (1996)	van Belkum & Stiles (2000)	Franz et al., (2007)	Esempio
I	lantibiotici	lantibiotici	lantibiotici	Classe I: Enterocine lantibiotici	Citolisina , Nisina A e Z, Lattacina 481, Lattococcina S, Carnicina U149
II				Classe II: Enterocine	
IIa	Pediocina- simile o <i>Listeria</i> -attive con motivo YGNGVXC vicino all'azoto terminale e con peptide leader GG	Pediocina- simile o <i>Listeria</i> -attive con motivo YGNGVXC vicino all'azoto terminale e con peptide leader GG	Batteriocine con due ponti di solfuro con motivo YGNGVXC vicino all'azoto terminale	II.1. Enterocine della famiglia delle Pediocine	Enterocin A , Pediocina AcH/PA-1, Lattococcina A, B, M, Leucocina A, Saracina A, P, Curvacina A
IIb	Cosituite da due peptidi con peptide leader GG	Cosituite da due peptide con peptide leader GG	Batteriocine con un ponte di solfuro con motivo YGNGVXC vicino all'azoto terminale	II.2. Enterocine sintetizzate senza un peptide leader	Enterocin L50A , Lattococcina G, M e Lattacina F
IIc	Peptidi thio- attivati con peptide leader GG	Batteriocine secrete per mezzo di peptide segnale	Batteriocine con un ponte di solfuro senza motivo YGNGVXC vicino all'azoto terminale	II.3. Altre enterocine lineari non pediocina- simili	Enterocin B , Lattococcina B
D	-	-	Batteriocine con uno o nessun residuo di cisteina		
E	-	-	Cosituite da due peptidi con peptide leader GG		
F	-	-	Batteriocine atipiche		
				Classe III. Peptidi ciclici antibatterici	Enterocin AS-48
III	Proteine di grandi	Proteine di grandi	Proteine di grandi	Classe IV. Proteine di	Enterolisina A ,

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

	dimensioni e termosensibili	dimensioni e termosensibili	dimensioni e termosensibili	grandi dimensioni	Helveticina J, Helveticina 1829, Acidofilina A, Lattacina A e B
IV	Proteine complesse				Plantaricina S, Leucocina S, lattacina 27, Pediocina SJ-1

Le batteriocine da enterococchi sono state collocate all'interno (Tabella 4) della classe I, classe IIa, classe IIc, e classe III delle batteriocine (Foulquié Moreno et al., 2006).

Tabella 4. Enterocine prodotte da enterococchi (Foulquié Moreno et al., 2006)

Class I	Producer strain	Amino acid sequence of the purified enterocin		Reference ^a	
Cyl L _L	<i>E. faecalis</i> DS16	MENLSVVPSEELSVEEMAIQGGSDVQAETTPV-CAVAATAAASSAACGWVGGGIFTGVTVVVSLKHC		Gilmore et al., 1994	
Cyl L _S	<i>E. faecalis</i> DS16	VLNKENQENYYSNKLELVGPSFEELSLEEMAIQGS-SDVQAETTPACFTIGLVGALFSAKFC		Gilmore et al., 1994	
Class IIa	Producer strain	MM ^b	Amino acid sequence of the purified enterocin	pI ^c	Reference
Enterocin A	<i>E. faecium</i> CTC492	4833	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATT-CIAGMSIGGFLGGAIPGKC KYYGNGVTLNKXGXSVMXXXA...	9.0	Aymerich et al., 1996
Enterocin CRL 35	<i>E. faecium</i> CRL 35				Fariás et al., 1996
Bacteriocin 31	<i>E. faecalis</i> YI717	5009	ATYYGNGLYCNKQKCVVDWNKASREIGKII-VNGWVQHGPWAPR	9.7	Tomita et al., 1996
Enterocin P	<i>E. faecium</i> P13	4630	ATRSYNGVYCNNSKCVVNWGEAKENIAGI-VISGWASGLAGMGH	8.3	Cintas et al., 1997
Mundticin	<i>E. mundtii</i> AT06	4290	KYYGNGVSCNKKGCSVDWKGKAIIGIINNSA-ANLATGGAAGWSK	9.8	Bennik et al., 1998
Bacteriocin RC714	<i>E. faecium</i> RC714	4937	ATYYGNGLYCNKQKCVVDWNQAKGEIGKII-VNGWVNHGPWAPR	9.3	del Campo et al., 2001
Enterocin SE-K4	<i>E. faecalis</i> K-4	4918	ATYYGNGVYCNKQKCVVDWSRARSEIIDRG-VKAYVNGFTKVLG	9.6	Eguchi et al., 2001
Class IIc	Producer strain	MM	Amino acid sequence of the purified enterocin	pI	Reference
Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i> S-48	7167	MAKEFGIPAAGVGTVLNVVEAGGWVTTIVSILTAV-GSGGLSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKGRAVIAW	10.6	Martínez-Bueno et al., 1994
Enterocin B	<i>E. faecium</i> T136	5465	ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGAAIAGGLFGIP-KGPLAWAAGLANVYSKCN	9.6	Casaus et al., 1997
Enterocin L50A	<i>E. faecium</i> L50	5190	MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEWAIN-KIIEWIKKHI	10.4	Cintas et al., 1998b
Enterocin L50B	<i>E. faecium</i> L50	5178	MGAIAKLVTKFGWPLIKKFKYKQIMQFIGQGWITD-QIEKWIKRH	10.7	Cintas et al., 1998b
Enterocin EJ97	<i>E. faecalis</i> EJ97	5328	MLAKIKAMIKKFPNPTLAAKLTTYEINWYKQQ-YGRYPWERPVA	10.8	Gálvez et al., 1998; Sánchez-Hidalgo et al., 2003
Enterocin Q	<i>E. faecium</i> L50	3952	MNFLKNGIAKWMTGAEIQAQYKYYKGLPWEKISC	9.7	Cintas et al., 2000
Enterocin 1071A	<i>E. faecalis</i> BEF 1071	4286	ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVNQA-DRINRKKH	10.3	Balla et al., 2000; Franz et al., 2002
Enterocin 1071B	<i>E. faecalis</i> BEF 1071	3899	GPGKWLPWLPQPAYDFVTGLAKGIGKEGKKNKWKNV	10.4	Balla et al., 2000; Franz et al., 2002
Enterocin RJ-11	<i>E. faecalis</i> RJ-11	5049	APAGLVAKFGRPIVKKYYKQIMQFIGEGSAINKIIP-WIARMWRT	11.1	Yamamoto et al., 2003
Class III	Producer strain	MM	Amino acid sequence of the purified enterocin	pI	Reference
Enterolysin A	<i>E. faecalis</i> LMG 2333	34501	ASNEWSWPLGKPYAGRYEEGQFGNTAFNRGGTY-FHDGDFDGSAYGNGSVYAVHDGKILYAGWDPVGG-GSLGAFIVLQAGNTNVYQEFSTRNVGDIVSTGQTV-KKGQLIGKFTSSHLHLGMTKKEWRS AHSSWNKDD-GTWFNPIPILOGGSTPTPPNPGPKNFTNVRYGLRV-LGGSWLPEVTNFNTNDGFAGYPNRQHDMLYIKVD-KGQMKYRVHTAQSGWLPWVSKGDKSDTVNGAAGM-PGQAIDGVQLNYITPKGEKLSQAYYRSQTTKRSGLW-KVSADNGSIPGLDSYAGIFGEPLDRLQIGISQSNPF	9.5	Nilsen et al., 2003

^a Reference dealing with the actual purification and amino acid sequence analysis.

^b MM (Da) calculated theoretically from the amino acid sequence (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/proteincalc.html>).

^c pI calculated theoretically from the amino acid sequence (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>).

Altre batteriocine da enterococchi che inizialmente sono state considerate come nuove enterocine, ma che sono risultate essere identiche a quelle già conosciute, sono elencate nella Tabella 5 (Foulquié Moreno et al., 2006).

Tabella 5. Enterocine descritte in letteratura come simili ad altre già note.

Enterocin	Actual enterocin	Producer strain	Reference
Enterocin 4	Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i> INIA 4	Joosten et al., 1996
Enterococcin EFS2		<i>E. faecalis</i> EFS2	Maisnier-Patin et al., 1996
Bacteriocin 21		<i>E. faecalis</i> OG1X	Tomita et al., 1997
Enterocin 7C5		<i>E. faecium</i> 7C5	Folli et al., 2003
Enterocin 900	Enterocin A	<i>E. faecium</i> BFE 900	Franz et al., 1999b
Enterocin 1146		<i>E. faecium</i> DPC1146	O'Keefe et al., 1999
Enterocin EFM01		<i>E. faecium</i> EFM01	Ennahar and Deschamps, 2000
Enterocin P21		<i>E. faecium</i> P21	Herranz et al., 2001
Enterocin 81		<i>E. faecium</i> WHE 81	Ennahar et al., 2001
Enterocin N15		<i>E. faecium</i> N15	Losteinkit et al., 2001
Enterocin BC25		<i>E. faecium</i> BC25	Morovský et al., 2001
Enterocin CCM 4231		<i>E. faecium</i> CCM 4231	Foulquié Moreno et al., 2003a
Enterocin 900	Enterocin B	<i>E. faecium</i> BFE 900	Franz et al., 1999b
Enterocin P21		<i>E. faecium</i> P21	Herranz et al., 2001
Enterocin 81		<i>E. faecium</i> WHE 81	Ennahar et al., 2001
Enterocin RZS C13		<i>E. faecium</i> RZS C13	Foulquié Moreno et al., 2003a
Enterocin RZS C5		<i>E. faecium</i> RZS C5	Foulquié Moreno et al., 2003a
Enterocin I	Enterocin L50	<i>E. faecium</i> 6T1a	Florianio et al., 1998
Enterocin B2		<i>E. faecium</i> B2	Moreno et al., 2002
Enterocin AA13	Enterocin P	<i>E. faecium</i> AA13	Herranz et al., 1999
Enterocin G16		<i>E. faecium</i> G16	Herranz et al., 1999
Enterocin B1		<i>E. faecium</i> B1	Moreno et al., 2002
Enterocin B2		<i>E. faecium</i> B2	Moreno et al., 2002
Enterocin 1071A	Enterocin 1071A	<i>E. faecalis</i> FAIR-E 309	Franz et al., 2002
Enterocin 1071B	Enterocin 1071B	<i>E. faecalis</i> FAIR-E 309	Franz et al., 2002
Enterocin B2	Enterocin 1071	<i>E. faecium</i> B2	Moreno et al., 2002

Le enterocine prodotte da *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus mundtii* includono le ben caratterizzate enterocine A, P, CRL35, 1071A e B, mundticina, mundticina KS, batteriocina 31, RC714, T8 e l'enterolysina A. Queste batteriocine vengono facilmente raggruppate nell'attuale sistema di classificazione delle batteriocine di Klaenhammer (1993) e Nes et al. (1996), ma le enterocine AS-48, B, EJ97, RJ11, MR10A&B, Q ed L50A&B e la batteriocina 32 avendo una struttura inusuale, differiscono dalle batteriocine conosciute prodotte dagli altri LAB, che impedisce il loro raggruppamento all'interno dell'attuale sistema di classificazione.

Alcuni dei criteri utilizzati nella classificazione delle batteriocine sono non appropriati quando vengono applicati alle sole enterocine. Infatti, mentre alcune di queste possono essere raggruppate secondo lo schema classico di classificazione adottato per le altre batteriocine prodotte dai LAB, altre sono atipiche e distinte strutturalmente dalle classi generali in cui sono collocate le batteriocine. Ad esempio, le batteriocine formate da due peptidi, che nella classificazione generale delle batteriocine

sono raggruppate da Klaenhammer nella sottoclasse IIb, nel caso delle batteriocine da enterococchi possono essere trovate in diverse classi. Inoltre, sebbene i due peptidi agiscano solitamente in sinergia, in diversi casi ciascuno dei due componenti ha mostrato di possedere attività antimicrobica propria (Garneau et al., 2002). Anche i ponti di solfuro possono essere trovati in diverse batteriocine, e probabilmente stabilizzano le strutture di batteriocine differenti in funzione della loro posizione nella sequenza primaria.

Franz et al., (2007) hanno proposto una nuova classificazione delle batteriocine da enterococchi (tabelle 3,6,7), in particolare per quel che riguarda i tre sottogruppi della classe II, scegliendo come criteri principali la similarità della struttura e della sequenza aminoacidica ed il tipo di modificazione post-traduzionale, con lo scopo di arrivare ad una più naturale classificazione delle batteriocine.

Lo schema di classificazione semplificato proposto da Franz et al., (2007) include quattro classi: enterocine di classe I o lantibiotici, enterocine di classe II (peptidi piccoli non lantibiotici), enterocine di classe III (enterocine cicliche) ed enterocine di classe IV (proteine di notevoli dimensioni). La classe II può essere suddivisa in tre sottoclassi: II.1, enterocine della famiglia delle Pediocine; II.2, enterocine sintetizzate senza un peptide leader e II.3, altre enterocine lineari non Pediocina-simile.

Tabella 6. Confronto dei sistemi di classificazione generali delle batteriocine e la recente proposta di classificazione delle batteriocine da enterococchi di Franz et al., (2007).

Class	Klaenhammer (1993)	Nes et al. (1996)	van Belkum & Stiles (2000)	Proposed classification	Example
I	Lantibiotics	Lantibiotics	Lantibiotics	Class I. Lantibiotic enterocins	Cytolysin
IIa	Pediocin-like or 'Listeria'-active with YGNGVXC motif near N-terminus and GG leader peptide	Pediocin-like or 'Listeria'-active with YGNGVXC motif near N-terminus and GG leader peptide	Cystibiotics* with two disulphide bridges with YGNGVXC motif near N-terminus	Class II enterocins II.1. Enterocins of the pediocin family	Enterocin A
b	Two-component peptides with GG leader peptide	Two-component peptides with GG leader peptide	Cystibiotics with one disulphide bridge with YGNGVXC motif near N-terminus	II.2. Enterocins synthesized without a leader peptide	Enterocin L50A
c	Thiol-activated peptides with GG leader peptide	Bacteriocins secreted by signal peptide pathway	Cystibiotics with one disulphide bridge but without YGNGVXC motif near N-terminus	II.3. Other linear nonpediocin-like enterocins	Enterocin B
d	-	-	Thiolbiotics* with one or no cysteine residues		
e	-	-	Two-component peptides with GG leader peptide		
f	-	-	Atypical bacteriocins	Class III. Cyclic antibacterial peptides	Enterocin AS-48
III	Large, heat-labile proteins	Large, heat-labile proteins	Large, heat-labile proteins	Class IV. Large proteins	Enterolysin A
IV	Protein complexes	-	-		

*Terminology from Jack et al. (1995).

Tabella 7. Nuova classificazione, sequenza aminoacidica e peso molecolare delle enterocine mature (Franz et al., (2007).

Enterocin	Amino acid sequence of mature peptide	molecular weight (Da)
Class I. Lantibiotic enterocins		
Cytolysin (Cyl _L -)	TTPVCAVAATAAASAAACGWVGGIPTGVTVVVSLKHC	3437
Cytolysin (Cyl _S -)	TPPACFTIIGLVGALFSAKFC	2031
Class II enterocins		
Class II.1. Enterocins of the pediocin family		
Enterocin A	TTTSHGKYNGVYCTKNNCTVDWAKATTCTIACMSITGGPLGGAIPGKC	4829
Mundlicin	KYYGNGVSCNKKGCSVDWCKAIGIICNNSAANLATCGAAGWSK	4287
Mundlicin KS	KYYGNGVSCNKKGCSVDWCKAIGIICNNSAANLATCGAAGWSK	4287
Enterocin CRL35	KYYGNGVSCNKKGCSVDWCKAIGIICNNSAANLATCGAAGWSK	4289*
Bacteriocin 31	ATYYGNGLYCNKQKQWVDWFKASREIGKIIVNGWVHGPWAPR	5008*
Bacteriocin RC714	ATYYGNGLYCNKQKQWVDWFKASREIGKIIVNGWVHGPWAPR	4780
Bacteriocin T8	ATYYGNGLYCNKQKQWVDWFKASREIGKIIVNGWVHGPWAPR	5100
Enterocin SE-K4	ATYYGNGVYCNKQKQWVDWFKASREIDRQVYVNGPTKVLG	5356
Enterocin P	ATRSYGNVYCNNSKQWVWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMCH	4993*
Class II.2. Enterocins synthesized without a leader peptide		
Enterocin L50A	MGAIAKLVAKPGWPIVKKYKQIMQPIGEGWAINKIIEWIKKHI	5190
Enterocin MR10A [†]	MGAIAKLVAKPGWPIVKKYKQIMQPIGEGWAINKIIDWIKKHI	5202
Enterocin RJ-11 [†]	APAGLVAKPGRPIVKKYKQIMQPIGEGSAINKIIPWIAWMWT	5177*
Enterocin L50B	MGAIAKLVTKPGWPLIKKPKYKQIMQPIQQGWTIDQIEKWLKRH	5178
Enterocin MR10B [†]	MGAIAKLVAKPGWPIKPKPKYKQIMQPIQQGWTIDQIEKWLKRH	5208
Enterocin Q	MNFKNGIAKWMTGABELQAYKXKYGCLDWEIISC	3950
Enterocin EJ97	MLAKIKAMIKKPPNPYTLAAKLITTYBINWYKQYGRYWPVERPVA	5340
Class II.3. Other linear nonpediocin-like enterocins		
Enterocin 1071A	ESVPSKIGNAVGPAAYMILKGLGNMSDVNQADRINRKH	4284
Enterocin 1071B	GPGKWLFWLQPAYDFVTGLAKGIGRGNFNWVHWV	3897
Enterocin B	ENDHRMPNELNRPNLNRSGGAKCGAIAAGLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN	5463
Bacteriocin 32 [‡]	FTPSVSPSQNGGVVEAAAQRGVIYKPKYKQAKVPKVKMLNIRGKQRTCYLMSWTAASSRTAKYYYYYI	7998*
Class III. Cyclic antibacterial peptides		
Enterocin AS-48	MAKEPGIPAAVAGTVLNVVVEAGGWTTIIVSILTAVSGGSLSLAAAGRESIKAYLKKKEIKKKGKRAVIAM	7149
Enterocin AS-48 RJ	MAKEPGIPAAVAGTVLNVVVEAGGWTTIIVSILTAVSGGSLSLAAAGRESIKAYLKKKEIKKKGKRAVIAM	7125
Class IV. Large proteins		
Enterolysin A	ASNEWSWPLGKPYAGRYEBQQQFNDAFNRGGTYFHDGDFDGSATYNGSVYAVHDGKILYAGWDPVGGSLGAPIVLQAGNTNVIYQEFBSNVG DLKYSTQTVKKGQLIGKPTS SHLHLGTMKKEWRSAHS SWNKDDGTWENPILPLQGGSTPTPNPGPKNFNTNRYGLRVLGGSWLPEVTN FNNTNDGPAGYPNRQHDMLYIKVDRQQMKYRVHTAQSGWLPWVSKGDKSDTVNGAAGMPQAIDGVQLNVIITPKGKLSQAYYRSQTTK RSGMLKVSADNGSIPGLDSYAGIFGEPLDRLQIGISQSNPF	34501

Blue, amino acid residues conserved in all bacteriocins of the same group.

Red, residues conserved to a variable degree.

*Theoretical molecular weight was calculated from deduced amino acid sequence with DNASTAR programme.

[†]RJ-11, MR10A and MR10B: leader peptide not determined.

[‡]Putative sequence of the mature peptide deduced from the bacteriocin structural gene.

Enterocine lantibiotici Classe I

La Citolisina.

La Citolisina prodotta da *E. faecalis* è la sola enterocina tipo-lantibiotico attualmente conosciuta (Booth et al., 1996). La citolisina è una batteriocina a due peptide ed entrambe le subunità strutturali contengono residui di lanthionina (Booth et al., 1996). La Citolisina è emolitica ed è attiva sia contro cellule eucariotiche (eritrociti) sia contro batteri Gram-positivi (Gilmore et al., 1994; Booth et al., 1996). Poiché la Citolisina è una batteriocina a due componenti consistenti di due peptidi lineari, è strutturalmente differente dagli altri lantibiotici lineari, quali la Nisina A e Z, che sono costituiti da un singolo peptide lineare. Inoltre, è anche differente dai lantibiotici del gruppo B, piccolo e globulari, che sono prodotti principalmente dagli *Streptomyces* (Jung, 1991; de Vos et al, 1995; Sahl et al., 1995). Ciononostante, il fatto che questa

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

batteriocina contenga residui di Lanthionina, indica che debba essere considerata come un lantibiotico a due componenti.

Enterocine della classe II.

Classe II.1 Enterocine della famiglia delle Pediocine

Le batteriocine Pediocine-simili sono un gruppo ben conosciuto di peptide antimicrobici. Sono caratterizzati dalla presenza di una regione cationica idrofila con una sequenza conservata YGNGVXC ‘pediocin box’ e due residui di cisteina uniti da un ponte S–S che stabilizza la struttura a β -sheet. Attraverso l’uso di vescicole fosfolipidiche è stato dimostrato che interazioni elettrostatiche dei residui N-terminali carichi positivamente e non il motivo-consenso YGNGVXC regolano il legame della Pediocina PA-1 (Chen et al., 1997). Comunque, sostituzioni operate nella sequenza YGNGVXC della Pediocina PA-1 e Carnobacteriocina B2 hanno portato ad una riduzione dell’attività antibatterica contro gli organismi bersaglio (Quadri et al., 1997, Miller et al., 1998).

La porzione C-terminale delle batteriocine Pediocina-simili presenta maggiori differenze nella sequenza aminoacidica, distinguendo conseguentemente tre relativi sottogruppi (Fimland et al., 2005). I peptidi dei sottogruppi 1 e 2 formano una struttura C-terminale hairpin-like stabilizzata da residui di cisteina e/o triptofano che sono presenti o vicini alla porzione C-terminale, mentre i peptidi del terzo sottogruppo mancano di questi residui stabilizzanti la struttura. Comunque, tutti contengono un triptofano residuo nel mezzo della porzione C-terminale che può posizionarsi nell’interfaccia della membrana e stabilizzare la struttura della batteriocina durante l’interazione con la membrana batterica.

L’enterocine della classe II.1 o enterocine della famiglia delle Pediocine comprendono due sottogruppi sulla base della similarità delle sequenze, corrispondenti ai sottogruppi 1 e 3 descritte da Fimland et al. (2005) (Fig. 5). Il primo sottogruppo include l’enterocina A, le mundticine e l’enterocina CRL35, mentre il secondo gruppo è rappresentato dalla bacteriocina 31, bacteriocina T8, bacteriocina RC714, enterocina SEK4 and enterocina P. Le batteriocine del primo sottogruppo contengono sette unici

aminoacidi residui conservati che le distinguono dalle batteriocine del secondo sottogruppo che, per contro, contengono sei unici aminoacidi residui conservati, incluse Ala e Thr in prima e seconda posizione nella parte N-terminale.

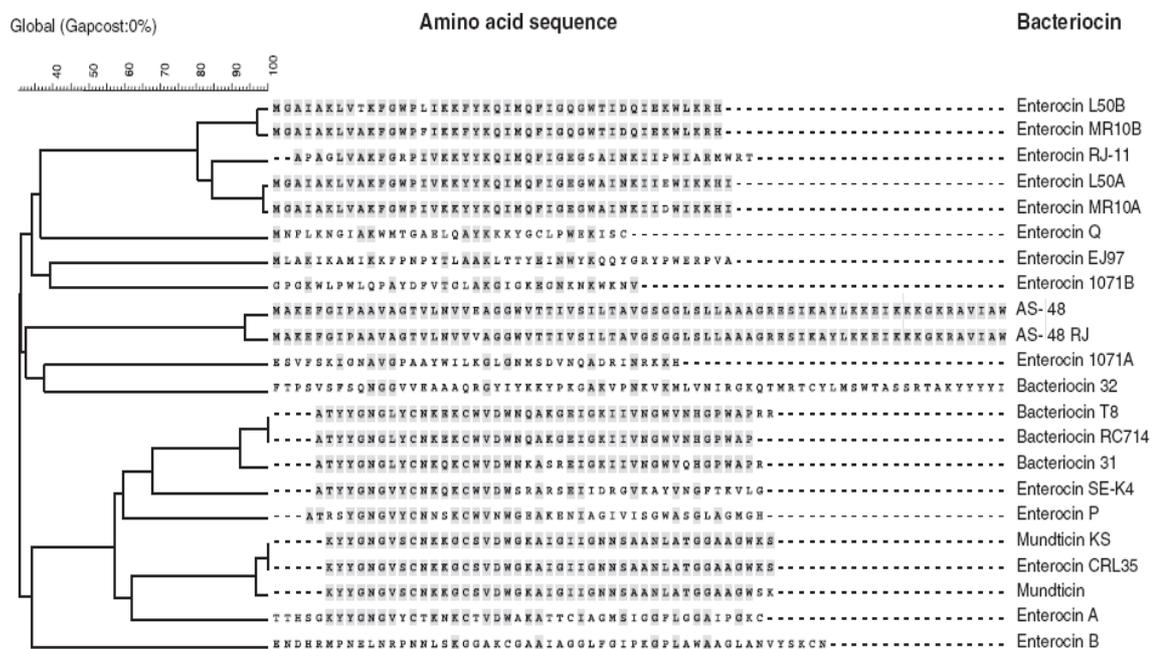


Figura 5. Analisi dei clusters delle batteriocine da enterococchi in base all'omologia delle sequenze. Gli aminoacidi consenso sono indicati in blocchi.

Enterocina A.

Enterocina A (EntA) è costituita da 47 aminoacidi con un peso molecolare di 4829 Da (Tabella 7), contiene la caratteristica sequenza YGNGVXC nella porzione N-terminale e quattro residui di cisteina che si pensa formino due ponti di solfuro. Queste caratteristiche la rendono equivalente alla pediocina PA-1/AcH (Marugg et al., 1992). EntA è prodotta da diversi ceppi di *E. faecium*: CTC492, T136 and P21, che sono stati isolati da insaccati fermentati Spagnoli (Aymerich et al., 1996; Casaus et al., 1997; Herranz et al., 2001); dal ceppo BFE 900 isolato da olive nere; dai ceppi DPC 1146, WHE 81 e EFM01 da derivati lattiero-caseari (Franz et al., 1999b; O'Keefe et al., 1999; Ennahar & Deschamps, 2000; Ennahar et al., 2001); e dal ceppo N5 isolato dal nuka, una pasta di riso Giapponese (Losteinkit et al., 2001). EntA è attiva contro *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus spp.*, come anche contro *Listeria spp.*,

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Bacteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

inclusa la *L. monocytogenes*. L'attività contro la *L. monocytogenes* è un aspetto caratteristico delle batteriocine della classe IIa (Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996).

Mundticina e Mundticina KS.

La Mundticina prodotta da *E. mundtii* ATO6, isolato da vegetali processati (Bennik et al., 1998) e la Mundticina KS prodotta da *E. mundtii* NFRI 7393 (Kawamoto et al., 2002), sono praticamente identiche ad eccezione per gli ultimi due aminoacidi della parte C-terminale, che sono invertiti (Tabella 7). La Mundticina consiste di 43 aminoacidi e contiene il motivo consenso YGNGVXC, come anche un singolo ponte di solfuro nella porzione N-terminale della molecola, mentre manca il ponte di solfuro stabilizzante la parte C-terminale, nonostante contenga due triptofano residui conservati al centro della regione C-terminale. La Mundticina ha un peso molecolare di 4287 Da, così come determinato attraverso la spettrometria di massa (Bennik et al., 1998). Le batteriocine mature contengono 43 aminoacidi (Tabella 2) e la mundticina KS è prodotta come preproteina recante un peptide leader di 15 aminoacidi del tipo con doppia glicina (Kawamoto et al., 2002). Lo spettro di attività di queste due mundticine include *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus spp.*, come anche i patogeni di origine alimentari *L. monocytogenes* e *C. botulinum*. Le differenze nello spettro di attività di queste due batteriocine, specialmente contro le specie del genere *Lactobacillus*, sono attribuite alle differenze nella sequenza (Kawamoto et al., 2002). Le mundticine presentano similarità di sequenza alle batteriocine della classe II come la piscicolina 126, la sakacina P, la pediocin PA-1, la leucocina A, la mesentericina Y105, le carnobacteriocine BM1 and B2, la curvacina A e la sakacina A (Bennik et al., 1998).

Enterocina CRL35.

L'Enterocina CRL35 prodotta da *E. mundtii* CRL35 (citato inizialmente come *E. faecium*), microrganismo isolato da un formaggio artigianale Argentino, contiene la sequenza YGNGV vicino al N-terminale (Farras et al., 1996). L'Enterocina CRL35 è un peptide a 43 aminoacidi con una massa molecolare di 4900 Da. La sequenza peptidica è stata determinata recentemente (Saavedra et al., 2004), e risulta essere simile a quella

della mundticina KS (Tabella 2), con l'unica variante che il peptide leader dell'enterocina CRL35 differisce, da quello della mundticina KS per due aminoacidi residui. L'enterocina CRL35 mostra sia attività antilisteria che antivirale (Wachsman et al., 1999).

Batteriocina 31.

Questa batteriocina è prodotta da *E. faecalis* YI717, che è stato isolato da un campione clinico (Tomita et al., 1996). La batteriocina matura consiste di 43 aminoacidi (Tabella 2) e mostra attività contro *Enterococcus spp.* e *L. monocytogenes*. Presenta una sequenza YGNGLXC nella parte N-terminale che differisce dal motivo conservato YGNGVXC delle batteriocine proprie delle classi IIa e IIb della classificazione di Nes et al. (1996) e la conseguenza di tale variazione non è chiaro. Tuttavia, la batteriocina 31 mostra similarità di sequenza con altre batteriocine della classe II quali le sakacine A e P, la curvacina A, la carnobacteriocina BM1 e la leucocina A (Tomita et al., 1996).

Batteriocina RC714.

La Batteriocina RC714 è stata isolata da un ceppo di *E. faecium* vancomicina resistente (Del Campo et al., 2001) e la sequenza peptidica contiene 42 aminoacidi residui con similarità del 88% con la batteriocina 31 (Tabella 2).

Batteriocina T8/batteriocina 43.

La batteriocina T8 viene prodotta dall' *E. faecium* T8 che è stato isolato dalla secrezione vaginale di una bambina affetta da HIV (de Kwaadsteniet et al., 2006). A livello di composizione aminoacidica, presenta un livello di omologia del 98% con la batteriocina RC714, seppur più lunga di due aminoacidi residui, ed omologa per l'88% con la batteriocina 31. La batteriocina matura che è formata da una sequenza di 44 aminoacidi ed ha un peso molecolare calcolato di 5.1 kDa (de Kwaadsteniet et al., 2006), così come nel caso della batteriocina 31 presenta una sequenza conservata YGNGLXC, dove la valina conservata della sequenza tipica YGNGVXC è sostituita da

una leucina. Inoltre, presenta due residui di cisteina nella metà N-terminale della molecola e due residui di triptofano vicino alla parte C-terminale. Il gene strutturale della batteriocina T8 è allocato su un plasmide di 7-kb. La batteriocina T8 è risultata essere attiva contro ceppi patogeni del tratto urogenitale di *E. faecalis*, un *Lactobacillus sp.*, due *Enterococcus sp.*, ed un *Propionibacterium sp.*

Il ceppo di *E. faecium* VRE82, vancomicina-resistente, isolato da un campione clinico, produce un peptide antimicrobico che è stato chiamato batteriocina 43 (Todokoro et al., 2006). Il gene strutturale per la batteriocina 43 (bacA) codifica per un precursore di 74 aminoacidi residui, ed è seguito da una ORF (bacB) codificante una proteina immunitaria di 95 aminoacidi, i cui prodotti presentano una identità del 100% con le proteine immunitarie e strutturali, rispettivamente, della batteriocina T8 descritta da de Kwaadsteniet et al. (2006) e della hiracina JM79 prodotta dall'*Enterococcus hirae* DCH5 isolato dall'anitra selvatica. I determinanti genetici della batteriocina 43 sono allocati in un plasmide di 6.2 kb. Todokoro et al. (2006) riportano che la batteriocina 43 è attiva contro *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* e *L. monocytogenes*.

Enterocina SE-K4.

L'enterocina SE-K4 è prodotta da un ceppo di *E. faecalis* isolato da insilato (Eguchi et al., 2001). Una volta purificata è risultata essere costituita da 43 aminoacidi con un peso molecolare determinato sperimentalmente di 5356.2 Da (Eguchi et al., 2001). Mostra un alto grado di omologia con le batteriocine 31 e T8 (Tabella 2). Il plasmide pEK4S di 60-kb è coinvolto nella produzione dell'immunità verso l'enterocina SE-K4 (Doi et al., 2002). Questa batteriocina mostra attività antimicrobica contro i batteri Gram-positivi, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Bacillus subtilis*, *C. beijerinckii* e *L. monocytogenes*.

Enterocina P

L'enterocina P che viene prodotta dagli stipiti di *E. faecium* P13, AA13, G16 e L50 isolati da insaccati fermentati di produzione Spagnola (Cintas et al., 1997, 2000; Herranz et al., 1999), presenta un ampio spettro di azione che include attività contro *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus spp.*, come anche i batteri patogeni di

provenienza alimentare *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* (Cintas et al., 1997). L'enterocina matura consiste di 44 aminoacidi, ha un peso molecolare di 4493 Da (Tabella 2) ed è prodotta come prepeptide di 71 aminoacidi con un peptide segnale di 27 aminoacidi. Se allineato con il peptide segnale della batteriocina 31, il peptide segnale della batteriocina P mostra di dividerne sequenze identiche di 12 aminoacidi (Cintas et al., 1997). Il gene strutturale dell'enterocina P è stato sequenziato e clonato e risulta contenuto all'interno di un frammento di DNA cromosomico di 755-bp. L'enterocina P ha similarità nella sequenza con altre batteriocine della classe II contenendo il motivo YGNGVXC (Cintas et al., 1997) e condivide con la batteriocina 31 diversi aminoacidi residui conservati, incluso un triptofano residuo (Trp35) nella sua porzione C-terminale (Fig. 5).

Classe II.2. Enterocine sintetizzate senza un peptide leader.

Questo gruppo include diverse batteriocine che mancano del motivo YGNGVXC e sono sintetizzate senza peptide leader richiedenti sistemi di trasporto all'esterno specifici. Un sottogruppo principale comprende le batteriocine a due peptidi enterocina L50 ed i peptidi altamente affini MR10A e MR10B (Fig. 5). Rientrano in questo gruppo altre batteriocine senza peptide leader costituite da peptidi singoli come l'enterocina RJ-11, enterocina Q e l'enterocina EJ97 che sono accomunati dall'avere residui conservati di Lys10 e Lys21 (Lys8 e Lys19 in enterocina RJ-11).

Enterocina L50.

L'enterocina L50 è una batteriocina plasmidiale che è prodotta da *E. faecium* L50 e 6T1a (Cintas et al., 1998; Floriano et al., 1998), ed anche da *E. faecium* F58 isolato dal jben, un formaggio tradizionale del Marocco (Achemchem et al., 2005). È stato dimostrato in vitro da Cintas et al. (1998) che l'enterocina L50 consiste di due peptidi, L50A and L50B, che individualmente possiedono attività antimicrobica e che esibiscono azione sinergica quando sono combinati. Il peptide L50A è formato da 44 aminoacidi mentre il peptide L50B presenta 43 aminoacidi ed hanno peso molecolare teorico rispettivamente di 5190 e 5178 Da (Tabella 7), (Cintas et al., 1998; Floriano et

al., 1998). I due peptidi hanno in comune 31 aminoacidi residui ed hanno similarità per il 72%. L'enterocina L50 esibisce un ampio spettro antimicrobico ed è attivo contro ceppi di *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* come anche i patogeni di origine alimentare *L. monocytogenes* e *B. cereus* (Cintas et al., 1998; Floriano et al., 1998).

Enterocina RJ-11.

L'enterocina RJ-11 è una enterocina con un peso molecolare calcolato di 5049 Da ed è prodotta dall'*E. faecalis* RJ-11 che è stato isolato da riso bran. È una batteriocina altamente omologa con il peptide EntL50A (Yamamoto et al., 2003). Comunque, data la mancanza attuale di dati genetici, non si conosce se il gene strutturale RJ-11 codifichi per qualche peptide leader.

Enterocine MR10A ed MR10B.

L'enterocine MR10A ed MR10B sono due peptidi antimicrobici con peso molecolare di 5201.58 and 5207.7 Da, che sono stati purificati recentemente da un ceppo di *E. faecalis* isolato dalla ghiandola uropigiale dell'upupa (*Upupa epops*) (Martin-Platero et al., 2006). Queste enterocine sono altamente omologhe con l'enterocine L50A e L50B, essendo le sequenze quasi identiche, eccetto per un cambio conservativo (Glu 38 per Asp) in MR10A e due cambi nei residui (Thr 9 per Ala, e Leu15 per Phe) in MR10B. Entrambi i peptidi mostrano un ampio spettro antimicrobico ed agiscono anche in sinergia. Non è noto se queste due batteriocine siano sintetizzate anche senza un peptide leader, ma sembra che i loro determinanti genetici siano situati nel cromosoma batterico (Martin-Platero et al., 2006).

Enterocina Q

L'enterocina Q è prodotta, al pari dell'enterocine L50 ed enterocine P, dall' *E. faecium* L50 (Cintas et al., 2000). L'enterocina Q è relativamente piccola essendo costituita da 34 aminoacidi ed ha una massa molecolare teorica di 3952 Da (Tabella 7) (Cintas et al., 2000). Risulta simile alla EntL50 e non è prodotta come prepeptide. L'enterocina Q non contiene la sequenza consenso YGNGVXC, ma presenta due residui di cisteina (Cys26 e Cys34) e questo suggerisce che un ponte di solfuro è

presente fra i residui di cisteina (Cintas et al., 2000). Contrariamente ad altre batteriocine come l'enterocina B e la carnobatteriocina A, il ponte di zolfo does not span le sezioni N e C della molecola oppure la parte N-terminale. Infatti, è situato nella metà C-terminale della molecola. Il gene strutturale dell'enterocina Q (entqA) è localizzato nel plasmide 7.4-kb plasmid pCIZ2 dell'*E. faecium* L50.

Enterocina EJ97.

L'enterocina EJ97 è prodotta dall'*E. faecalis* EJ97 che è stato isolato da acque pubbliche di scarico. EntEJ97 ha un ampio spettro di attività contro batteri Gram-positivi inclusi altri enterococchi, diverse specie di *Bacillus*, *Listeria* come anche ceppi di *S. aureus* (Gàlvez et al., 1998) e la spettrometria di massa indica che la batteriocina purificata ha una massa di 5340 Da. I geni per la produzione della batteriocina EJ97 sono situati su un plasmide pEJ97 di 60kb ed il gene strutturale codifica una batteriocina di 44 aminoacidi (Tabella 7) (Sánchez- Hidalgo et al., 2003). EntEJ97 mostra alcune omologie con altre batteriocine di questo gruppo, inclusi tre residui conservati di lisina (Lys6, Lys10, Lys21), uno conservato Ile27 ed anche un residuo conservato di triptofano vicino alla porzione C-terminale (Trp39).

Classe II.3. Altre enterocine lineari, non pediocina-simili.

In questo gruppo rientrano quelle batteriocine tra loro non simili e che sono sintetizzate senza un peptide leader. In alcuni casi, la loro attività antimicrobica può essere potenziata dalla presenza di un secondo peptide, così come avviene nella enterocina 1071, pur tuttavia vengono incluse anche batteriocine costituite da un singolo peptide.

Enterocina 1071.

L'enterocina 1071 è prodotta dai ceppi di *E. faecalis* BFE1071 e FAIR-E 309 (Balla et al., 2000; Franz et al., 2002) consiste di due peptidi, l'enterocina 1071A e l'enterocina 1071B. Queste batteriocine sono attive contro un ampio spettro di batteri Gram positivi compresi ceppi di *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*,

Streptococcus, *Micrococcus* e *Listeria spp.* I determinanti genetici per questa batteriocina a due peptidi sono localizzati su DNA plasmidico e la relativa sequenza rivela due ORFs codificanti i 39 ed i 34 aminoacidi che formano rispettivamente i peptidi A e B (Tabella 7) (Balla et al., 2000; Franz et al., 2002). Balla & Dicks (2005) hanno dimostrato che l'Enterococcina 1071A e l'Enterococcina 1071B sono in grado di agire indipendentemente contro i batteri bersaglio.

Enterocina B.

L'enterocina B è una batteriocina "addizionale" che è prodotta da diversi ceppi di enterococchi che producono l'enterocina A, per esempio dagli *E. faecium* CTC492, T136, WHE 81 e BFE 900 (Aymerich et al., 1996; Casaus et al., 1997; Franz et al., 1999b; Ennahar et al., 2001). L'enterocina B consiste di 53 aminoacidi, ha un peso molecolare di 5463 Da (Tabella 7), non contiene il motivo consenso YGNGVXC nella porzione N-terminale del peptide e condivide similarità nella sequenza solo con la batteriocina carnobatteriocina A (Tabella 7) (Worobo et al., 1994; Casaus et al., 1997; Franz et al., 1999b). Una caratteristica peculiare dell'Enterocina B e della carnobatteriocina A è che i loro geni dell'immunità non sono localizzati subito dopo, e nello stesso operone, il gene strutturale, così come avviene per la maggior parte delle batteriocine della classe II, ma si trovano nel filamento di DNA opposto, immediatamente dopo i geni strutturali della carnobatteriocina A e della enterocina B (Franz et al., 1999b, 2000). Entrambe le batteriocine contengono due residui di cisteina che possono formare un ponte di solfuro nel peptide maturo (Worobo et al., 1994; Franz et al., 1999b), ma a differenza delle altre batteriocine della classe II quali la enterocina P, la bacteriocina 31, la leucocina A, la carnobatteriocina B2 e la sakacina P, il ponte di solfuro non si trova nella metà N-terminale della molecola, ma piuttosto abbraccia le posizioni 23 e 52 nella molecola della batteriocina (van Belkum & Stiles, 2000). L'analisi genetica mostra che il prepeptide contiene un peptide leader di 18 aminoacidi del tipo a doppia glicina (Casaus et al., 1997; Franz et al., 1999b). L'enterocina B è attiva contro *Enterococcus* e *Lactobacillus spp.* ed i patogeni di origine alimentare *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *C. perfringens* (Franz et al., 1996; Casaus et al., 1997).

Batteriocina 32.

Questa batteriocina è stata scoperta nel ceppo di *Enterococcus faecium* VRE200 resistente alla vancomicina (Inoue et al., 2006). Il locus genetico della batteriocina 32 consiste di un gene per la batteriocina (bacA) e di un gene dell'immunità (bacB) ed il prodotto del bacA è lungo 89 aminoacidi, con un peptide segnale di 19 aminoacidi (Inoue et al., 2006). Nessuno dei prodotti dei geni della batteriocina e dell'immunità presentano livelli significativi di omologia con nessuna batteriocina o proteina dell'immunità conosciute. La batteriocina 32 è attiva contro *E. faecium*, *E. hirae* ed *E. durans* ma non mostra attività contro *L. monocytogenes*.

Enterocine della classe III. Peptidi ciclici antibatterici.

Kemperman et al. (2003) hanno suggerito che una classe V dovesse essere aggiunta ai sistemi di classificazione di Klaenhammer (1993) e Nes et al. (1996) per includerci batteriocine che siano sintetizzate a livello ribosomale, che non subiscono modificazioni post-traduzionali e legate testa-coda, chiamate peptidi ciclici antibatterici. Una separazione delle batteriocine a peptide ciclico dalle altre batteriocine della classe II era stata precedentemente suggerita anche da van Belkum & Stiles (2000). Ad oggi sono stati descritti diversi peptidi ciclici antibatterici tra i quali l'enterocina AS-48 da *E. faecalis* (Martínez- Bueno et al., 1994), la gassericina A da *Lactobacillus gasseri* LA39, la reutericina 6 da *Lactobacillus reuteri* LA6 (Kawai et al., 2004), la butirivibriocina AR10 dal microrganismo anaerobio *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10 (Kalmokoff et al., 2003), la circularina A da *C. beijerinckii* ATCC 25752 (Kemperman et al., 2003) e la subtilosina A dal *Bacillus subtilis* (Kawulka et al., 2004).

Enterocina AS-48.

L'enterocina AS-48 è prodotta da un isolato clinico di *E. faecalis* S-48 (Gálvez et al., 1986) e successivamente sono state identificate altre batteriocine ad essa identiche quali, l'enterocina EFS2, l'enterocina 4 e la batteriocina 21 sintetizzate da altri ceppi di *E. faecalis* (Joosten et al., 1996; Maisnier-Patin et al., 1996; Tomita et al., 1997) e dal ceppo di *E. faecium* 7C5 (Folli et al., 2003). I geni strutturali per le enterocine AS-48 e batteriocina 21 sono localizzati rispettivamente sui plasmidi pMB2 e pPD1, che sono stati clonati e sequenziali (Martínez-Bueno et al., 1994; Tomita et al., 1997).

Dall'analisi genetica del gene strutturale e dall'analisi aminoacidica dei due peptidi ottenuti dopo digestione dell'enterocina AS-48 con Glu-C endoproteinase, Martínez-Bueno et al. (1994) hanno visto che il gene as-48 codifica un prepeptide di 105 aminoacidi consistente di un peptide segnale di 35 aminoacidi ed un peptide maturo di 70 aminoacidi (Tabella 7). Quest'ultimo forma una molecola ciclica che risulta dal legame testa-coda della metionina N-terminale (Met1) con il triptofano C-terminale (Trp70) (Martínez-Bueno et al. (1994).

Enterocina AS-48RJ.

Una variante della enterocina AS-48, la variante AS-48 o AS-48RJ è stata di recente caratterizzata da un ceppo di *E. faecium* isolato da un formaggio di capra di produzione familiare. Questo ceppo possiede un gruppo genico identico a quello del ceppo S-48 con la sostanziale differenza però che è localizzato nel cromosoma batterico (Abriouel et al., 2005). L'enterocina AS-48RJ è identica all'enterocina AS-48 con l'eccezione che Glu20 è sostituita da Val20 (Abriouel et al., 2005) (Tabella 7, Fig. 5).

Circularina A.

Recentemente, una batteriocina circolare, la circularina A, è stata isolata da *C. beijerinckii* ATCC 25752 (Kemperman et al., 2003). La circularina A presenta omologia con l'enterocina AS-48 a livello della sequenza primaria, con una similarità del 60% e 30% d'identità ed è prodotta con un legame testa-coda fra Val4 e Tyr72.

Classe IV. Proteine grandi.

L'enterolisina A.

L'enterolisina A è una batteriocina prodotta dai ceppi di *E. faecalis* LMG 2333 e DPC5280 (Hickey et al., 2003, Nilsen et al., 2003), di grandi dimensioni con un peso molecolare calcolato di 34,501 Da, sensibile al calore e che quindi possiede le caratteristiche generali delle batteriocine della classe IV (Tabella 7). L'enterolisina A mostra attività verso *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria* e *Staphylococcus spp.* ed il suo determinante genetico è stato clonato e sequenziato (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003). La batteriocina è codificata come preproteina costituita da un polipeptide di 343 aminoacidi recante un peptide segnale di 27 aminoacidi. La sequenza aminoacidica presenta omologia con diverse proteine, ad esempio la regione N-terminale contiene un dominio riscontrato nella famiglia M37 delle metallopeptidasi, mentre la parte C-terminale mostra similarità con diverse proteine batteriofagiche ad azione mureina litica (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003). Perciò, la porzione N-terminale della enterolisina A presenta omologia con la lisostafina, LytM e zoocina A prodotte rispettivamente da *S. simulans biovar. staphylolyticus*, *S. aureus* e *Streptococcus zooepidemicus* (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003) anche se l'enterolisina A ne possiede uno spettro d'azione più ampio (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003). Nilsen et al. (2003) ha anche dimostrato che l'enterolisina A, come suggerito dalla similarità con gli enzimi mureina-litici, possiede la capacità d'idrolizzare la parete cellulare.

La *Listeria monocytogenes*

Le batteriocine prodotte dagli enterococchi, come detto, sono in grado di contrastare lo sviluppo di diversi microrganismi patogeni tra i quali *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella enteritidis*, *S. choleraesuis*, ma specialmente la *Listeria monocytogenes*, al punto che le batteriocine che costituiscono la classe IIa, cioè quelle che presentano la sequenza YGNGV, denominate batteriocine Pediocina-simili, sono anche indicate come batteriocine anti *listeria* (Nicolas, 1985; Johnson *et al.*, 1988; Legnani *et al.*, 1995).

La *Listeria* è un batterio ubiquitario (Durst and Berencsi, 1975; Disegna *et al.*, 1988) capace di crescere a basse temperature (Farber and Peterkin, 1991), di resistere per lunghi periodi nell'ambiente e di passare da un organismo animale all'ambiente e viceversa con la massima facilità, sono pleiomorfi, Gram-positivi, asporigeni, aerobi facoltativi e mobili, in grado di crescere e moltiplicarsi a temperature comprese tra 2 - 37°C, $a_w > 0.92$ e $4.5 < \text{pH} < 9.6$.

Sono stati suddivisi in 7 specie e al momento solo una risulta patogena per l'uomo.

- *L. ivanovii* sospetta patogenicità negli ovini.
- *L. innocua* al momento non di interesse alimentare.
- *L. seeligeri* al momento non di interesse alimentare.
- *L. welshimeri* al momento non di interesse alimentare.
- *L. grayi* al momento non di interesse alimentare.
- *L. murrayi* al momento non di interesse alimentare.
- *L. monocytogenes*, con una decina di sierotipi diversi, che causa la listeriosi.

Il primo caso umano di listeriosi è stato riportato nel 1929, e il primo caso perinatale nel 1936 (Epicentro Ist.Sup.Sanità). Nei paesi occidentali, la malattia sta assumendo sempre più una dimensione problematica per la sanità pubblica, sia per la sua potenziale gravità che per il fatto che epidemie si sono manifestate anche in anni recenti nei nostri paesi, soprattutto in seguito alla distribuzione di cibo contaminato attraverso le grandi catene di ristorazione. Questa tossinfezione si manifesta con setticemie, meningiti, encefaliti o infezioni cervicali sicuramente patogene per l'uomo soprattutto se immunodepresso. In un adulto immunodepresso per poter provocare infezioni devono essere presenti almeno 10^3 ufc/g mentre in adulti con sistema immunitario "normale" la

carica infettante deve essere di almeno 10^6 ufc/g (Cantoni, 2002; Ottaviani, 2002). La virulenza del batterio è determinata dalla capacità di superare senza danni la barriera gastrica ed inoltre di sopravvivere nell'intestino in presenza di sali biliari invadendo progressivamente le viscere dell'organismo attraverso il sangue senza venire a contatto con gli anticorpi. Pertanto può essere presente a livello enterico oppure in altri distretti organici come quelli riproduttivi o mammari. Resiste molto bene agli stress ambientali e a quelli indotti da processi industriali; resiste molto bene in concentrazioni di NaCl superiori al 10%, a valori di a_w inferiori a 0,93 e a temperature di -18°C fino a 9 mesi mentre la crescita è assente o moderata in condizioni anaerobiche o con valori di pH inferiori a 5,5.

Gli alimenti contaminati, che possono essere causa di infezioni, sono soprattutto quelli consumati crudi.

- prodotti ittici in genere, crudi, marinati o affumicati;
- carni crude di tutti i tipi ed in particolare i prodotti da salumeria;
- latte fresco non pastorizzato contaminato da materiali fecali;
- prodotti lattiero caseari fermentati soprattutto formaggi molli a “crosta fiorita” come gorgonzola e toma;
- vegetali in genere concimati con concimi organici o irrigati con acque contaminate.

La listeriosi è particolarmente pericolosa per le persone immunodepresse, malati di cancro, diabete, Aids, le persone anziane, i neonati e le donne in gravidanza. Le donne in gravidanza sono, secondo i dati dei Cdc americani, 20 volte più suscettibili alla malattia, che può causare aborto spontaneo o parto prematuro, morte in utero o infezione del feto. I sintomi però, nel caso delle donne incinte, sono molto simili a quelli di una influenza leggera. Tra i neonati, che hanno contratto l'infezione dalla madre, il tasso di mortalità è piuttosto elevato, e la malattia si manifesta sia sotto forma di polmonite che di meningite, difficilmente distinguibili a livello sintomatico da infezioni causate da altri agenti patogeni. Nei neonati però la listeriosi può dare luogo anche ad altri sintomi, come perdita di appetito, vomito, irritazione epidermica. Anche quando l'esito della malattia non è fatale, il neonato ha comunque il rischio di subire

danni neurologici a lungo termine e sviluppo ritardato. La diagnosi precisa di listeriosi può essere effettuata tramite analisi del sangue e/o del liquido spinale.

Prevenzione

I metodi per prevenire l'intossicazione alimentare causata da *L. monocytogenes* sono:

- calore: la pastorizzazione a 72°C per 15 secondi è sufficiente per distruggere il microrganismo;
- additivi: il controllo mediante additivi attualmente consentiti per la conservazione degli alimenti sono:

L'acido sorbico, benzoico e rispettivi sali o esteri dell'acido benzoico. La loro capacità di inattivare la *L. monocytogenes* è molto nota nell'industria alimentare che li usa anche per la loro azione nei confronti di muffe, lieviti e batteri soprattutto se catalasi positivi e aerobi. Pertanto hanno un ampio spettro d'azione che concorre al prolungamento della shelf-life di molti prodotti alimentari. Ogni additivo ha una efficacia subordinata da una serie di fattori tra cui pH, temperatura e concentrazioni d'uso che vanno di volta in volta determinati in virtù anche della presenza di ulteriori acidi organici presenti nell'alimento che potrebbero favorire o inibire la loro efficacia.

Nitrato e nitrito. Vengono usati soprattutto per il controllo di *Clostridium* sp e della *L. monocytogenes*. La loro efficacia oltre ad essere legata ad una serie di fattori quali pH, temperatura e concentrazioni di NaCl, è favorita da alte concentrazioni di acido lattico.

Lisozima. Enzima naturale presente nella saliva, nel latte e nell'albume dell'uovo è capace di inibire la crescita di *L. monocytogenes* e di altri microrganismi Gram-positivi, resiste ai processi di alta pastorizzazione (95°C); la sua azione non è influenzata dal pH ma è ridotta dalla presenza di NaCl.

Atmosfera modificata. Il genere *Listeria* è aerobio facoltativo pertanto cresce sia negli alimenti freschi non confezionati sia in quelli confezionati sottovuoto, cresce anche in presenza di N₂ e anche a temperature di refrigerazione, rappresentando talvolta un serio pericolo per la sicurezza dei prodotti alimentari. La crescita di questo microrganismo diminuisce con l'aumentare della concentrazione di CO₂ e si ha una completa inibizione quando la percentuale di anidride carbonica, presente nei prodotti confezionati, è di almeno l'80%.

Sanitizzanti. L'eradicazione della *L. monocytogenes* dalle attrezzature di lavorazione può essere realizzata, non solo impiegando composti a base di cloro, di ammonio quaternario o di acidi, ma rimuovendo a fondo i substrati organici che aderiscono, come biofilm, alle superfici. Pertanto la pulizia delle attrezzature deve essere effettuata mediante un'azione chimica combinata con un'azione meccanica energica oppure attraverso l'uso di acqua ad alta pressione alla temperatura di almeno 80°C.

Corretta gestione dei processi in tutta la filiera produttiva. La corretta gestione dell'allevamento costituisce il primo passo per diminuire la presenza e la conseguente propagazione della *L. monocytogenes*. Gli interventi devono riguardare l'igiene della stalla e degli animali, la salubrità dell'acqua e degli alimenti zootecnici nonché un'azione preventiva con l'impiego di modulatori di flora intestinale per prevenire la colonizzazione da parte di batteri potenzialmente patogeni. A tale scopo si usano batteri competitori ossia miscele batteriche probiotiche composte da lattobacilli, bifidobatteri o lieviti oppure sostanze prebiotiche lattosio, latte-saccarosio o frutto-oligosaccaridi in quanto favoriscono lo sviluppo intestinale dei batteri probiotici. Sono anche impiegate miscele contenenti acidi organici e inorganici in ogni caso capaci di diminuire la possibilità di sopravvivenza e pertanto di mantenere la quantità di batteri patogeni enterici entro le soglie di sicurezza.

Normativa di riferimento

In Italia nel gennaio del 2006 è entrato in vigore il *Pacchetto Igiene*, che comprende una serie di regolamenti quali Reg. 852/2004, Reg. 853/2004, Reg. 854/2004, Reg. 882/2004, Reg. 183/2005, Reg. 2073/2005, Reg. 2074/2005, Reg. 2075/2005, Reg. 2076/2005, che armonizzano il regime relativo all'igiene dei prodotti alimentari al fine di attuare una politica globale e integrata applicabile a tutti i prodotti alimentari e per consentire l'obiettivo di garantire un elevato livello di sicurezza alimentare e di sanità pubblica. Questi regolamenti abrogano le precedenti direttive che regolamentavano il settore ma che avevano creato un grosso problema: non erano, in quanto direttive, leggi attuative ma dovevano essere recepite da ogni Stato membro con una legge nazionale. Questo processo ha portato nei diversi stati, a interpretazioni diverse delle direttive con la conseguenza che lo stesso prodotto in uno stato era

soggetto a limiti diversi rispetto a quelli che lo stesso prodotto aveva in un altro stato membro dell'UE.

A titolo di esempio prima del gennaio 2006, in paesi come la Germania, l'Olanda, la Francia e la Danimarca, la tolleranza in alimenti pronti al consumo della *Listeria monocytogenes* veniva indicata con valori compresi tra 100 e 1000 ufc/g (Caserio, 2002), mentre la normativa italiana prevedeva l'assenza di *Listeria monocytogenes* in 25 g di prodotto al momento del consumo e un contenuto massimo di 110 ufc/g per gli alimenti da consumarsi dopo la cottura.

Il regolamento 2073 del 2005, entrato in vigore con il Pacchetto Igiene, stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Il regolamento 2073/2005 parte dalle seguenti considerazioni:

- 1) un elevato livello di protezione della salute pubblica è uno degli obiettivi fondamentali della legislazione alimentare. I rischi microbiologici dei prodotti alimentari costituiscono una delle principali fonti di malattie umane causate dagli alimenti.
- 2) I prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana.
- 3) Al fine di contribuire alla protezione della salute pubblica ed evitare interpretazioni divergenti è opportuno fissare criteri armonizzati di sicurezza relativi all'accettabilità dei prodotti alimentari, in particolare per quanto riguarda la presenza di determinati microrganismi patogeni.
- 4) I criteri microbiologici indicano inoltre come orientarsi nello stabilire l'accettabilità di un prodotto alimentare, costituendo parte integrante delle procedure di HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene.
- 5) La sicurezza dei prodotti alimentari è garantita principalmente da misure di prevenzione. I criteri microbiologici possono essere applicati per la validazione e la verifica di procedure di HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene.
- 6) L'adozione di criteri comunitari, e quindi la definizione di criteri microbiologici armonizzati per gli alimenti in sostituzione dei criteri nazionali, è uno degli obiettivi di questo regolamento.

Per quanto riguarda la *Listeria monocytogenes* il nuovo limite, in tutti gli stati che aderiscono all'UE, è fissato in:

- 100 ufc/g per i prodotti già immessi sul mercato nel loro periodo di conservabilità, questo valore è automatico per gli alimenti pronti che non consentono la crescita per le caratteristiche stabilite ($\text{pH} < 4,4$ o $a_w < 0,92$; prodotti con $\text{pH} < 5,0$ e $a_w < 0,94$; prodotti con periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni), mentre per quelli che consentono la crescita, è subordinato alla capacità del produttore di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che le caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento consentono, allo stesso di non superare il limite delle 100 ufc/g nel corso della shelf-life.

La listeriosi rientra nel gruppo di malattie per le quali sono stati stabiliti sia negli Stati Uniti che in Europa reti di sorveglianza sulla sicurezza alimentare con obbligo di denuncia. Queste reti, volte a individuare focolai di infezione e determinarne la causa, permettono di agire sia ritirando i prodotti dal mercato che adottando le necessarie misure nei confronti degli impianti di produzione e informando la popolazione a rischio.

SCOPOLAMINE

Le batteriocine prodotte dai batteri lattici, conosciuti generalmente come sicuri (GRAS- generally recognized as safe), suscitano un grosso interesse nel controllo di batteri degradativi e patogeni nelle derrate alimentari, per il loro potenziale utilizzo come “bioconservanti” negli alimenti. La ricerca sulle batteriocine prodotte dai batteri lattici si è estesa durante le ultime decadi, con l’intento di utilizzare le batteriocine o gli organismi produttori come conservanti alimentari naturali. . Questo obiettivo, seguito dai laboratori dalle industrie agroalimentari e non, è dettato dalla mutata coscienza del consumatore, oggi alla continua ricerca di prodotti che, seppur ottenuti con le più moderne tecnologie di produzione, rispecchiano quanto più possibile aromi, sapori e aspetti salutistici delle produzioni tradizionali.

Si comprende l’importanza dell’argomento quando si valuta l’interesse crescente del consumatore per i prodotti con caratteristiche, considerate dall’opinione pubblica salutistiche, quali: i prodotti da agricoltura biologica, quelli senza conservanti artificiali, il latte crudo di stalla erogato da distributori automatici, i latti fermentati contenenti microrganismi probiotici, gli integratori alimentari contenenti sostanze prebiotiche (che, trasformate in prodotti metabolici dai M.O. probiotici, esplicano l’azione salutare sull’organismo ospite), ecc.

La risoluzione dei problemi di sicurezza alimentare, legati alla presenza di microrganismi patogeni, riguarda tutti i prodotti di origine animale e cercare di conciliare questa esigenza con il rispetto delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto non è affatto semplice. La tecnologia di produzione, infatti, rispecchia sempre il compromesso tra le due esigenze alle quali purtroppo si antepone quasi sempre la scelta più economica tra le diverse opzioni tecnologiche possibili. .

L’isolamento di microrganismi lattici autoctoni della Sardegna, produttori di batteriocine e quindi efficaci nel contrastare lo sviluppo dei microrganismi degradativi e patogeni, potrebbe essere una valida arma nelle mani dei produttori e dei trasformatori, permettendo da un lato di mantenere i caratteri di tipicità del prodotto e dall’altro di usare dei conservanti “naturali”.

Il latte di capra prodotto in Sardegna costituisce un substrato ideale per lo sviluppo di batteri lattici produttori di batteriocine in quanto selezionati dalla grande quantità di metaboliti antibatterici presenti naturalmente nel latte.

Il numero degli *Enterococcus*, nel latte crudo di capra risulta sempre abbastanza elevato, come riportato da diverse ricerche condotte principalmente nei paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo, arrivando in alcuni casi a rappresentare anche il 50% dei cocchi lattici presenti.

Gli enterococchi, dopo i lattobacilli, sono al secondo posto per la produzione di batteriocine, la maggior parte delle quali possiedono attività antagonistica nei confronti della *Listeria*.

Lo scopo del presente lavoro riguarda l'isolamento di batteri lattici autoctoni presenti nel latte di capra prodotto in Sardegna, l'identificazione e la caratterizzazione della loro attività antimicrobica al fine di ottenere dei microrganismi capaci di inibire l'accrescimento dei batteri patogeni garantendo, allo stesso tempo, la salubrità e la sicurezza dei prodotti.

MATERIALS & METHOD

Isolamento dei ceppi microbici

I ceppi di *Enterococcus spp.* usati in questo lavoro come colture attive (produttrici) sono stati isolati da latte crudo di capra prodotto in Sardegna.

Per l'isolamento si è proceduto ad una semina per spandimento di aliquote seriali di latte crudo di capra in terreno Azide dextrose broth (Oxoid) agarizzato ed incubazione a 30 e 37° C per 48 ore in anaerobiosi. Successivamente, le colonie sviluppatesi sono state purificate con successivi passaggi nello stesso terreno di coltura e conservati a -80°C in brodo MRS (De Man et al. 1960) con 20 % di glicerolo.

Attività inibitoria

Gli isolati, conservati a -80°C in MRS liquido (Oxoid) con 20% di glicerolo, prima di essere testati, sono stati propagati per due volte in terreno liquido MRS a 30° C per 10-12 h. I ceppi microbici usati come microrganismi indicatori di attività antimicrobica sono stati *Escherichia coli* ceppo DSMZ 30083, *Listeria monocytogenes* ceppo DSMZ 20.600, *Salmonella choleraesuis* ceppo DSMZ 13772 e *Staphylococcus aureus* ceppo DSMZ 20231; tutti questi ceppi microbici sono stati fatti crescere in terreno brain heart infusion (BHI) broth a 37° C per una notte.

Per determinare l'attività antimicrobica sono stati utilizzati due metodi: l' "agar spot test" (1) ed il "well diffusion assay" (2).

(1) L' Agar spot test consente l'individuazione dei ceppi che possiedono una certa attività antimicrobica ed è stato realizzato sia con la via dell'inibizione diretta che con la via dell'inibizione indiretta. I ceppi testati per la produzione di composti antimicrobici sono stati lasciati sviluppare in MRS liquido a 30°C per 24 ore e quindi (2-3 µl) sono stati posati sulla superficie di piastre Petri (diametro 90 mm), contenenti terreno MRS; sono stati lasciati ad asciugare a temperatura ambiente e successivamente (inibizione diretta) ricoperti direttamente con 7 ml di terreno soft brain heart infusion contenente 0.75% agar, inoculato con 7 µl (approssimativamente 10⁵ CFU/ml) di una coltura microbica indicatrice prima di essere posti ad incubare; oppure (inibizione indiretta) incubati anaerobicamente a 30° C per consentire la crescita microbica, fino ad ottenere uno sviluppo evidente (18-24 h), prima di essere ricoperti con il microrganismo indicatore, con le modalità già descritte per il metodo diretto. Le colonie con gli aloni d'inibizione

più grandi sono state replicate su piastre di terreno BHI agar (Oxoid) e Trypticase Soy Agar (Oxoid, senza glucosio), quest'ultimo aggiunto di 0.6% estratto di lievito (Oxoid) – TSAYE. L'inibizione dovuta all'acidificazione del mezzo non interviene quando si utilizza sia il BHI agar con lo 0.2% glucosio ad un pH iniziale di 7.4 (Harris et al., 1989) che il TSAYE senza glucosio (Lewus et al., 1991). Le piastre di BHI e di TSAYE sono state incubate a 30°C per 24 ore in anaerobiosi. E' stata ripetuta la copertura con il BHI soft agar inoculato con il batterio indicatore e l'incubazione per 12 h a 37°C in aerobiosi. Le colonie mostranti attività inibitoria sono state sia trasferite su piastre di terreno MRS che mantenute a -80°C in brodo MRS (Oxoid) con il 20% glicerolo.

Sono state utilizzate condizioni di anaerobiosi al fine di minimizzare la formazione del perossido d'idrogeno e quindi escludere l'eventuale l'inibizione dovuta all'acqua ossigenata. I controlli sperimentali includevano:

- a) l'utilizzo di 1 mg/ml Pronase (*Streptomyces griseus* protease tipo XIV) nel BHI agar per distruggere qualsiasi attività inibitoria attribuita alle batteriocine;
- b) l'uso di ceppi di *Enterococcus spp.*, non produttori di batteriocine. Dopo incubazione in aerobiosi per 12 h (una notte) a 37° C, le piastre sono state osservate per gli aloni d'inibizione eventualmente formatisi sul "tappeto" del microrganismo target.

Se dall'analisi non compariva nessuna zona o zone d'inibizione molto piccole ed indistinguibili, allora l'inibizione è stata valutata negativa (Schillinger and Lüke, 1989).

(2) La ricerca di eventuali composti inibitori secreti nel mezzo liquido di crescita da parte dei ceppi positivi allo spot test e quindi considerati produttori, è stata condotta sia attraverso il metodo dell' agar well diffusion (Tagg et al., 1976), sia utilizzando lo spot test secondo la tecnica di Van Reenen (1998); per questi tests, supernatanti liberi da cellule sono stati preparati partendo da colture microbiche lasciate sviluppare sotto le migliori condizioni per la produzione delle batteriocine. I LAB sono stati fatti crescere in terreno liquido MRS o in BHI per 24 h a 30° C. I supernatanti sono stati ottenuti (a) centrifugando le colture (12,000 x g per 10 minuti a 4° C); (b) correggendo il pH 6.0 con NaOH 1M per eliminare l'inibizione della crescita dovuta agli acidi organici prodotti dal metabolismo microbico; (c) sterilizzando per filtrazione con filtri con pori di dimensione da 0.22 µm in membrana idrofila Durapore (PVDF) a basso legame per le proteine, Millex-GV, Millipore; (d) ed infine sottoponendo i surnatanti ad un trattamento termico di 80°C per 10 minuti per disattivare le proteasi eventualmente

presenti. Quando necessario, i supernatanti sono stati concentrati approssimativamente 10 volte tramite liofilizzazione oppure per ultrafiltrazione utilizzando concentratori centrifughi con membrane in cellulosa rigenerata con taglio da 3,000, 10,000 e 30,000 MW (microconcentratori Amicon, Amicon division, Millipore). Questi supernatanti con il pH corretto e sterilizzati per filtrazione, indicati come CFS (cell free supernatant), sono stati immediatamente utilizzati o conservati a -20°C (Enan et al., 1995; Harris et al., 1989).

Anche il test dell'Agar Well diffusion, così come lo spot test descritto precedentemente, è stato realizzato nelle due varianti dell'inibizione diretta e dell'inibizione indiretta.

Metodo indiretto: aliquote di 50-100 µl di campione del CFS sono state poste in pozzetti di 6 mm di diametro, che sono stati ricavati in una piastra Petri di BHI agar ed il surnatante è stato lasciato a diffondere per 4 - 6 h a temperatura ambiente. Del BHI soft agar (8 ml) è stato inoculato con 8 µl di una coltura del microrganismo da testare e versato sulla superficie della piastra con il pozzetto. Le piastre sono state poste ad incubare in aerobiosi a 37° C per una notte ed esaminate per le zone d'inibizione.

Metodo diretto: la piastra Petri è stata riempita con 20 ml di BHI soft agar fondente (0.7% agar) inoculato con 0.2 ml (1% v/v) di una coltura del microrganismo indicatore (approssimativamente 10⁵ cells/ml), e lasciato solidificare; quindi, sono stati realizzati diversi pozzetti di 6 mm di diametro nel terreno agarizzato e 50-100 µl del CFS sono stati posati in ciascun pozzetto, lasciandoli diffondere nell'agar per 4 h a 4° C. Le piastre sono quindi state poste ad incubare in aerobiosi alla temperatura ottimale per lo sviluppo del microrganismo indicatore (37° C), ed esaminate dopo 12 e 24 h per le zone d'inibizione.

In entrambi i metodi di diffusione nel pozzetto sono stati utilizzati, come controlli negativi, supernatanti trattati con proteasi (1 mg/ml di Pronase, 1 h, 37°C).

Nello spot test secondo la tecnica di Van Reenen (1998), su delle piastre Petri sono stati versati 10 ml di BHI soft agar fondente (0.7% agar) inoculato con 0.2 ml (1% v/v) di una coltura del microrganismo indicatore (approssimativamente 10⁵ cell/ml), e lasciato solidificare; entro al massimo tre ore e comunque prima che abbia inizio la fase esponenziale della moltiplicazione microbica, sono state poste aliquote di 10 µl di surnatante preparato come descritto precedentemente.

Le piastre, sono state quindi poste ad incubare alla temperatura ideale per lo sviluppo del microrganismo bersaglio per 12 e 24 ore, e sono state considerati positivi chiari aloni d'inibizione di almeno 2 mm di diametro.

Test svolti sui campioni con evidente attività antimicrobica

Dopo la valutazione dell'attività antimicrobica per mezzo dell'agar spot test e del well diffusion method, le prove svolte hanno riguardato:

- l'identificazione dei ceppi, eseguita sia con saggi biochimico-fisiologici che tramite il sequenziamento della regione 16S rDNA;

Sono state, inoltre, determinate sui supernatanti liberi da cellule (CFS):

- lo spettro di attività;
- l'esclusione dell'inibizione dovuta a batteriofagi litici;
- l'unità arbitraria (UA / ml);
- l'influenza del calore;
- l'influenza del pH;
- l'influenza degli enzimi;
- l'influenza dei tensioattivi e dei sali;
- la stabilità delle batteriocine nel tempo;
- la produzione delle batteriocine a diversi tempi e temperature;
- la produzione delle batteriocine su diversi terreni ed a differenti pH iniziali;
- l'effetto dei componenti del mezzo sulla produzione delle batteriocine;
- la crescita del microrganismo test in presenza delle batteriocine;
- la riduzione delle cellule vitali del mo target in presenza delle batteriocine;
- l'adsorbimento delle batteriocine sui microrganismi sensibili;
- l'influenza del pH e della temperatura sull'adsorbimento;
- l'effetto dei sali inorganici e dei composti organici sull'adsorbimento;
- la parziale purificazione delle batteriocine;
- la determinazione della loro dimensione per mezzo di tricine-SDS-PAGE.

Identificazione dei ceppi microbici

I ceppi isolati sono stati sottoposti alla colorazione di Gram, alla prova della catalasi ed all'osservazione microscopica, risultando Gram positivi, catalasi negativi e di forma coccica. Dopo le prove fenotipiche e fisiologiche (Bridge and Sneath, 1983), tutti i ceppi isolati sono risultati essere *Enterococcus faecium*.

L'identificazione ha riguardato:

1. colorazione di Gram;
2. prova della catalasi;
3. osservazione microscopica;
4. prove di sviluppo a 45°C e 10°C in terreno M17 broth;
5. sviluppo in M17 broth al 6,5 % di NaCl, incubato a 30°C (per gli isolati a 30°C) e a 37°C (per gli isolati a 37°C) per 48 h;
6. prove di fermentazione attraverso la produzione di CO₂ in terreno liquido MRS broth senza citrato con campanelle di Durham ed incubazione a 30°C ed a 37°C per 48 H;
7. prove di idrolisi dell'esculina, utilizzando lo stesso terreno impiegato per le prove di fermentazione degli zuccheri addizionato con 2g/l di esculina e 5g/l di ammonio citrato;
8. prova di idrolisi dell'arginina saggiata in MRS broth addizionato con 3 g/l di arginina e con sodio citrato al posto dell'ammonio citrato;
9. le prove di fermentazione sono state realizzate utilizzando un terreno liquido così costituito: peptone 1%; estratto di lievito 0,5%; Tween 80 0,1%; K₂ HPO₄ 0,2%; acetato di sodio 0,3%; citrato triammonico 0,2%; solfato di magnesio 0,02%; solfato di manganese 0,005%; indicatore bromocresolporpora 0,004%. Al terreno base è stata poi aggiunta una soluzione sterile all'1% dello zucchero da testare. Gli zuccheri impiegati sono stati: ribosio, salicina, ramnosio, mannitolo, trealosio, melezitiosio, melibiosio, raffiniosio, xilosio, sorbosio, arabinosio, cellobiosio. Le verifiche di fermentazione sono state effettuate dopo 24 h, 48 h e 5 gg d'incubazione a 30°C ed a 37°C. La reazione è stata considerata positiva se il pH raggiungeva il punto di viraggio dell'indicatore (pH 5,2).

Identificazione genetica dei ceppi microbici

Sui ceppi produttori di batteriocine, è stata effettuata l'analisi di sequenza (sequenziamento parziale) del 16S r-DNA; a tal proposito è stato amplificato, tramite reazione di PCR, un frammento del DNA genomico mediante l'utilizzo di primers universali, che legandosi alle regioni fiancheggianti permettono l'amplificazione della regione al 5' del 16S r-DNA.

Si è proceduto, dapprima, all'estrazione del DNA genomico di ogni singolo isolato batterico con il metodo SDS-NaOH. Una singola colonia microbica è stata sospesa in 50 µl di soluzione di lisi (NaOH 0.05 M, 0.25% SDS). Dopo 1-2 minuti di vortex, la sospensione è stata riscaldata a 95°C per 15 minuti e successivamente centrifugata per 10 minuti a 14000 rpm. Il lisato è stato così diluito 1:10 in acqua milliQ sterile (10 µl di surnatante e 90 µl di H₂O milliQ sterile) e posto subito in ghiaccio. La diluzione così ottenuta è stata utilizzata nella reazione di PCR, indicata di seguito.

I primer universali utilizzati sono 63F (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC) e 1389F (5'ACGGGCGGTGTGTACAAG) descritti da [Hongoh et al. \(2003\)](#) per l'amplificazione di DNA totale di comunità. La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 25 µl:

Master-Mix	10,0 µl
DNA	1,0 µl
Primer 63F	2,5 µl
Primer 1389F	2,5 µl
H ₂ O	9,0 µl

I campioni così ottenuti sono stati trasferiti nel termociclatore BioRad-I Cycler con il seguente programma di reazione PCR (Polymerase Chain Reaction):

1. *Denaturazione*: 120'' 95°C
2. *Amplificazione*: (35x): 60'' 94°C, 30'' 54°C, 30'' 72°C
3. *Estensione*: 300'' 72°C

Al fine di verificare la presenza di amplificati si è proceduto quindi ad una corsa elettroforetica di controllo su gel di agarosio 0,8% contenente etidio bromuro (3 µl in 100 ml) per circa un'ora a 100V. La presenza di una banda di circa 1 Kb ha indicato che l'amplificazione è avvenuta correttamente.

Il sequenziamento degli amplificati ottenuti è stato eseguito presso il BMR Genomics (Spin-off dell'Università di Padova).

L'analisi e l'allineamento delle sequenze per l'attribuzione del genere o della specie, è stata realizzata tramite il confronto delle relative sequenze con quelle disponibili nel database Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) utilizzando l'algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997), disponibile in rete così come altri software quali FASTA e CLUSTALW.

Sequenze con valori di similarità maggiori o uguali al 98%, rispetto a sequenze di ceppi identificati presenti in GenBank, sono considerate come appartenenti alla stessa specie. Nei ceppi analizzati, i livelli di omologia ritenuti significativi in questo studio sono stati superiori del 98% con un numero di basi adeguato in relazione con le informazioni presenti in banca dati.

Preparazione dei supernatanti

I supernatanti dei ceppi positivi sia allo spot test che al well test sono stati preparati partendo da colture microbiche lasciate sviluppare in MRS liquido a 30 °C per 24 h.

I supernatanti sono stati ottenuti (a) centrifugando le colture (12,000 x g per 10 minuti a 4° C); (b) correggendo il pH 6.0 con NaOH 1M per eliminare l'inibizione della crescita dovuta agli acidi organici prodotti dal metabolismo microbico; (c) sterilizzando per filtrazione con filtri con pori di dimensione da 0.22 µm in membrana idrofila Durapore (PVDF) a basso legame per le proteine, Millex-GV, Millipore; (d) ed infine sottoponendo i surnatanti ad un trattamento termico di 80°C per 10 minuti per disattivare le proteasi eventualmente presenti. I supernatanti così preparati, con pH corretto e liberi da cellule, denominati CFS (cell free supernatant), sono stati immediatamente utilizzati oppure conservati a – 20°C per diversi mesi.

Spettro di attività

L'attività dei supernatanti è stata testata su un numero di 52 ceppi microbici, tra i quali 24 ceppi di *L. monocytogenes* di differenti gruppi sierologici, e diversi batteri Gram negativi tra cui undici ceppi di *Salmonella* (tabella 1). Nella stessa tabella sono riportate le condizioni di crescita, intese come terreni e temperature, dei ceppi da testare.

Esclusione dell'attività inibitoria dovuta a fagi litici

Per rilevare la presenza di batteriofagi litici, una porzione della zona chiara d'inibizione è stata tagliata dalla piastra dello spot test. Il pezzo di agar è stato aggiunto a 3 ml di brodo BHI e macerato con una bacchetta di vetro sterile. Il miscuglio è stato tenuto a temperatura ambiente per 1 h. Una quantità di 100 µl della sospensione e 100 µl del microrganismo indicatore (cresciuto per una notte a 30°C in brodo BHI) sono stati sospesi in 4 ml di soft BHI (0.75%) agar e versati uniformemente su una piastra di BHI agar ed incubati per una notte a 30° C (Lewus et al., 1991).

Calcolo dell'Unità Arbitraria

Su delle Piastre Petri contenenti 10 ml di agar acqua (1.2%), versati precedentemente e lasciati asciugare sono stati versati 10 ml di BHI soft agar (0.75%) contenente approssimativamente 10^5 CFU di *L. monocytogenes* 211 per ml. Entro al massimo tre ore e comunque prima che abbia inizio la fase esponenziale della moltiplicazione microbica, sullo strato del BHI soft agar sono state poste delle aliquote di 10 µl di una diluizione seriale del supernatante previamente sterilizzato per filtrazione, trattato ad 80°C x 10' e con il pH corretto a valori di 6.0. Dopo un incubazione in aerobiosi per una notte a 37° C le piastre sono state esaminate per gli aloni d'inibizione.

E' stato così possibile calcolare l'Unità Arbitraria o Unità di Attività per millilitro (AU/ ml); una Unità Arbitraria è definita come il reciproco della più alta diluizione mostrante una chiara zona d'inibizione (Todorov and Dicks, 2005) ed è "Arbitraria" perché i valori ottenuti, essendo funzione di diverse variabili (microrganismo sensibile, terreno, temperatura, tempi, etc..), richiedono che vadano sempre indicate le condizioni con le quali sono stati ottenuti.

L'attività antimicrobica viene quindi espressa in Unità Arbitrarie per millilitro (AU/ml)) e viene calcolata con la formula $a^b \times 100$, dove "a" rappresenta il fattore di diluizione in base 2 e "b" l'ultima diluizione che produce una zona d'inibizione di almeno 2 mm di diametro, mentre il 100 è il fattore di conversione (spot di 10 µl) al fine di poter esprimere il valore dell'UA per ml, come da convenzione. Il fattore di conversione, che serve per riportare tutto al ml, varia quindi a seconda della quantità di surnatante utilizzata; sono stati utilizzati 10 µl nella tecnica appena descritta, ma anche 100 µl (con fattore di conversione 10) con il well test, che è stato ugualmente realizzato. I risultati ottenuti con le due tecniche sono stati confrontati, ottenendo lo stesso valore di Unità Arbitraria.

L'attività (espressa in UA/mL) è stata determinata dopo 12, 24 e 36 h di crescita dei microrganismi produttori, lasciati sviluppare alla temperatura di 21, 30 e 37°C in MRS liquido; è stata rilevata oltre che su MRS anche in BHI ed in Skim Milk dopo 24 h a 30°C. La *L. monocytogenes* 211 è servita come microrganismo test.

Effetto dei trattamenti col calore

E' stato valutato l'effetto della temperatura sulle batteriocine trattando i supernatanti a 60, 70, 80, 90 e 100 °C, valutando l'attività delle batteriocine per ciascuna di queste temperature rispettivamente dopo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 120 minuti. Le batteriocine sono anche state esposte a trattamento di sterilizzazione per 15 minuti a 121°C. Il supernatante libero da cellule e non trattato è stato utilizzato come controllo. L'attività è stata valutata con il well diffusion method usando la *L. monocytogenes* 211 come microrganismo indicatore.

Effetto degli enzimi

Ad aliquote di un millilitro di CFS sono stati aggiunti separatamente, nella concentrazione finale di 1 mg/ml, diversi enzimi per testare l'effetto di ciascuno di essi sulle batteriocine presenti nei surnatanti. Prima dell'aggiunta degli enzimi, le diverse aliquote di surnatante sono state corrette ai valori di pH ottimali per l'azione di ciascun enzima. Dopo l'aggiunta degli enzimi, i CFS sono stati sterilizzati per filtrazione ed esposti per 2 h alla temperatura di 37°C. Sono stati impiegati i seguenti enzimi: catalasi

(da *Aspergillus niger*), papaina (da *Carica papaya*), pepsina (da mucosa gastrica suina), pronase tipo XIV (*Streptomyces griseus*), proteinase K (*Tritirachium album*), rennina (bovina), tripsina, ed α -amilasi (da *Aspergillus oryzae*), tutti della Sigma. Dopo la digestione proteasica e dopo aver ricorretto il pH di tutte le aliquote al valore di 6.0, i campioni sono stati sterilizzati per filtrazione e trattati termicamente ad 80°C x 10' per distruggere gli stessi enzimi proteolitici. Questa esposizione alle alte temperature serve ad assicurare che le proteasi impegnate nel test non abbiano eventuali effetti sul microrganismo sensibile. È stata valutata l'attività residua dei campioni, per mezzo del well test ed utilizzando la *L. monocytogenes* 211 come microrganismo indicatore. Il supernatante libero da cellule e non trattato è stato utilizzato come controllo (Ivanova et al., 1988).

Effetto del pH

L'effetto del pH sulle batteriocine è stato testato correggendo i campioni del supernatante da pH 2 a pH 12 (con incrementi di una unità di pH) con NaOH 1 M o con HCl 1 M. Previa sterilizzazione per filtrazione, dopo essere stati incubati sia per 30 minuti sia per 2 h a temperatura ambiente, i campioni sono stati ricorretti a pH 6, sempre con NaOH 1M oppure con HCl 1M, ancora sterilizzati per filtrazione e testati per l'attività antimicrobica, usando il well method e la *L. monocytogenes* 211 come microrganismo sensibile.

Effetto dei tensioattivi e dei sali

In un altro esperimento è stata valutata l'influenza che determinati sali e sostanze tensioattive hanno sulle batteriocine contenute nei supernatanti. A diverse aliquote di CFS sono stati aggiunti separatamente, N-Laurylsarcosine (sale sodico, tensioattivo anionico, L5125-Sigma), NaCl, Sodium dodecyl sulphate (SDS-detergente anionico, L6026-Sigma), Triton X-100 (tensioattivo non ionico, T9284-Sigma), Tween 20 (detergente non ionico, P-9416-Sigma), Tween 80 (tensioattivo non ionico, Sigma) ed Urea (U-0631-Sigma) ad una concentrazione finale del 1%, (p/v). Aliquote di CFS non trattate e soli detergenti alla stessa concentrazione del 1% p/v sono stati utilizzati come controllo. Dopo l'aggiunta dei detergenti, tutti i campioni sono stati sterilizzati per

filtrazione con i filtri indicati precedentemente, incubati alla temperatura di 37°C per 5 h e quindi saggiati per l'attività antimicrobica per mezzo del well diffusion method nei confronti della *L. monocytogenes* 211.

Stabilità delle batteriocine nel tempo

I supernatanti contenenti le batteriocine sono stati incubati a 25°C per 72 h. Lo scopo era quello di monitorare se le proteasi, eventualmente prodotte dai ceppi di *E. faecium* e quindi presenti nei surnatanti potessero avere una qualche attività degradativa nei confronti delle batteriocine. L'attività antimicrobica è stata monitorata ad intervalli regolari di 12 h sempre con lo spot test secondo [van Reenen et al. \(1998\)](#).

Produzione delle batteriocine a diversi tempi e temperature

Il livello di attività delle batteriocine, espresso in Unità Arbitrarie od Unità di Attività, è stato determinato alla 12°, alla 24° ed alla 36° h di crescita delle colture in brodo MRS (Oxoid), lasciate sviluppare a tre diverse temperature di 21, 30 and 37°C. Come microrganismo test è stato utilizzato la *L. monocytogenes* 211. Il livello di attività è stato rilevato con la tecnica dell'agar spot test, come già descritto precedentemente ([Van Reenen et al., 1998](#)).

Produzione delle batteriocine in differenti terreni di crescita

I ceppi di *E. faecium* dopo essere stati lasciati a crescere per 18 h, sono stati inoculati (2%, v/v) in tre diversi terreni liquidi di crescita, rispettivamente in MRS, in BHI ed SKIM MILK (10%, w/v,) tutti dell' Oxoid. Sono stati incubati a due differenti temperature a 30°C e 37°C, senza agitazione per 24 h. I valori di UA/ml sono stati ottenuti impiegando lo spot test e la *L. monocytogenes* 211 come batterio bersaglio.

Curva di produzione delle batteriocine in MRS

Ciascun ceppo produttore è stato inoculato (2%) in 300 ml di brodo MRS e lasciato sviluppare a 30°C per 27 h. Sono stati eseguiti prelievi orari per seguire l'andamento della crescita microbica (OD at 600nm) e la variazione del pH mentre la produzione della batteriocina (UA/mL) è stata monitorata con controlli ogni tre ore.

Produzione delle batteriocine a differenti pH iniziali di crescita

In un'altra prova è stato determinato l'effetto del pH iniziale nel mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine. Il pH di cinque diversi volumi di 300 ml di terreno MRS liquido è stato corretto con HCl 6M oppure con NaOH 6M, rispettivamente, a pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 e 7.0, e successivamente autoclavato. Dopo il trattamento di sterilizzazione in autoclave, se necessario, il pH è stato corretto con HCl 1M oppure con NaOH 1M sterile. Ciascuna beuta è stata inoculata con il 2% (v/v) di un brodo coltura dei ceppi di *E. faecium*, cresciuta per 18 h ed stata incubata a 30°C per 24 h, senza agitazione. Con cadenze orarie sono stati monitorati le variazioni del pH e la produzione delle batteriocine, espresse come UA/ml, così come descritto per il test precedente. Tutte le prove sono state eseguite in triplo.

L'effetto della composizione del mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine

Al fine di valutare l'influenza dei costituenti dei substrati per la crescita microbica sulla relativa produzione di batteriocine, i ceppi di *E. faecium* sono stati fatti sviluppare in 10 ml di brodo MRS (Oxoid) per 18 h a 30°C, le cellule sono quindi state raccolte per centrifugazione (10.000 x g, 10min, 4°C), ed il pellet ricavato è stato risospeso in 10 ml di acqua peptonata sterile. Da questa sospensione cellulare sono stati prelevati quattro ml che sono stati utilizzati per inoculare al 2% (v/v) 200 ml dei seguenti terreni appositamente preparati (come indicato in tabella 2):

(a) diversi MRS liquidi (De Man et al., 1960), preparati senza fonti proteiche, che sono stati singolarmente integrati con l'aggiunta, rispettivamente, di una sola delle seguenti componenti azotate: triptone (20.0g/L), estratto di carne (20.0g/L), estratto di lievito (20.0g/L), triptone (12.5g/L) più estratto di carne (7.5g/L), triptone (12.5g/L) più estratto di lievito (7.5g/L), estratto di carne (10.0g/L) più estratto di lievito (10.0g/L), od una combinazione di triptone (10.0g/L), estratto di carne (5.0g/L) ed estratto di lievito (5.0g/L);

(b) MRS liquido (Oxoid), cioè con 20.0g/L di D-glucosio e diversi MRS liquidi, preparati senza carboidrati, che sono stati singolarmente integrati con l'aggiunta,

rispettivamente, di uno solo dei seguenti zuccheri, rispettivamente: 20.0g/L di D-mannitolo, mannosio and ramnosio;

(d) diversi MRS liquidi, preparati come al punto precedente ai quali sono stati singolarmente aggiunti, rispettivamente, dosi crescenti di uno solo dei seguenti zuccheri, rispettivamente: da 5.0 a 50.0g/L di glucosio oppure di lattosio come sole fonti carboniose;

(e) MRS liquidi preparati in assenza o con dosi crescenti da 2.0 a 10.0g/L, rispettivamente di dipotassio-idrogeno-fosfato (K_2HPO_4) e di potassio-diidrogeno-fosfato (KH_2PO_4) o la combinazione di 2.0g/L di K_2HPO_4 con 2.0g/L KH_2PO_4 ;

(f) brodi MRS integrati con dosi crescenti da 2.0 a 20.0g/L di glicerolo;

(g) MRS liquidi con e senza solfato di magnesio- $MgSO_4$;

(h) MRS liquidi con e senza solfato di manganese- $MnSO_4$;

(i) MRS liquidi senza od integrati con 2.0g/L e 4.0g/L di citrato triammonico; MRS liquidi senza od integrati con 5.0g/L e 10.0g/L di di acetato di sodio ed infine

(j) brodi MRS senza od integrati con Polysorbate 80 (Tween 80) da 1.0 a 5.0g/L.

Tutte le colture sono state incubate a 30°C per 24 h e sono stati monitorati i livelli di attività delle batteriocine, utilizzando la *Listeria monocytogenes* 211 come microrganismo sensibile nello spot test secondo [Van Reenen et al. \(1998\)](#). Tutti gli esperimenti sono stati fatti in triplo.

Crescita del microrganismo test in presenza delle batteriocine

In questa prova, 20 ml del supernatante contenente la batteriocina (pH 6.0), previa sterilizzazione per filtrazione con filtri da 0.20 μm , (Minisart®, Sartorius) sono stati aggiunti a 100 ml di brodo coltura di *Listeria monocytogenes* 211, alla terza ora della fase di crescita ($OD_{600} = 0.1 - 0.2$). L'incubazione è stata fatta in BHI liquido (Oxoid) a 37°C. Ad intervalli di ogni ora sono state eseguite le letture di densità ottica allo spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf) a 600 nm, per 12 h.

Determinazione della riduzione delle cellule vitali del microrganismo target in presenza delle batteriocine

Brodo colture all'inizio della fase stazionaria (18 h) del ceppo sensibile di *L. monocytogenes* 211 sono state raccolte per centrifugazione (5000 x g, 5 min, 4 °C), lavate per due volte ed infine risospese in 10 ml, usando soluzione salina sterile sia per i lavaggi che per la risospensione. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state miscelate ad uguali volumi di surnatanti contenenti le batteriocine, previamente sterilizzati per filtrazione. Si è quindi proceduto alla conta per spatolamento, su piastre di BHI agarizzato, delle cellule vitali presenti prima e dopo un incubazione per 1 h a 37 °C. Sospensioni cellulari di *L. monocytogenes* 211 alle quali non sono state aggiunti i surnatanti contenenti le batteriocine sono serviti come controllo.

Adsorbimento delle batteriocine sulle cellule target

Per lo studio dell'adsorbimento delle batteriocine sulle cellule bersaglio si è applicata la metodica descritta da [Yildirim et al. \(2002\)](#). Sono stati utilizzati i seguenti ceppi microbici, *L. monocytogenes* 211, *L. monocytogenes* 637, *L. monocytogenes* 620, *L. sakei* ATCC 15521 and *E. faecium* ATCC 19443), che sono stati incubati per una notte in brodo BHI broth a 37°C e quindi centrifugati ad 8.000 x g, per 15 min a 4°C. Le cellule raccolte sono state lavate due volte in tampone fosfato 5mM sterile e risospese nello stesso tampone ad un OD a 600 nm di circa 1.0. Dopo una correzione del pH al valore di 6.5 con NaOH 0.1M sterile, ogni sospensione cellulare è stata miscelata con un volume uguale di surnatante contenente le batteriocine (pH 6.5), ed incubata a 37°C per 1 h. Si è quindi proceduto alla rimozione delle cellule (8000 x g, 15 minuti, 25°C) ed alla determinazione dell'attività delle batteriocine non legate ancora presenti nel supernatante con la tecnica dello spot test secondo [Van Reenen \(1997\)](#). Tutti gli esperimenti sono stati fatti in doppio.

La percentuale di adsorbimento delle batteriocine sulle cellule sensibili viene calcolata applicando la formula seguente:

$$\% \text{ adsorbimento} = 100 - \left[\frac{AU / mL_1}{AU / mL_o} \times 100 \right]$$

dove AU/mL_1 si riferisce all'attività della batteriocina dopo il trattamento, mentre AU/mL_0 indica l'attività nativa, prima del trattamento.

L'influenza del pH e della temperatura sull'adsorbimento delle batteriocine

I surnatanti contenenti le batteriocine e con pH corretto a 6.0, sono stati aggiunti alla *L. monocytogenes* 211 come descritto precedentemente, e quindi incubati per 1 h rispettivamente a 4, 25, 30 e 37°C al fine di valutare l'effetto della temperatura, mentre sono stati incubati alla temperatura di 30°C ma con valori di pH di 4.0, 6.0, 8.0 e 10.0, per testare, appunto, l'effetto del pH. Le cellule sono state raccolte (8000 x g per 15 minuti a 25°C) ed dopo aver ricorretto, nel caso dell'esperimento per l'influenza del pH, il potenziale idrogenionico al valore di 6.0 con NaOH 0.1M sterile, è stata determinata l'attività antimicrobica dei surnatanti come descritto nel test precedente. Anche questo test è stato fatto in doppio.

L'effetto dei sali inorganici e dei composti organici sull'adsorbimento delle batteriocine sulle cellule bersaglio

Per realizzare questo test, cellule di *L. monocytogenes* 211 preparate come indicato nell'esperimento sull'adsorbimento delle batteriocine sulle cellule target, sono state trattate rispettivamente con Tween 20, Tween 80, NaCl, Sodium dodecyl sulphate-SDS, disodio-idrogeno-fosfato (Na_2HPO_4) e sodio-diidrogeno-fosfato (NaH_2PO_4) tutti ad una concentrazione del 1% (p/v). Dopo una correzione del pH al valore di 6.5 con NaOH 0.1M sterile, ogni sospensione cellulare è stata miscelata con un volume uguale di surnatante contenente le batteriocine, ed incubata per 1 h a 30°C. Le cellule sono state allontanate (8000 x g, 15 minuti, 25°C) ed è stata determinata l'attività delle batteriocine non legate ancora presenti nel supernatante come indicato nei saggi precedenti. Tutti gli esperimenti sono stati fatti in doppio.

Isolamento e parziale purificazione delle batteriocine

I ceppi produttori sono stati fatti crescere in 1 litro di terreno MRS a 30°C per 24 h. Le cellule sono state rimosse per centrifugazione (10.000 x g, 10 minuti, 4°C), il pH

del supernatante è stato corretto al valore di 6.0 con NaOH 1M e sterilizzato per filtrazione con filtri Millex-GV, Millipore da 0.22 µm a basso legame per le proteine (PVDF membrana Durapore). Le Batteriocine sono state precipitate con ammonio solfato (purezza 99%, Carlo Erba) ad una concentrazione finale del 50 %, lasciando in agitazione il surnatante a 100 rpm alla temperatura di 4°C per 4 h. Il precipitato è stato raccolto per centrifugazione (12.000 x g, 1 h, 4°C), sospeso in ammonio acetato 25 mM (pH 6.5) in un rapporto di 1:10 del volume originale e dializzato in acqua MilliQ sterile a 4°C per 24 h, usando membrane da dialisi con pori da 1-kDa (Spectrum Inc., CA, USA).

Dopo la dialisi i campioni sono stati centrifugati (10.000 x g, 10 minuti, 4°C), risospesi in acqua milliQ e deidratati in liofilizzatore centrifugo Speed-Vac; questo preparato grezzo è stato conservato a – 20°C.

La parziale purificazione della batteriocine o comunque l'ottenimento dell'estratto proteico grezzo attraverso la precipitazione con solfato di ammonio, è la metodica maggiormente utilizzata data la minore aggressività di questo composto, rispetto ad altre utilizzate per la precipitazione in generale di substrati proteici.

In questo lavoro, l'estratto proteico grezzo, è stato anche ottenuto attraverso l'uso di concentratori centrifughi Amicon della Millipore, con membrana in cellulosa rigenerata a basso legame per le proteine, con diversi tagli molecolari a 30 kDa, 10 kDa e 3 kDa ed in grado di concentrare il volume iniziale di 200 volte.

Determinazione della dimensione in Tricine SDS-PAGE

I retentati dei diversi cut-off a 30, 10 e 3 kDa, nonché l'eluato del 3 kDa, tutti ottenuti con i concentratori centrifughi sono stati utilizzati per una prima stima della dimensione dei peptidi attivi; per questo 10 µl di ciascuna frazione e di ciascun ceppo produttore, sono stati posti su una piastra petri contenente 10 ml di strato di brain heart infusion (BHI) agarizzato contenente la *L. monocytogenes* 211 come microrganismo indicatore. Le piastre sono quindi state poste ad incubare alla temperatura di 37°C per una notte e quindi osservate per gli aloni d'inibizione.

Per stimare la dimensione delle molecole delle batteriocine, 10 µl dell'estratto proteico grezzo dializzato, ottenuto per precipitazione con il solfato d'ammonio, è stato

separato in gel di tricina-sodio-dodecil-solfato (SDS)-poliacrilamide (15%) per identificare proteine a basso peso molecolare, così come descritto da [Scägger and von Jagow \(1987\)](#), usando un marcatore di peso molecolare standard con dimensioni da 2.35 a 46 kDa (Amersham International, UK).

Dopo elettroforesi, il gel è stato rimosso e tagliato verticalmente in due parti. Una metà contenente il campione ed il marcatore di peso molecolare sono stati colorati con Coomassie Brilliant Blue R250. L'altra metà del gel, non sottoposta a colorazione, contenente il campione è stata immediatamente fissata per 2 h con una soluzione di isopropanolo al 20 % e di acido acetico al 10 % e lavata abbondantemente in acqua milliQ per 5 h. Questa seconda metà è stata posta dentro una piastra petri e ricoperta con 15 ml di agar soft Brain Heart Infusion (BHI broth più 0.75% agar), contenente circa 10^5 cellule di *L. monocytogenes* 211 come microrganismo indicatore. Dopo 12 h d'incubazione a 37°C, la piastra è stata esaminata per una zona d'inibizione di crescita, per determinare la posizione e la dimensione della batteriocina attiva nel gel, così come descritto da [Bhunja et al. \(1987\)](#).

RESULTS AND DISCUSSION

Capacità antimicrobica e spettro di attività

La ricerca di stipti microbici produttori di batteriocine è stata effettuata utilizzando come microrganismi test *E. coli* DSMZ 30083, *L. monocytogenes* DSMZ 20.600, *S. choleraesuis* ceppo DSMZ 13772 e *S. aureus* ceppo DSMZ 20231 (figura 6,7); quattro isolati con l'alone d'inibizione più ampio sono stati selezionati per ulteriori studi (figura 8,9). Nessuno dei quattro ceppi ha mostrato attività inibitoria nei confronti di *E. coli* DSMZ 30083, *S. choleraesuis* DSMZ 13772 e *S. aureus* DSMZ 20231 mentre tutti hanno inibito lo sviluppo della *L. monocytogenes* ceppo DSMZ 20.600 (figura 10).

I quattro ceppi isolati, identificati come *Enterococcus faecium* sia con le prove fenotipiche-fisiologiche che attraverso l'analisi del 16S r-DNA, sono stati indicati con le sigle SD1, SD2, SD3 ed SD4. Come descritto nei materiali e metodi, con l'inserimento dell'enzima proteolitico pronasi all'interno del mezzo colturale di crescita (BHI), i ceppi di *E. faecium* hanno perso la capacità di inibire la *L. monocytogenes*, questo ha confermato la natura proteica della sostanza antimicrobica (Figure 11,12).

Il supernatante libero da cellule dell'*E. faecium* SD1 ha inibito la crescita dei microrganismi *E. faecium* SD3, *E. faecium* ATCC 19443, *Lb. sakei* ATCC 15521, *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, *L. monocytogenes* DSMZ 20.600, *L. monocytogenes* IZPSS, *Salmonella enterica* subsp. *enteric*, *Salmonella* Montevideo 28, *Salmonella* Agona 29, *Salmonella* Brandenburg 32, *Salmonella* Brandenburg 33 e *Salmonella* Madelia 34. Il supernatante dell'*E. faecium* SD2 ha mostrato profili d'inibizione simili, inibendo i ceppi di *Enterococcus faecium* SD3, *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, *L. monocytogenes* DSMZ 20.600, *L. monocytogenes* IZPSS, *Salmonella enterica* subsp. *enteric*, *Salmonella* Montevideo 28, *Salmonella* Agona 29, *Salmonella* Brandenburg 32, *Salmonella* Brandenburg 33 e *Salmonella* Madelia 34. Uno spettro di attività diverso è stato ottenuto dal ceppo SD3 di *E. faecium* che ha inibito *E. faecium* SD1, *E. faecium* SD2, *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, *L. monocytogenes* DSMZ 20.600, *L. monocytogenes* IZPSS, *Salmonella enterica* subsp. *enteric*, *Salmonella* Montevideo 28, *Salmonella* Brandenburg 32. Per l'*E. faecium* SD4 è stato registrato uno spettro di attività meno ampio, avendo inibito la crescita solo dei ceppi di *E. faecium* SD1 ed SD3, *L. monocytogenes* 1/2b, 1/2c, 4b, *L. monocytogenes* DSMZ 20.600 e *L. monocytogenes* IZPSS (tabella 8).

L'inibizione mostrata nei confronti della *Listeria monocytogenes* dalle batteriocine prodotte dai quattro ceppi di *E. faecium* suggerisce che, dette batteriocine possano essere ascritte nella classe IIA (batteriocine ad azione anti *Listeria*) dello schema di classificazione generale, con la presenza nella loro struttura del motivo YGNGV nella regione conservativa N-terminale. La funzione del motivo consenso YGNGV non è chiara, dato che nel meccanismo di adesione delle batteriocine sulle membrane delle cellule bersaglio, nelle prime fasi, intervengono interazioni elettrostatiche fra i gruppi residui positivi degli aminoacidi ed i gruppi fosfolipidici della membrana carichi negativamente, senza alcun coinvolgimento del motivo YGNGV (Todorov, S.D. 2009). La Pediocina PA-1 è la batteriocina più caratterizzata all'interno di questo gruppo (Marugg et al., 1992).

Da sottolineare l'azione d'inibizione mostrata dalle batteriocine SD1, SD2 ed SD3 nei confronti di diversi ceppi di *Salmonella* poichè, l'attività contro batteri gram negativi è un fenomeno abbastanza inusuale ed è stato rilevato solo per poche batteriocine, come l'enterocina AS-48 ed MR99 rispettivamente prodotte dai ceppi di *E. faecalis* S-48 (Ananou et al., 2005) ed MR99 (Sparo et al., 2006), e l'enterocina 012 prodotta dall'*Enterococcus gallinarum* (Jennes et al., 2002). Anche una batteriocina prodotta da un ceppo di *Lactobacillus plantarum* isolato da molassa, ha mostrato di possedere attività contro *A. baumannii* (Todorov and Dicks, 2005), così come è stata riportata attività antimicrobica nei confronti di specie batteriche gram negative per la batteriocina ST4SA prodotta da *E. mundtii* ST4SA (Knoetze, et al., 2008). Il peptide ST4SA si differenzia dalle batteriocine della classe IIa poichè è attivo contro *S. pneumoniae* ed altri batteri Gram positivi isolati dall'orecchio medio, mentre anche le enterocine della classe IIc, 50LA e 50LB prodotte da *Enterococcus faecium* L50, sono attive contro *S. pneumoniae* (Cintas et al., 2000).

La forte attività mostrata dalle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 contro la *Listeria monocytogenes* potrebbe avere un effetto positivo sulla sicurezza alimentare qualora i relativi ceppi produttori venissero impiegati come colture starter o come co-colture nei processi di produzione dei formaggi. Si sottolinea il fatto che le batteriocine non presentano effetti inibitori significativi sugli altri batteri lattici, aspetto questo molto importante per non inibire la crescita delle altre colture starter utilizzate nella fase di caseificazione.

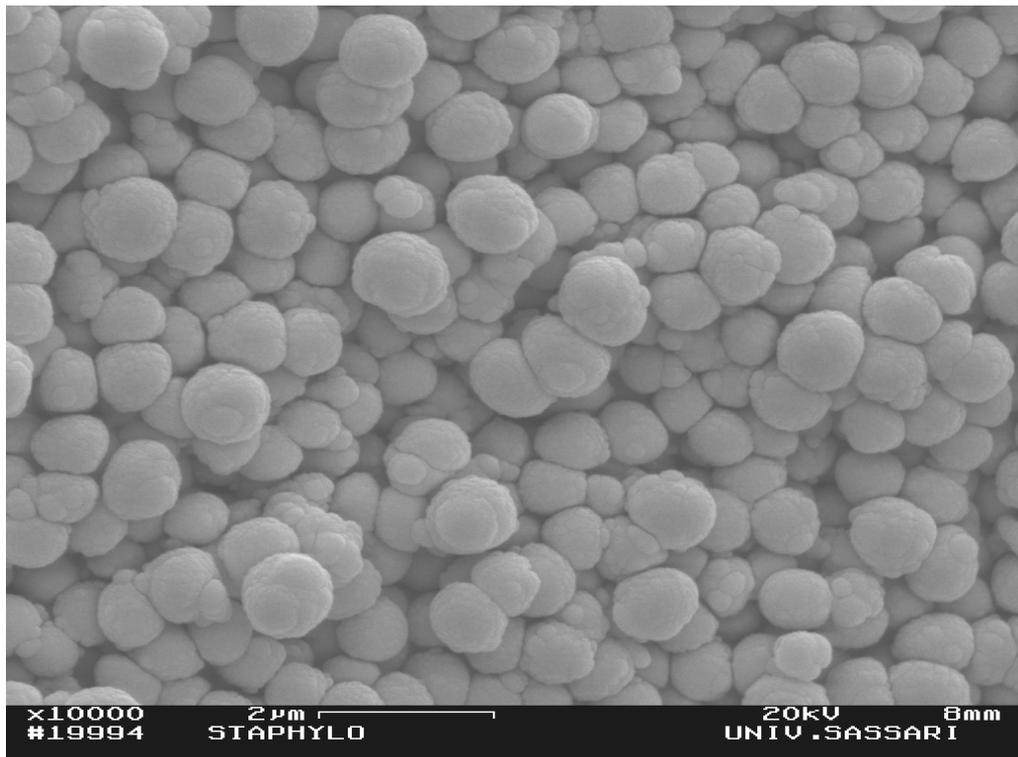


A)

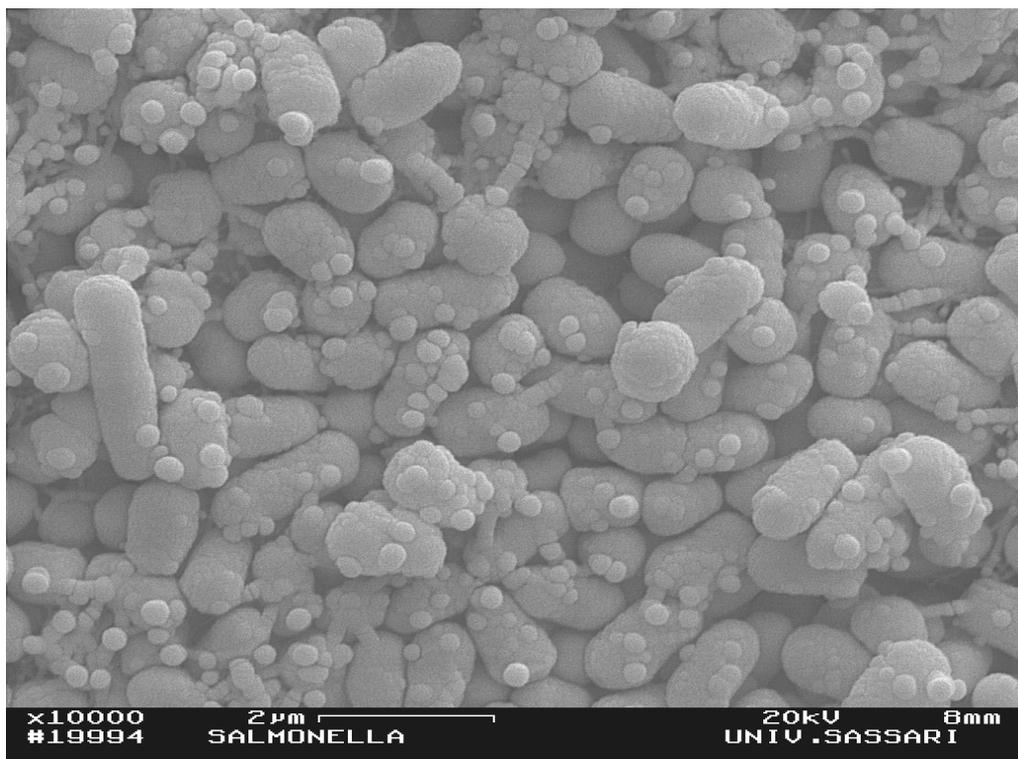


B)

Fig. 6 - Foto al SEM di alcuni microrganismi testati: **A)** *L. monocytogenes* DSMZ 20.600; **B)** *E. coli*. DSMZ 30083.



A)



B)

Fig. 7 - Foto al SEM di alcuni microrganismi testati: **A)** *S. aureus* DSMZ 20231
B) *Salmonella choleraesuis* DSMZ 13772.

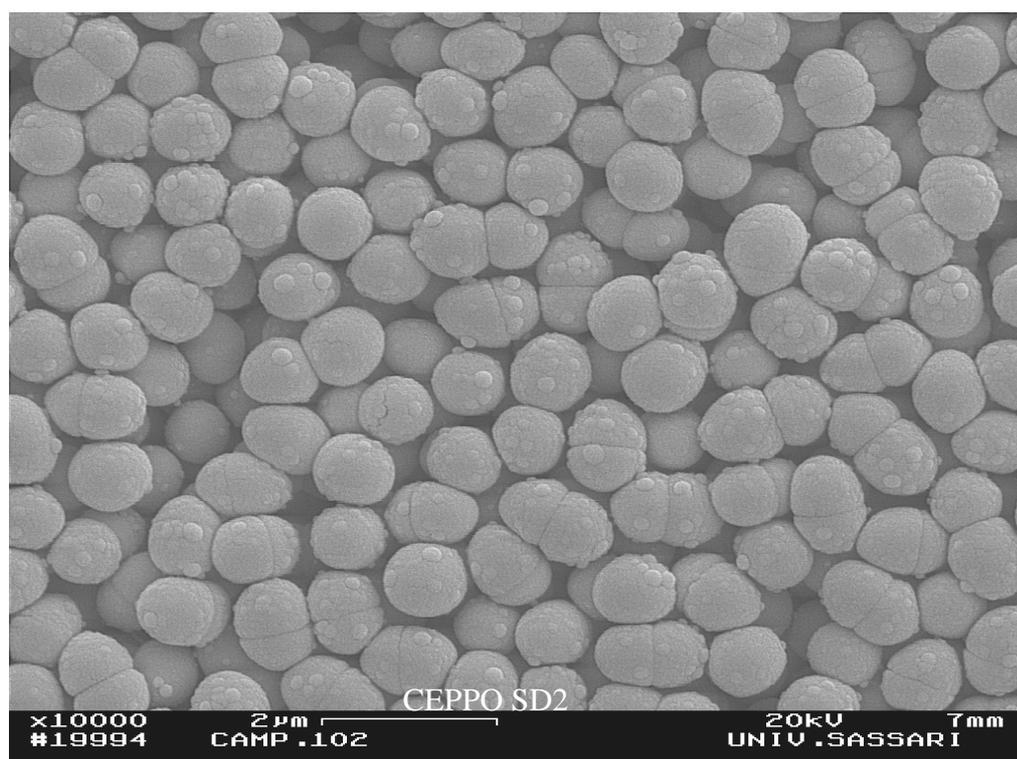
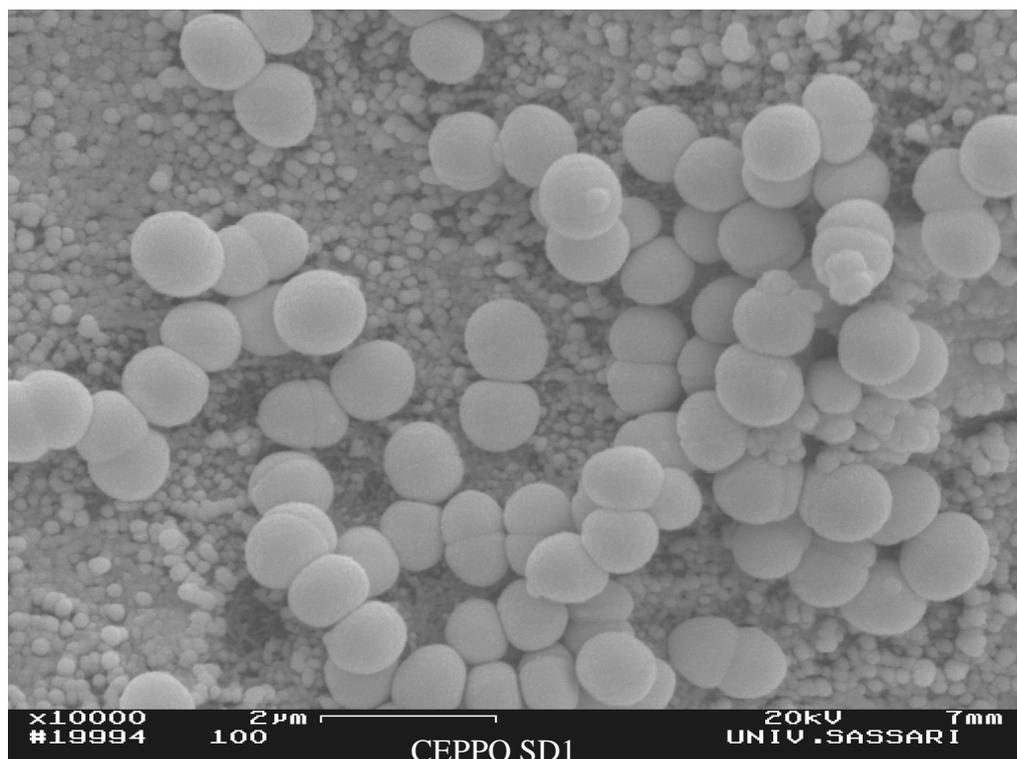


Fig. 8 - Foto al SEM dei ceppi di *Enterococcus faecium* SD1 ed SD2 produttori di batteriocine.

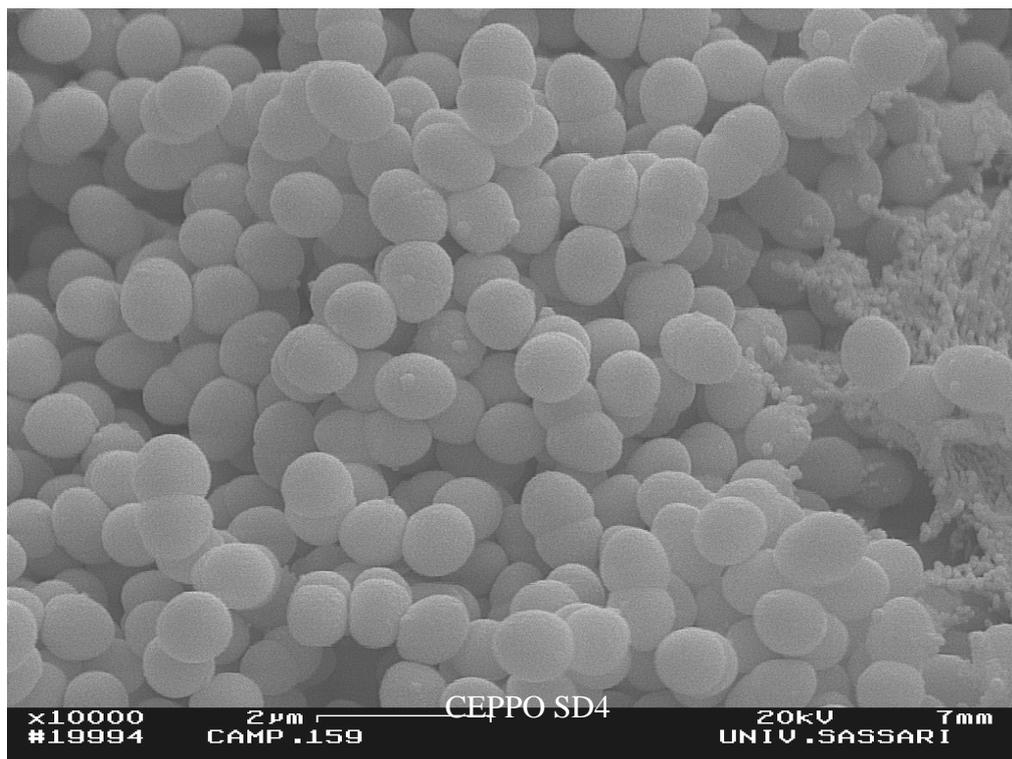
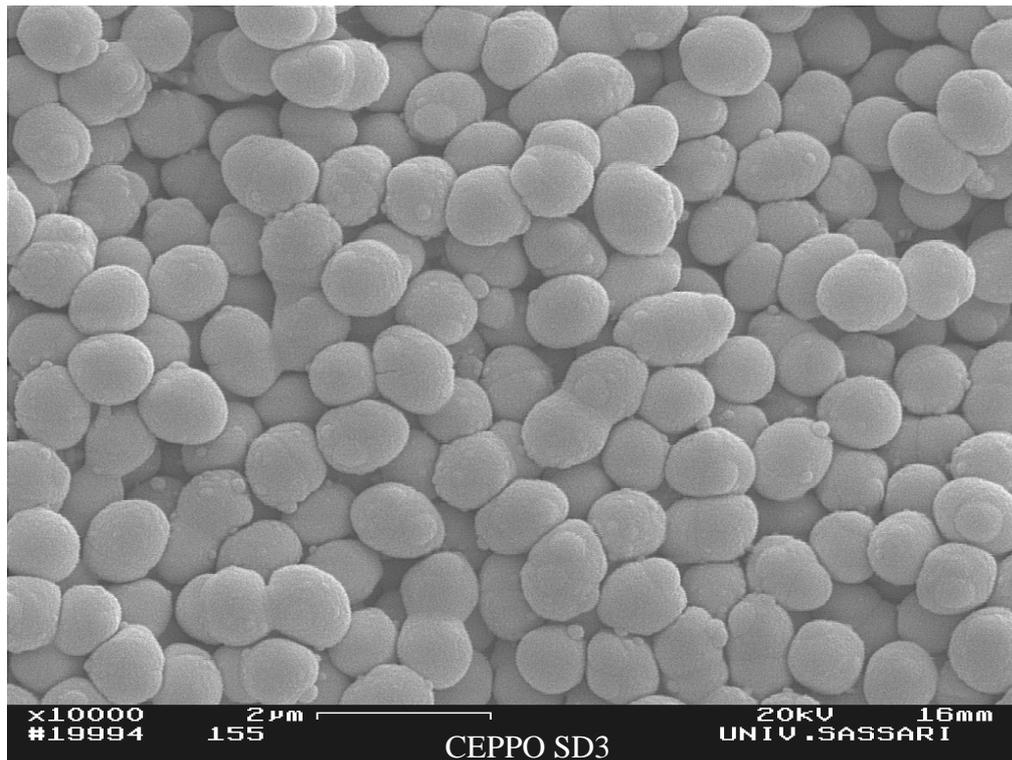
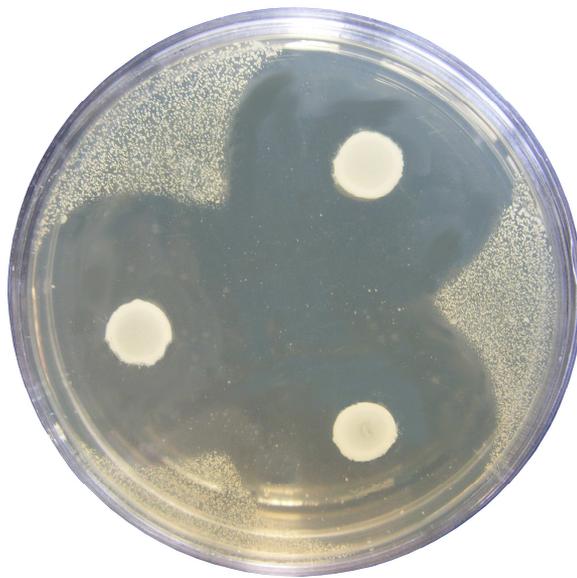
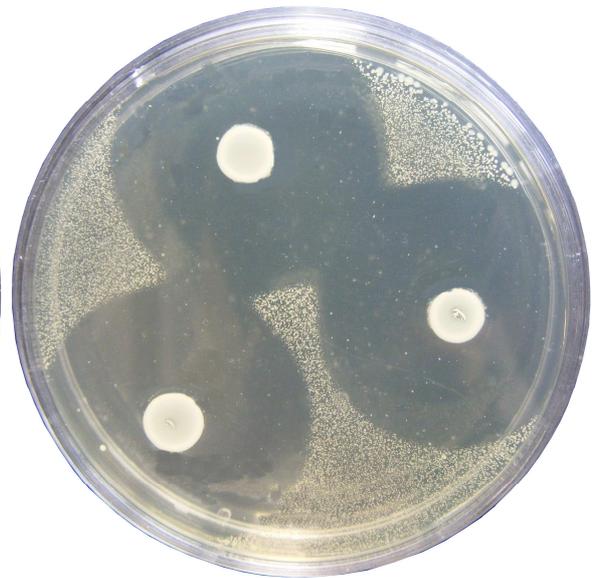


Fig. 9 - Foto al SEM dei ceppi di *Enterococcus faecium* SD3 ed SD4 produttori di batteriocine.



Ceppo SD1



Ceppo SD2



Ceppo SD3



Ceppo SD4

Fig. 10 - Spot test su BHI con evidenti gli aloni di inibizione dei ceppi produttori nei confronti di *L. monocytogenes* DSMZ 20600.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

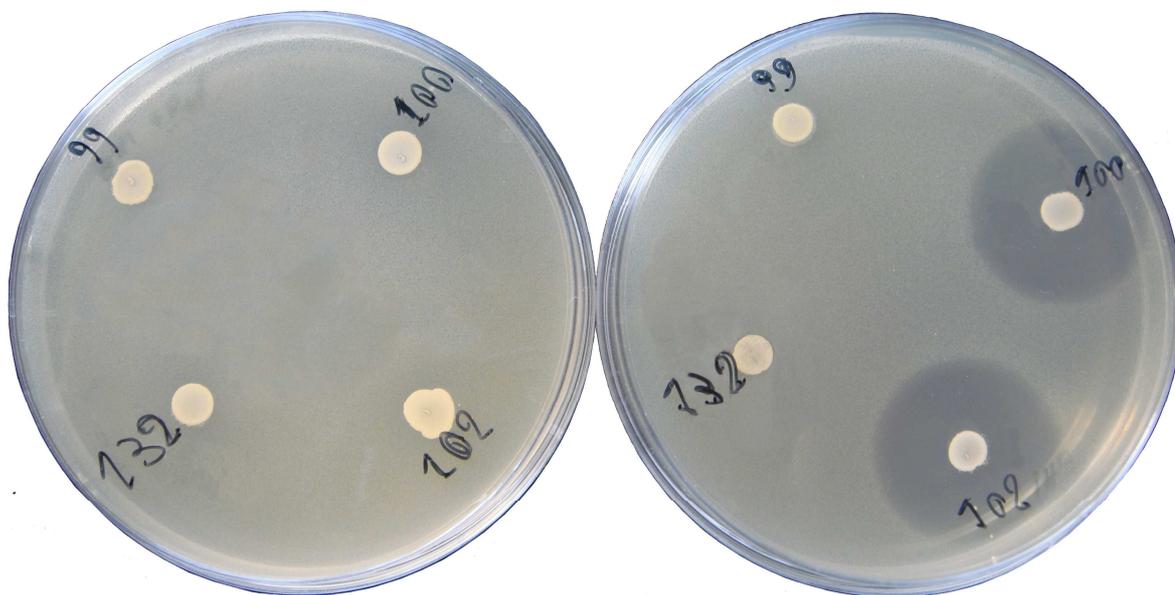


Fig. 11 - Spot test su BHI Agar. Piastra sx con Pronase incluso nel mezzo di crescita; piastra dx preparata senza Pronase. Ceppo SD1 ex 100, ceppo SD2 ex 102.



Fig. 12 - Spot test su BHI Agar. Piastra sx con Pronase incluso nel mezzo di crescita; piastra dx preparata senza Pronase. Ceppo SD3 ex 155, ceppo SD4 ex 159.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

Tabella 8. Spettro di attività antibatterica delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4

Microorganismi test	media	Temp. (°C)	SD1	SD2	SD3	SD4
			Alone (mm)	Alone (mm)	Alone (mm)	Alone (mm)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	BHI	37	0	0	0	0
<i>Bacillus mycoides</i> 14	BHI	37	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	BHI	37	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> SD1	MRS	30	0	0	17	10
<i>Enterococcus faecium</i> SD2	MRS	30	0	0	10	0
<i>Enterococcus faecium</i> SD3	MRS	30	17	16	0	9
<i>Enterococcus faecium</i> SD4	MRS	30	0	0	0	0
<i>E. faecium</i> ATCC 19443	MRS	30	8	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	BHI	37	0	0	0	0
<i>E. coli</i> DSMZ 30083	BHI	37	0	0	0	0
<i>Lb. sakei</i> ATCC 15521	MRS	30	9	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> 38	BHI	37	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> 39	BHI	37	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i> 101, 4b	BHI	37	18	19	15	0
<i>L. monocytogenes</i> 103, 1/2a	BHI	37	20	15	11	0
<i>L. monocytogenes</i> 104, 1/2a	BHI	37	21	22	8	0
<i>L. monocytogenes</i> 211, 4b	BHI	37	17	12	10	4
<i>L. monocytogenes</i> 302, 4b	BHI	37	15	12	10	0
<i>L. monocytogenes</i> 408, 1/2c	BHI	37	20	18	12	0
<i>L. monocytogenes</i> 409, 1/2a	BHI	37	21	18	17	0
<i>L. monocytogenes</i> 422, 1/2c	BHI	37	18	15	12	0
<i>L. monocytogenes</i> 426, 1/2b	BHI	37	20	18	12	0
<i>L. monocytogenes</i> 506, 1/2a	BHI	37	15	15	12	0
<i>L. monocytogenes</i> 603, 1/2b	BHI	37	21	18	12	0
<i>L. monocytogenes</i> 607, 1/2b	BHI	37	22	23	17	5
<i>L. monocytogenes</i> 620, 4b	BHI	37	18	15	16	5
<i>L. monocytogenes</i> 637, 1/2c	BHI	37	17	20	15	5

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

<i>L. monocytogenes</i> 703, 4b	BHI	37	16	18	10	0
<i>L. monocytogenes</i> 709, 1/2a	BHI	37	22	20	12	0
<i>L. monocytogenes</i> 711, 1/2c	BHI	37	23	18	10	0
<i>L. monocytogenes</i> 712, 1/2c	BHI	37	20	20	10	0
<i>L. monocytogenes</i> 724, 4b	BHI	37	20	19	10	0
<i>L. monocytogenes</i> DSMZ 20.600	BHI	37	20	20	12	4
<i>L. monocytogenes</i> IZPSS	BHI	37	18	19	10	5
<i>L. monocytogenes</i> ScottA	BHI	37	0	0	0	0
<i>Listeria seeligeri</i> 13	BHI	37	0	0	0	0
<i>Listeria welshimeri</i> 12	BHI	37	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Agona 29	BHI	37	11	10	0	0
<i>Salmonella</i> Anatum 30	BHI	37	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Braenderup H9812	BHI	37	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Brandenburg 32	BHI	37	10	9	7	0
<i>Salmonella</i> Brandenburg 33	BHI	37	13	14	0	0
<i>Salmonella choleraesuis</i> DSMZ 13772	BHI	37	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enteric</i> 31	BHI	37	15	16	9	0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	BHI	37	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Heidelberg 27	BHI	37	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Madelia 34	BHI	37	8	9	0	0
<i>Salmonella</i> Montevideo 28	BHI	37	12	14	6	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	BHI	37	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	BHI	37	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	BHI	37	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> DSMZ 20231	BHI	37	0	0	0	0

Esclusione dell'attività inibitoria dovuta a fagi litici

Si può chiaramente escludere che l'inibizione sia dovuta all'attività di batteriofagi litici, poiché la formazione delle "placche" fagiche non è stata rilevata ed il test di sensibilità agli enzimi proteolitici ha mostrato la natura proteica delle sostanze inibenti lo sviluppo dei microrganismi sensibili. Inoltre, si ha un'ulteriore conferma con i risultati del test di resistenza ai trattamenti termici, poiché anche dopo essere stati sottoposti a temperature sicuramente proibitive per i fagi, i supernatanti dei quattro ceppi in esame hanno conservato l'attività antimicrobica.

Calcolo dell'Unità Arbitraria

Come già detto nella parte riguardante i materiali e metodi l'attività antimicrobica viene espressa in Unità Arbitrarie o Unità di Attività per millilitro (AU/ml); una Unità Arbitraria è definita come il reciproco della più alta diluizione mostrante una chiara zona d'inibizione (Todorov and Dicks, 2005).

L'Unità è "Arbitraria" perché il suo valore dipende da tanti parametri quali la composizione del mezzo di crescita, la temperatura ed i tempi di esposizione, il pH del mezzo, la sensibilità del microrganismo sensibile, etc., e quindi più in generale dalle condizioni sperimentali adottate.

L'attività (espressa in UA/mL) è stata determinata dopo 24 h di crescita dei microrganismi produttori in MRS liquido (Oxoid) a 30°C, mentre la *L. monocytogenes* 211 è servita come microrganismo test. Il calcolo delle Unità Arbitrarie, sia con la tecnica dell'agar-well-test sia con il metodo dell'agar-spot-test, quest'ultimo eseguito così come descritto da Van Reenen et al. (1998), ha fornito gli stessi valori.

I ceppi di *Enterococcus faecium* SD1 ed SD2 hanno fatto registrare i più alti valori di attività con 51.200 UA/ml alle 24 h, dopo aver applicato la formula $a^b \times 100$, dove "a" rappresenta il fattore di diluizione in base 2 e "b" l'ultima diluizione che produce una zona d'inibizione di almeno 2 mm di diametro, mentre il 100 è il fattore di conversione (spot di 10 µl) al fine di poter esprimere il valore dell'UA per ml. Nel caso delle batteriocine SD1 ed SD2 applicando la formula appena descritta si è avuto $2^9 \times 100 = 25600$ UA/ml. Il ceppo di *E. faecium* SD3 ha segnato valori di attività di 3200 UA/ml dato da $2^5 \times 100$, mentre il valore più basso di attività è stato riscontrato con il ceppo SD4 dove $2^3 \times 100 = 800$ UA/ml (Figura 13).

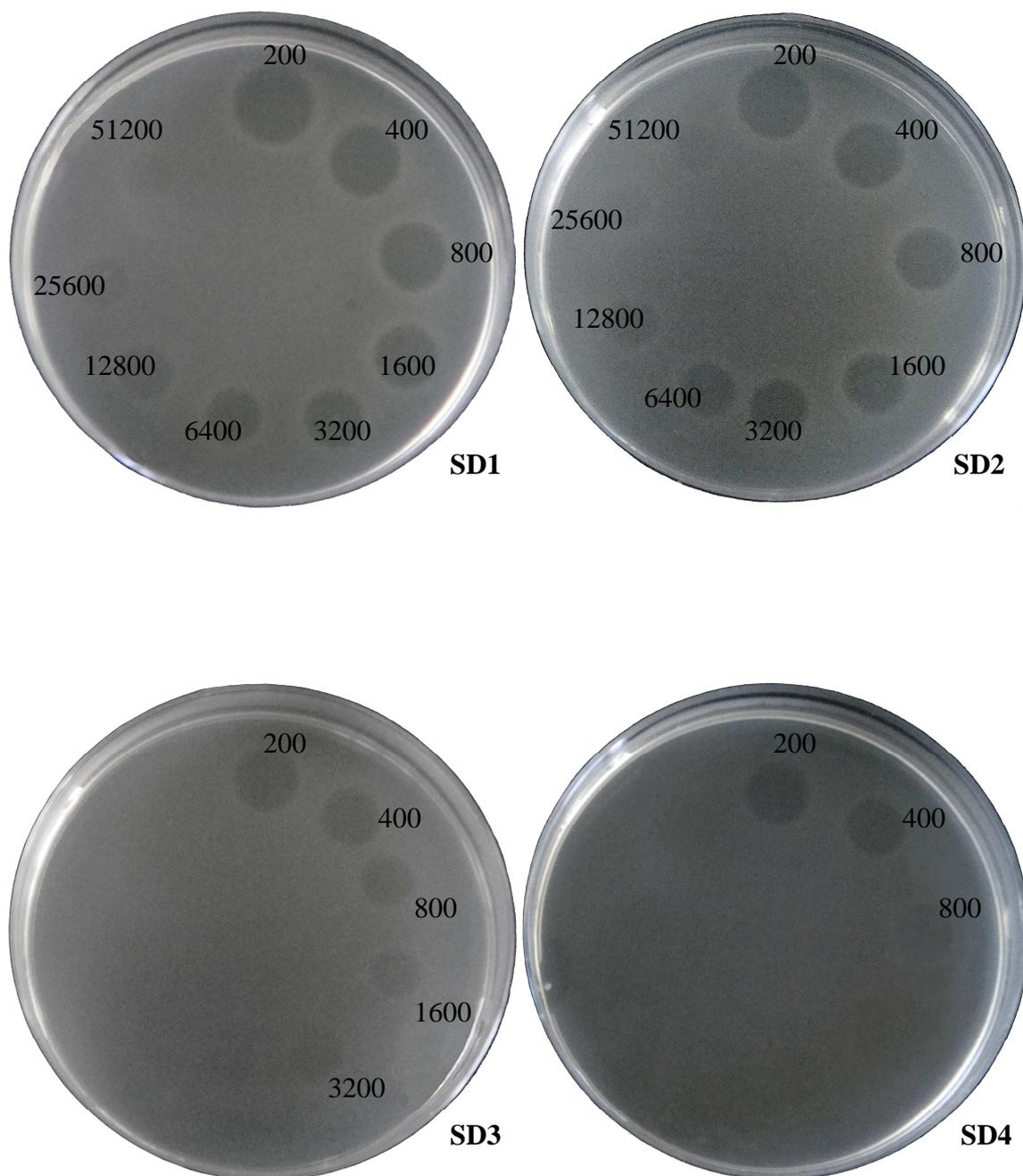


Fig. 13 - Unità arbitraria dei 4 ceppi produttori, in MRS, alla 24° h .
La *L. monocytogenes* 211 è stata usata come microrganismo test.

Effetto dei trattamenti col calore

Le batteriocine SD1 ed SD2 si sono dimostrate le più resistenti agli effetti del calore, conservando una certa attività dopo essere state sottoposte alla temperatura di 100°C per 120 minuti ed anche dopo il trattamento di sterilizzazione a 121°C x 15'; la batteriocina SD3 ha conservato l'attività quando è stata sottoposta a trattamento di 100°C per un tempo di 2 ore, ma è stata disattivata dal trattamento di sterilizzazione. Infine la batteriocina SD4 era ancora attiva dopo trattamento di 100°C x 30' ma è stata disattivata dopo i 40' (Figure 14, 15, 16, 17).

L'enterocine 1071A e 1071B prodotte da *Enterococcus faecalis* BFE 1071 sono resistenti ai trattamenti termici fino a 100°C per 60 minuti e conservano approssimativamente il 50% dell'attività antibatterica dopo sterilizzazione per 15 minuti a 121°C (Balla et al., 2000). Anche per l'enterocina P l'attività è rimasta stabile dopo trattamento termico dell'estratto libero da cellule per 60 minuti a 100°C, o per 15 minuti a 121°C (Arlindo et al., 2006).

Per quanto riguarda l'enterocina MR99, batteriocina prodotta da *Enterococcus faecalis* MR99, l'attività non ha subito variazioni con trattamenti fino a 90°C per 30 minuti mentre si è ridotta del 50 % dopo 30 minuti a 100°C. Si è raggiunta la completa inattivazione in autoclave a 121°C per 15 min (Sparo et al., 2006). Anche nel caso della enterocina M, batteriocina prodotta da *Enterococcus faecium* AL41 le temperature di 60, 80 e 100°C impiegate per la durata di 1 h non hanno modificato l'attività.

L'enterocina HJ35 prodotta *Enterococcus faecium* HJ35 ha mostrato di essere relativamente stabile, conservando l'attività quando è stata trattata a 100°C per 30 minuti. Risultati simili di resistenza al calore sono stati rilevati per diverse batteriocine prodotte sia da ceppi di *Lactobacillus* che di *Lactococcus*; la Lattocina NK24, prodotta da *L. lactis*, ha perso 87.5% della sua attività dopo 30 minuti a 100 °C ed è stata completamente inattivata dopo 15 minuti a 121 °C (Lee and Paik., 2001).

La stessa nisina, prodotta da *L. lactis* WNC20, è stata inattivata dopo un trattamento di sterilizzazione classica per 15 min a 121 °C, mentre la Bozacina B14 prodotta da *L. lactis* ha perso l'attività antimicrobica quando è stata trattata per 10 minuti a 90 °C (Ivanova et al., 2000).

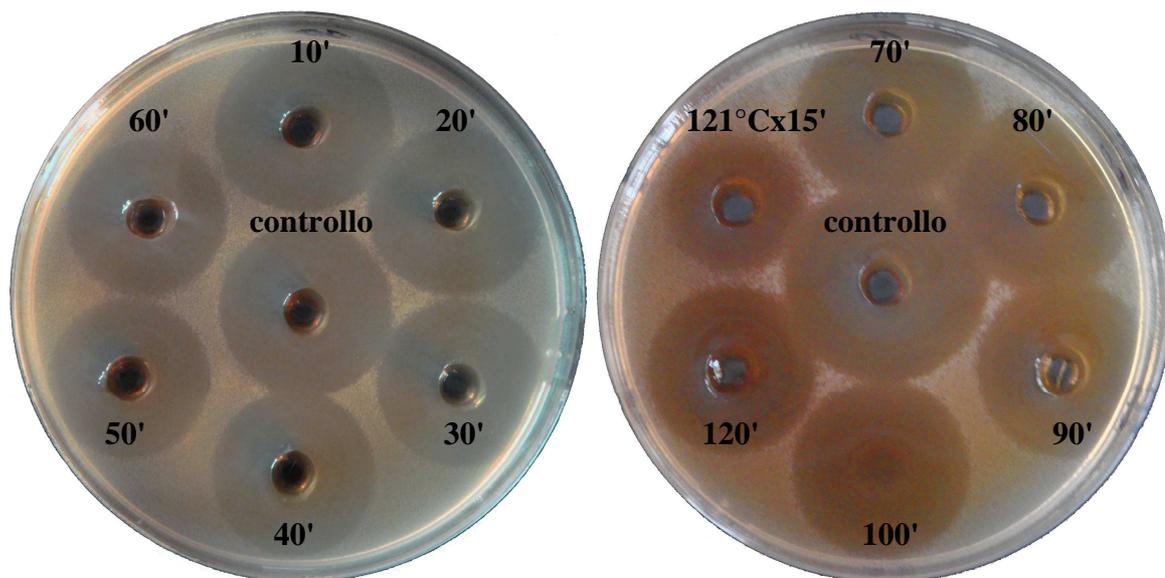


Fig. 14 - Conservazione dell'attività antimicrobica della batteriocina SD1 dopo esposizione alla temperatura di 100°C per tempi diversi.

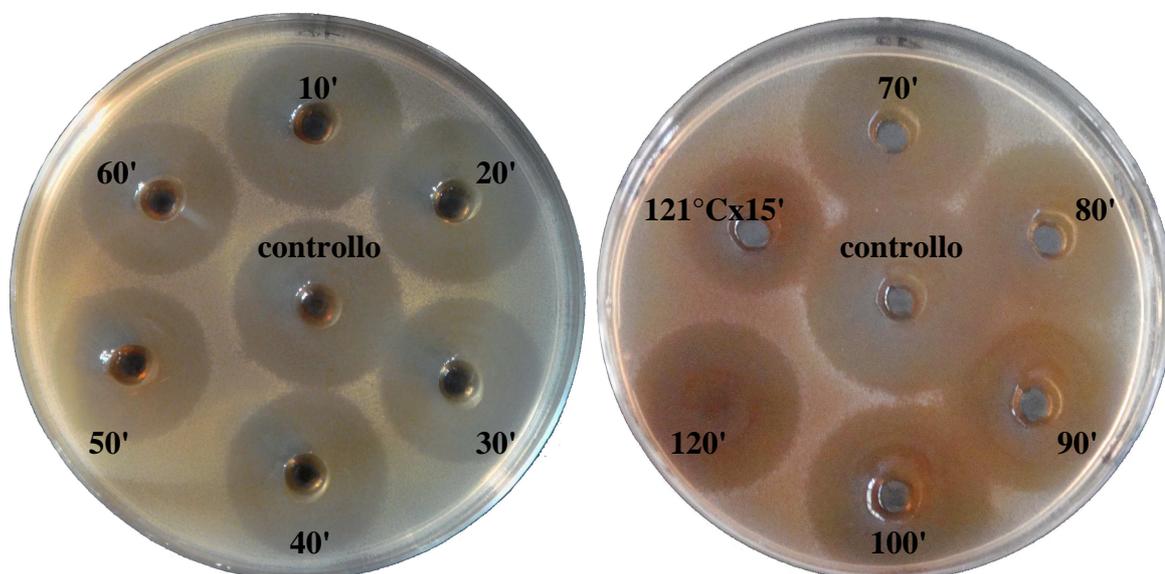


Fig. 15 - Conservazione dell'attività antimicrobica della batteriocina SD2 dopo esposizione alla temperatura di 100°C per tempi diversi.

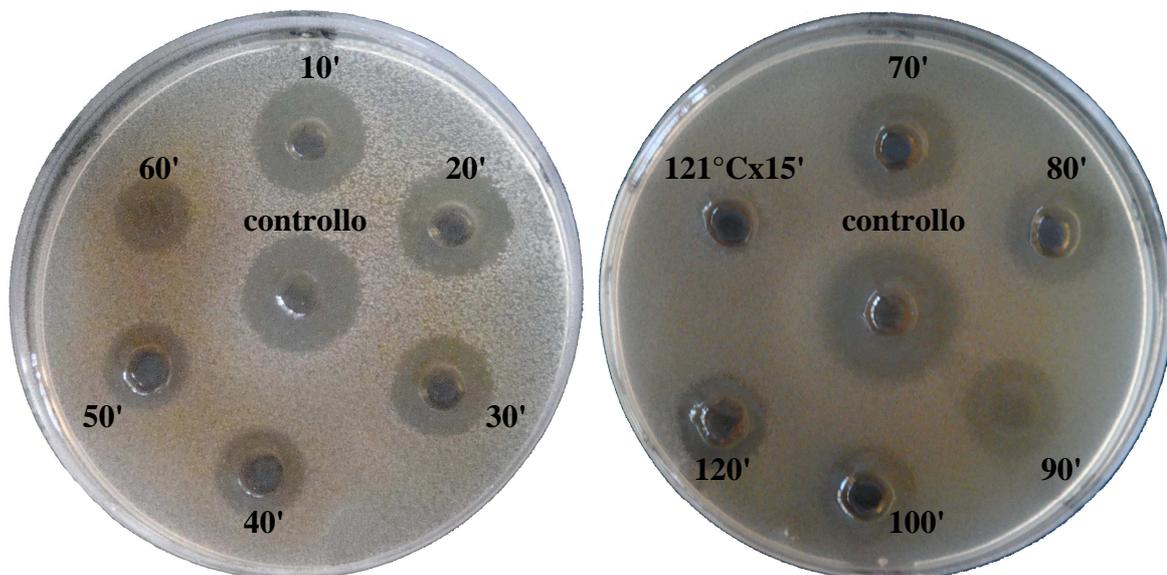


Fig. 16 - Conservazione dell'attività antimicrobica della batteriocina SD3 dopo esposizione alla temperatura di 100°C per tempi diversi.

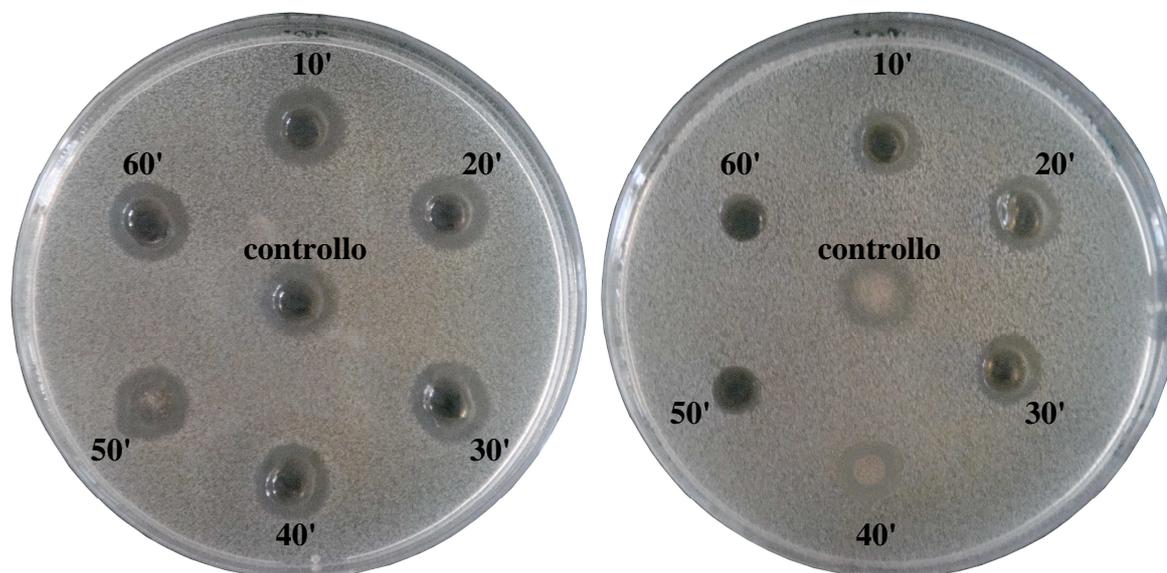


Fig. 17 - Conservazione dell'attività antimicrobica della batteriocina SD4 dopo esposizione, per tempi diversi, alla temperatura di 90°C per la piastra a sinistra ed a 100°C per la piastra a destra .

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

Effetto degli enzimi

Le batteriocine SD1, SD2 ed SD3, a conferma della loro natura proteica, sono risultate sensibili ed hanno mostrato una completa inattivazione quando sono state sottoposte all'azione dei diversi enzimi proteolitici testati, papaina, pepsina, pronase tipo XIV, proteinase K, rennina (bovina) e tripsina; la catalasi non ha influito sull'attività escludendo così l'acqua ossigenata tra le possibili cause dell'inibizione, mentre l'azione della α -amilasi ha portato alla perdita totale dell'attività, suggerendo che le quattro batteriocine siano glicosilate e che quindi nella struttura del complesso molecolare oppure della molecola attiva siano presenti degli zuccheri, la cui idrolisi porta ad una perdita dell'attività antimicrobica.

Diverso è stato il comportamento della SD4 che è stata disattivata dal pronase e dalla tripsina, ma ha mostrato solo una riduzione parziale nei confronti di proteinasi K, α -amilasi, papaina, pepsina e chimosina; la catalasi non ha mostrato alcun effetto, escludendo così l'azione dell'acqua ossigenata (Figura 18). Le batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 potrebbero, quindi, appartenere al IV° gruppo dello schema di classificazione generale delle batteriocine (Klaenhammer, 1988). La maggior parte delle batteriocine, secondo De Vuyst and Vandamme (1994) sono dei polipeptidi e ad oggi sono state descritte solo poche batteriocine che sono un'eccezione a questa regola e che di conseguenza rientrano nella IV° classe (Klaenhammer, 1988).

Tipici esempi di batteriocine sensibili all' α -amilasi sono la Leuconocina S, prodotta da *Leuconostoc paramesenteroides* (Lewus et al., 1992) e la carnocina 54, prodotta da *Leuconostoc carnosum* (Keppler et al., 1994). L'attività della Pediocina PA-1 non risulta influenzata da trattamenti con catalasi e lisozima, mentre viene persa dopo incubazione con enzimi proteolitici come tripsina, papaina, chimotripsina, proteasi IV, proteasi XIV, proteasi XXIV e proteinasi K (Ray et al., 1989). Le batteriocine prodotte da diverse specie di Pediococchi mostrano una certa resistenza agli enzimi proteolitici; il trattamento delle pediocine SM-1 e PD-1 con papaina, pepsina, tripsina o α -chimotripsina non ha avuto effetto sull'attività, mentre le due pediocine sono risultate sensibili all'azione della proteinasi K (Anastasiadou et al., 2008a; Green et al., 1997).

La batteriocina T8 prodotta da *Enterococcus faecium* T8, è risultata sensibile alla proteinasi K, pepsina e pronase mentre il trattamento con amilasi non ha avuto effetto sull'attività (De Kwaadsteniet et al., 2006).

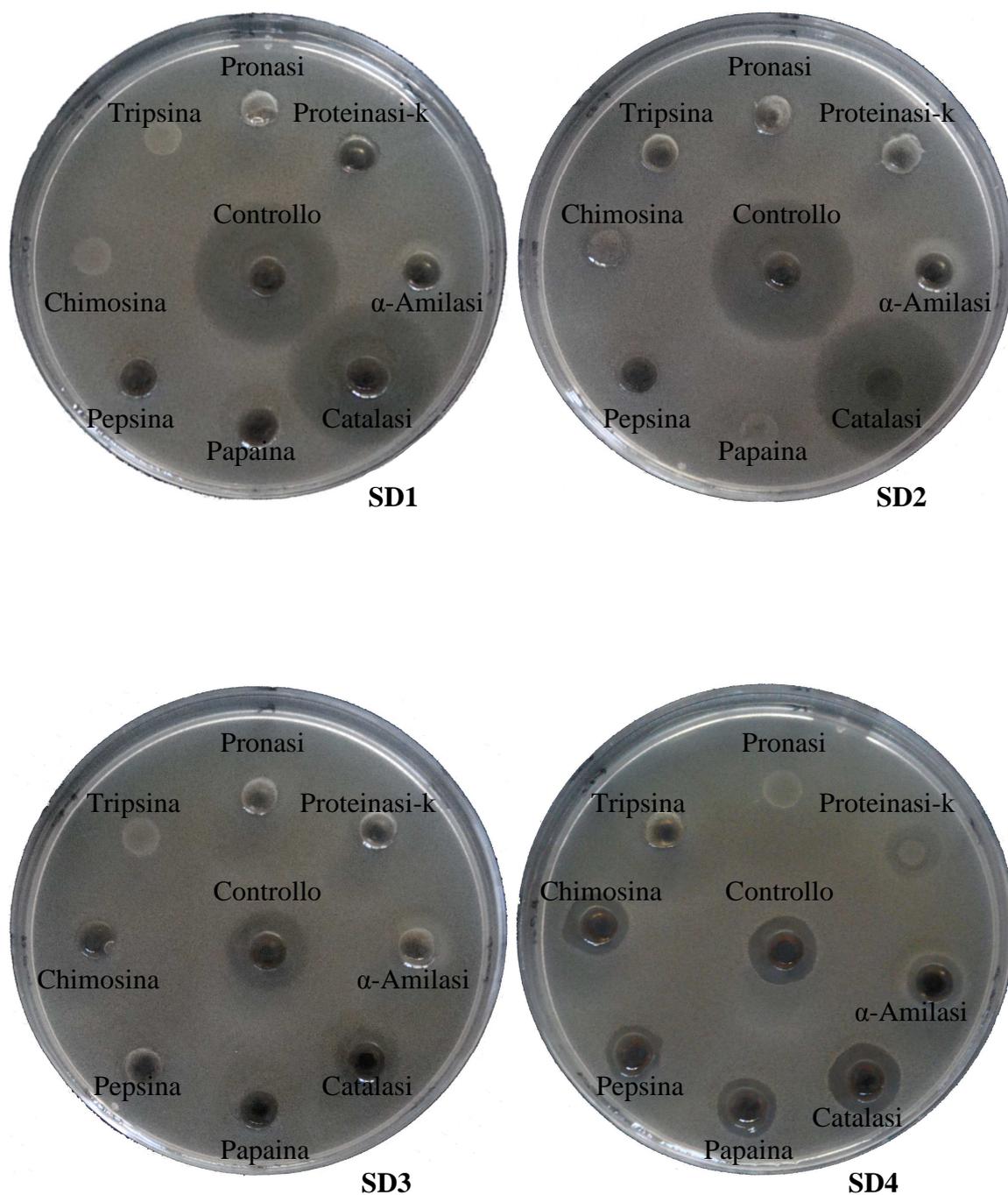


Fig. 18 - Test di sensibilità delle quattro batteriocine a vari enzimi (1mg /ml, 37°C x 2h).

Effetto del pH

Le batteriocine sono rimaste stabili dopo un tempo di esposizione di 30' e di 2 h alla temperatura di 37°C, con valori di pH compresi da 2 ad 11; tutte hanno invece mostrato una riduzione dell'attività a pH 12 (Figure 19, 20, 21, 22).

L'Enterocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 sono quindi consistentemente stabili in ampi intervalli di pH. Queste caratteristiche sono tipiche di diverse enterocine già conosciute e caratterizzate, quali l'enterocina A (Aymerich et al., 1996), l'enterocina B (Casaus et al., 1997), l'enterocina P (Cintas et al., 1997) produced by *E. faecium*, e l'enterocine 1071A e 1071B, prodotte da *E. faecalis* (Balla et al., 2000).

La batteriocina prodotta da *E. mundtii*, denominata mundticina è risultata stabile per 14 h a valori di pH da 1 fino a 10 (Bennik et al., 1998) mentre l'attività della mundticina KS prodotta da *E. mundtii* ceppo NFRI 7393 non è stata marcatamente influenzata dopo incubazione a 37°C x 30 minuti a valori di pH da 3 a 12 (Kawamoto et al., 2002). Valori simili sono stati registrati per le enterocine 1071A e 1071B, le quali non sono state drasticamente influenzate da valori di pH da 3 a 12. Nessuna attività battericida è stata rilevata per la batteriocina T8, una batteriocina prodotta da *E. faecium* T8, quando sottoposta a valori di pH 2 e 12 (De Kwaadsteniet et al., 2006).

L'*E. mundtii* QU 2 produce la mundticina Qu 2, che mostra attività in un ampio spettro di pH da 2 a 11 ed un massimo di 12 800 UA/ml contro *Lact. plantarum* ATCC 14917^T; ancora a pH 12, la batteriocina conserva un attività di 800 UA/ml (Zendo et al., 2005).

La batteriocina sintetizzata da *Enterococcus faecium* LR/6 denominata enterocina LR/6 non ha subito perdite nell'attività nel range di pH tra 2.0 e 6.0, ma ha mostrato una riduzione del 20 % a valori di pH di 7.0 ed 8.0 (Kumar et al., 2009), mentre la enterocina HJ35 prodotta da *E. faecium* HJ35 è stabile fra pH 3.0 e pH 9.0 (Chang Yoon et al., 2005).

Sono diverse le batteriocine da enterococchi che possiedono e conservano una certa stabilità in ampi intervalli di pH anche a valori estremi (pH 2 oppure 12); questa è una caratteristica molto importante e deve essere tenuta in grande considerazione per una loro applicazione come conservanti degli alimenti.



Fig. 19 - Effetto del pH sull'attività della batteriocina SD1.



Fig. 20 - Effetto del pH sull'attività della batteriocina SD2.



Fig. 21 - Effetto del pH sull'attività della batteriocina SD3.



Fig. 22 - Influenza del pH sull'attività della batteriocina SD4.

Effetto dei tensioattivi e dei sali

L'attività delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 non sembra essere influenzata dall'azione dei diversi tensioattivi e dei sali utilizzati nel test. Particolare attenzione meritano N-Laourylsarcosine (sale sodico, tensioattivo anionico, L5125-Sigma), Sodium dodecyl sulphate (SDS-detergente anionico, L6026-Sigma) e Triton X-100 (tensioattivo non ionico, T9284-Sigma), perché manifestando essi stessi attività inibitoria nei confronti del microrganismo test “mascherano” l'eventuale alone d'inibizione prodotto dalle batteriocine (Figura 23).

Nessuno dei tensioattivi e dei sali impiegati nella prova ha annullato o ridotto l'attività delle batteriocine testate, come si evince dal confronto con il controllo presente in ogni piastra. E' invece evidente, particolarmente nel caso della batteriocina SD4 un effetto “somma” dell'attività della batteriocina stessa con l'azione inibitoria esplicata dai tre tensioattivi citati in precedenza, N-Laourylsarcosine, SDS e Triton X-100.

L'effetto del Tween 80 è stato inoltre osservato confrontando i valori di UA/ml ottenuti dai surnatanti ottenuti da colture microbiche dei quattro ceppi di *E. faecium* cresciuti su brodo MRS (Tween 80, 0.1%) e su MRS modificato senza Tween 80; è evidente l'apporto positivo dato dal Tween 80 nella produzione delle quattro batteriocine (Figura 24)

In letteratura si riporta che l'attività della batteriocina ST44AM non viene influenzata dalla presenza del 1% di SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114, Urea, EDTA od NaCl. Risultati simili si sono ottenuti con la plantaricina 423 (Verellen et al., 1998), la pediocina AcH (Biswas et al., 1991), la lattacina B (Barefoot and Klaenhammer, 1984) e la lattocina 705 (Vignolo et al., 1995). Anche l'attività della plantaricina C19 non è stata ridotta quando sottoposta al trattamento con SDS oppure Triton X-100 (Atrih et al., 1993), così come anche per la pediocina ST18 (Todorov and Dicks, 2005a), la enterocina EJ97 prodotta da *E. faecalis* EJ97, la plantaricina ST31 (Todorov et al., 1999) e la bozacina B14 (Ivanova et al., 2000).

Pantev et al. (2002) hanno riscontrato che nel caso della enterococcina A 2000, fra i diversi tensioattivi testati SDS, Triton X-100, Tween 20, Tween 80, urea ed N-laourylsarcosine, solo quest'ultimo inibiva l'attività della batteriocina.

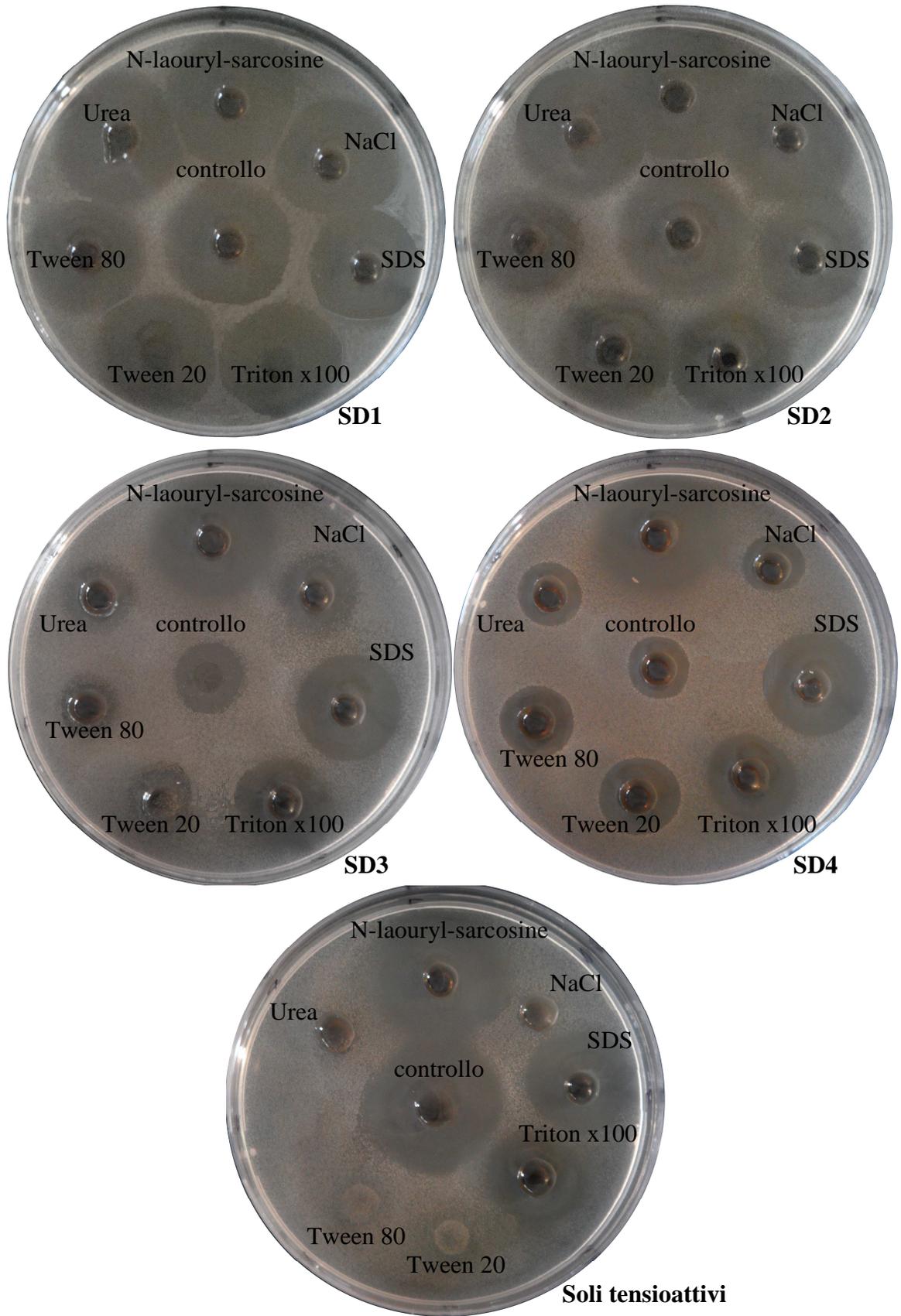


Fig. 23 - Effetto dei tensioattivi e dei sali sulle diverse batteriocine.

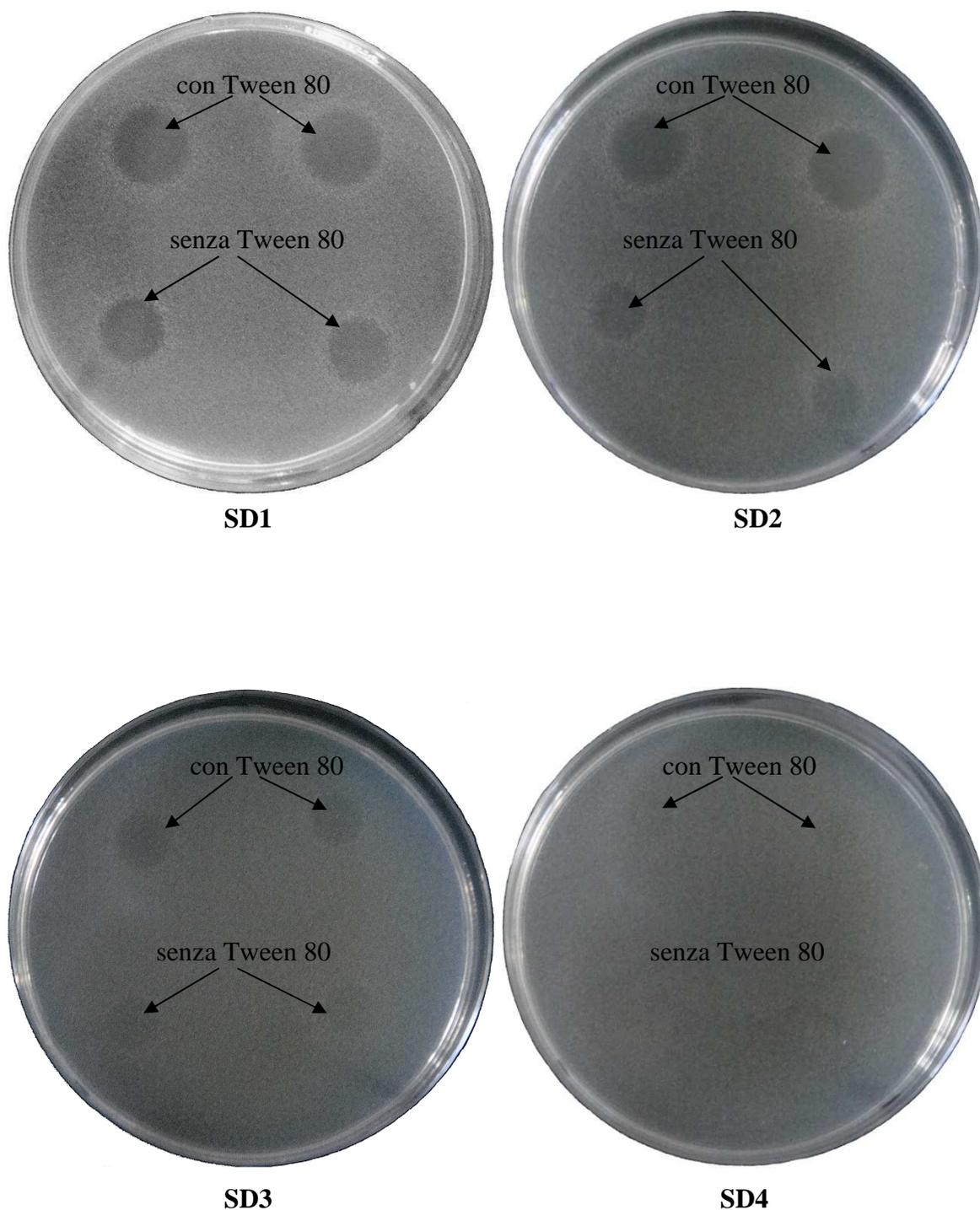


Fig. 24 - L'effetto positivo del Tween 80 sulla produzione delle batteriocine; confronto tra MRS ed MRS modificato (senza tween 80).

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

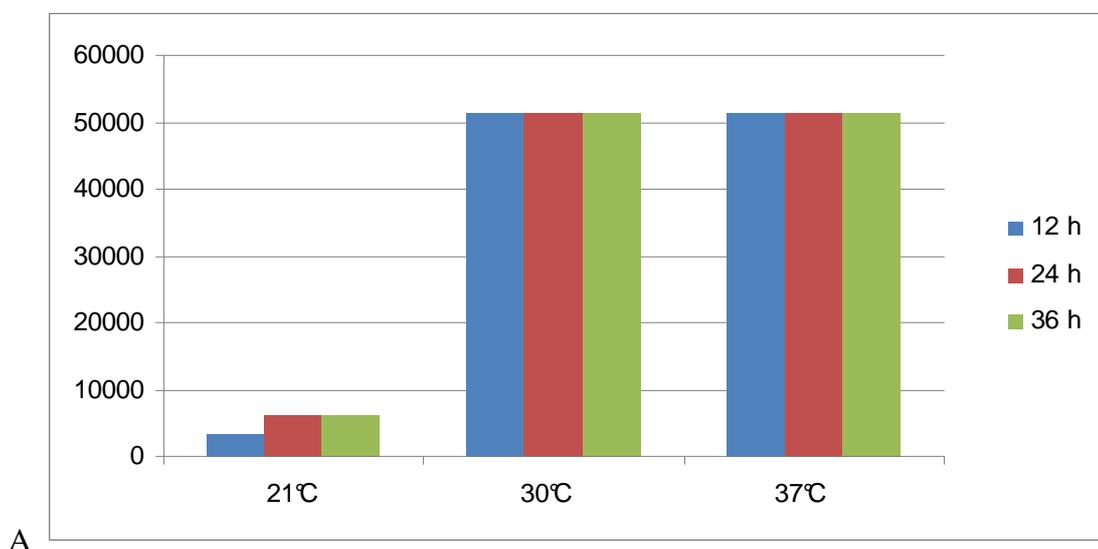
Università degli Studi di Sassari

Stabilità delle batteriocine nel tempo

L'attività antimicrobica delle batteriocine è risultata stabile dopo che i surnatanti, sono stati incubati a 25°C per 72 h; questo suggerisce l'assenza di proteasi nei supernatanti o la mancanza d'azione nei confronti delle batteriocine.

Produzione delle batteriocine a diversi tempi e temperature

Dall'osservazione dei grafici (figura 25) si nota che la temperatura d'incubazione di 21°C ha fatto registrare i più bassi livelli di attività per tutti e quattro i ceppi produttori; nel ceppo SD3, il livello di produzione della batteriocina non è stato neppure rilevabile. Nei ceppi SD1 ed SD4 alla temperatura sia di 30 che di 37°C non vi è stata alcuna differenza nel calcolo delle UA/ml al variare della durata dell'incubazione; per il ceppo SD1 sono state registrate 51200 UA/ml a 12, 24 e 36 h, mentre il ceppo SD4 ha marcato un valore di 800 UA/ml sempre per gli stessi tempi. L' *E. faecium* SD2 ha fatto registrare la massima produzione in assoluto tra tutti e quattro i ceppi, con 102400 UA/ml ottenuto alla temperatura di 37°C ed alla 36° h d'incubazione; lo stesso ceppo alla medesima temperatura ma alla 12° ed alla 24° h, ed alla temperatura di 30°C per tutti e tre i tempi di rilevamento ha raggiunto 51200 UA/ml. La temperatura di 30°C sembra la più ottimale per la sintesi della batteriocina SD3, che sia alla 12° h sia alla 24° ha fatto registrare un valore di attività di 3200 UA/ml. Da notare, infine, che la batteriocina SD4 alla temperatura di 21°C ed alla 24° h d'incubazione, ha ottenuto un valore di 800 UA/ml, dato simile a quegli conseguiti con le temperature di 30 e 37°C.



A

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

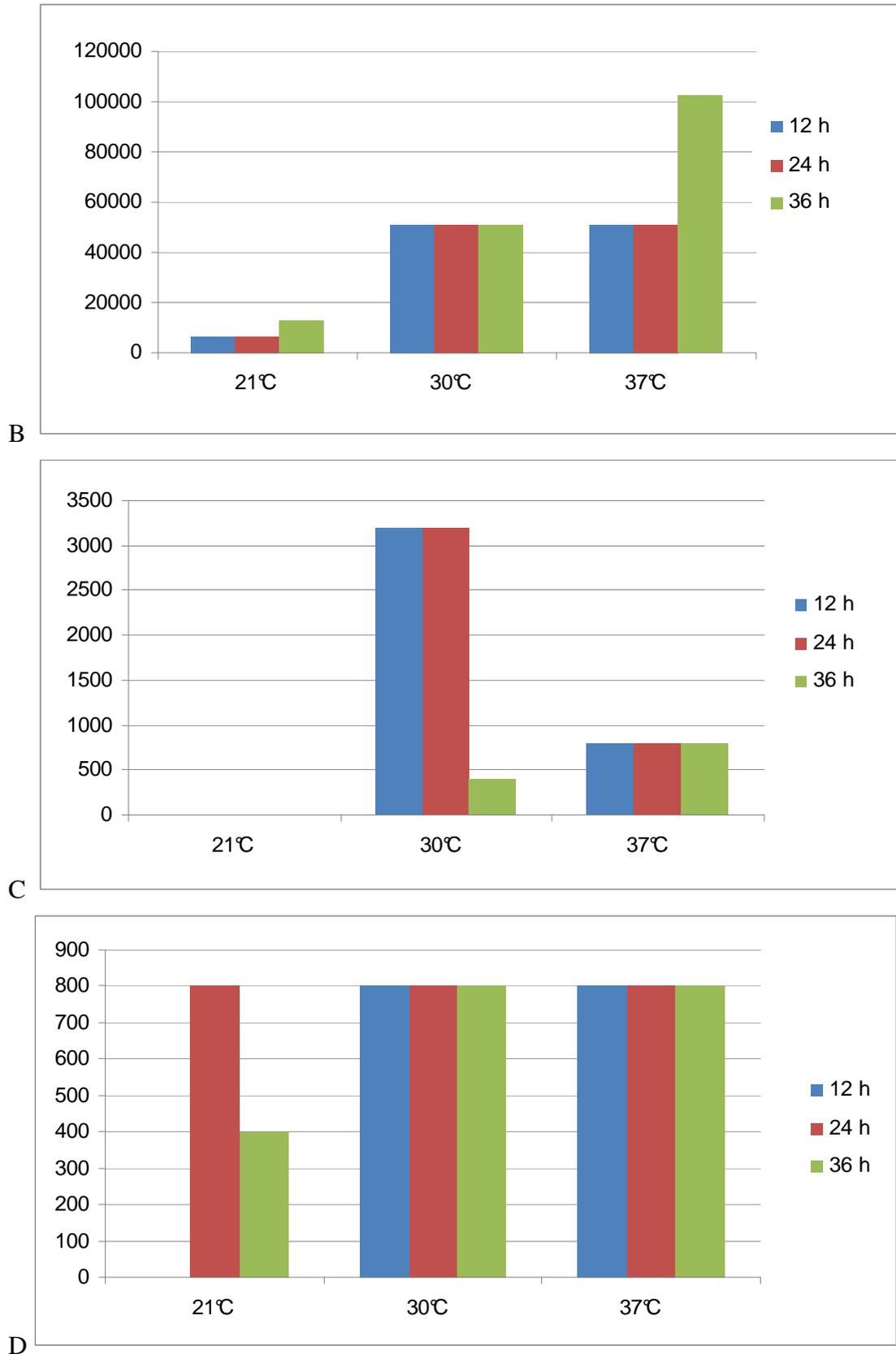


Figura 25. Produzione espressa in UA/ml delle batteriocine SD1 (A, pagina precedente), SD2 (B), SD3 (C) ed SD4 (D) a 12, 24, 36 h ed a diversi valori di temperatura di 21, 30 e 37°C.

Produzione delle batteriocine in differenti terreni ed a diversi pH iniziali di crescita

La produzione delle batteriocine è fortemente dipendente da diverse variabili quali il pH e la composizione del mezzo, la temperatura e la durata d'incubazione, etc.

Inoltre, i massimi livelli di attività non sono sempre correlati con la massa cellulare o con il tasso di crescita del microrganismo produttore (Kim et al., 1997; Bogovic-Matijasic and Rogelj, 1998). Maggiori livelli nella produzione delle batteriocine si ottengono spesso in condizioni differenti, di solito non ottimali, come ad esempio temperature più basse rispetto a quelle richieste per l'optimum di sviluppo (Todorov and Dicks., 2004; Parente et al., 1994; Parente and Ricciardi, 1994; Mortvedt-Abildgaard et al., 1995; De Vuyst et al., 1996; Matsusaki et al., 1996; Krier et al., 1998; Aasen et al., 2000; Todorov et al., 2000).

E' stata rilevata la curva di produzione delle batteriocine SD1 (fig. 26C, 27), SD2 (fig. 28C, 29), SD3 (fig. 30C, 31) ed SD4 (fig. 32C, 33) durante le 27 ore ad intervalli di 3 h, mentre con cadenza oraria sono state eseguite sia la lettura della densità ottica che l'andamento del pH per i singoli ceppi produttori SD1 (fig. 26 A-B), SD2 (fig. 28 A-B), SD3 (fig. 30 A-B) ed SD4 (fig. 32 A-B). L'incubazione è avvenuta a 30°C in terreno liquido MRS con 2% d'inoculo.

Tutte le prove di attività sono state condotte utilizzando come microrganismo sensibile la *L. monocytogenes* 211.

Per quanto riguarda la crescita microbica dei ceppi di *E. faecium* durante le 24 ore, è stata registrato un aumento della densità cellulare da 0.04-0.05 (OD_{600nm}) ad, approssimativamente, un valore di 2.7-3.0 (tenendo in considerazione nel calcolo il fattore di diluizione).

Sono stati registrati livelli di produzione delle batteriocine SD1 ed SD2 (3200 UA/mL) dopo 3 h di crescita in MRS liquido, mentre per i ceppi SD3 ed SD4 non è stato rilevato alcun livello di attività. Alla 6° h il valore di attività è salito a 12800 UA/ml per i ceppi SD1 ed SD2, mentre per la batteriocina SD3 si è avuto un livello di attività di 1600 UA/ml e nessuna produzione per il ceppo SD4. L'attività delle batteriocine SD1 ed SD2 ha raggiunto rispettivamente le 51200 e le 25600 UA/ml dopo 9 h d'incubazione, le 6400 UA/ml per il ceppo SD3 ed ancora nessuna produzione per la batteriocina SD4. Dopo 12 h di crescita le batteriocine SD1 ed SD2 hanno confermato i valori della 9° h mentre si registra un calo per la SD3 con 3200 UA/ml; per la batteriocina SD4 è stata rilevata una certa attività di 800 UA/ml. Con eccezione per la SD2 che registra 51200 UA/ml, il

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

monitoraggio alla 24° h ha confermato i livelli già registrati nelle prime 12 h, con 25.600 UA/ml per la batteriocina SD1, 3200 UA/ml per la batteriocina SD3 e le 800 UA/ml per la SD4. Nell'ultimo rilievo effettuato alla 27° h il livello di attività delle batteriocine SD1 ed SD2 si è mantenuto costante con 51200 UA/ml, mentre ha evidenziato un calo della batteriocina SD3 con 1600 UA/ml e della SD4 con solo 400 UA/ml.

Sono stati riscontrati risultati simili anche in altre batteriocine, come ad esempio la AMA-K prodotta dal *L. plantarum* AMA-K, un ceppo isolato dall'Amasi, un latte fermentato dello Zimbabwe (Todorov, 2008). In questo caso la massima produzione di batteriocina AMA-K (25600 UA/mL) si è avuta dopo 29 h, e soltanto a temperature d'incubazione di 30°C oppure 37°C, mentre bassi livelli di attività (meno di 200 UA/mL) sono stati riscontrati dopo 8 h, sempre in MRS liquido. La batteriocina AMA-K è un metabolite primario. La crescita del *L. plantarum* AMA-K in diversi mezzi di crescita quali BHI, M17, latte di soia è stata molto simile a quella in MRS.

Le produzioni della batteriocina ST151BR (Todorov and Dicks, 2005_a), della plantaricina Y (Bogovic-Matijasic and Rogelj, 1998) e della batteriocina prodotta dal *P. acidilactici* (Nel et al., 2001) hanno fornito risultati simili.

La crescita dei ceppi di *E. faecium* SD1, SD2, SD3 ed SD4 in 37 g/l di BHI liquido (Oxoid) ed in 50 g/l oppure 100 g/l di latte scremato (Oxoid) è stata molto simile a quella riscontrata in MRS liquido (Oxoid) (fig. 26 A, 28 A, 30 A, 32 A). Lo sviluppo microbico in BHI liquido con valore iniziale di pH corretto a 6.5 ha prodotto un'attività di 25.600, 12.800, 200 e 200 UA/mL rispettivamente per le batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 (tabella 9). Dall'osservazione della tabella si evince che la batteriocina SD1 raggiunge, in BHI con pH corretto a 6.5, gli stessi livelli di attività riscontrati in brodo MRS sia a pH 6.0 che a pH 7.0 (25.600 UA/ml); la batteriocina SD2 prodotta nelle stesse condizioni, registra valori simili a quelli ottenuti su MRS liquido a pH 7.0 (12.800 UA/ml) ma del 50% inferiori a quelli ottenuti su MRS liquido a pH 6.0 (25.600 UA/ml). Per la batteriocina SD3 prodotta in BHI emerge un crollo nel livello di attività prodotta in BHI (pH 6.5) rispetto ai valori espressi in brodo MRS, registrando valori otto volte inferiori (200 UA/ml contro 1.600 UA/ml). Anche la batteriocina SD4, nel mezzo BHI raggiunge livelli di attività che sono inferiori rispetto a quanto ottenuto in MRS sia a pH 6.0 che a pH 7.0 (rispettivamente 200 UA/ml contro 800 UA/ml e 400 UA/ml).

Utilizzando il latte scremato (Oxoid) in ragione del 5% (p/v) sono stati riscontrati livelli più bassi nella produzione delle batteriocine per i ceppi SD1 (6.400 UA/ml) ed SD2

(3.200 UA/ml), mentre non vi è stata produzione rilevabile di batteriocine con i ceppi SD3 ed SD4. Quando il latte, come terreno liquido di crescita, è stato impiegato con concentrazione del 10%, sono stati ottenuti livelli di attività di 6.400 UA/ml e di 12.800 UA/ml per le batteriocine SD1 ed SD2, mentre ancora non si è avuta produzione di batteriocine per i ceppi SD3 ed SD4 (tabella 9).

Nel caso della batteriocina AMA-K, prodotta dal *L. plantarum* AMA-K, sono stati rilevati bassi livelli di produzione della batteriocina (800AU/mL) quando i ceppi sono stati inoculati in melassa ottenuta dalla lavorazione della canna da zucchero, utilizzata in concentrazione del 10% (p/v).

L'ottimo nella produzione della batteriocina SD1 è stata registrata in terreno MRS con valori iniziali di pH di 6.0 e di 7.0 (25.600 UA/ml), mentre per la batteriocina SD2 il livello di attività di 25.600 UA/ml lo si è avuto solo con il valore iniziale di pH di 6 in brodo MRS. Quando il pH iniziale dell'MRS è stato portato al valore di 7.0, il livello di attività della batteriocina SD2 è sceso a 12.800 UA/ml. Come per la batteriocina SD1, anche per la batteriocina SD3 la massima produzione è stata rilevata con i valori di pH di partenza sia 6.0 che 7.0, raggiungendo le 1.600 UA/ml come miglior risultato. Similmente alla batteriocina SD2, il ceppo SD4 ha prodotto un livello ottimale di batteriocina di 800 AU/ml, quando è stato lasciato crescere in brodo MRS con un valore di pH iniziale di 6.0.

La produzione ottimale della batteriocina AMA-K (12.800 UA/mL) è stata registrata in brodo MRS con valori di pH iniziali di 6.0 e 5.5 (Todorov, 2008), mentre bassi livelli di attività della batteriocina si sono avuti quando i ceppi sono stati inoculati in MRS liquido con valori di pH di partenza di 5.0 e 4.5, rispettivamente 3.200 UA/mL e 6.400 UA/mL (Todorov, 2008). Il pH della brodo coltura dopo una crescita di 24 h si aggirava tra 3.45 e 3.60, in accordo con altri risultati che sono stati riportati per altre batteriocine prodotte dal *L. plantarum* (Daeschel et al., 1990; Jimenez-Diaz et al., 1993; Todorov et al., 2000).

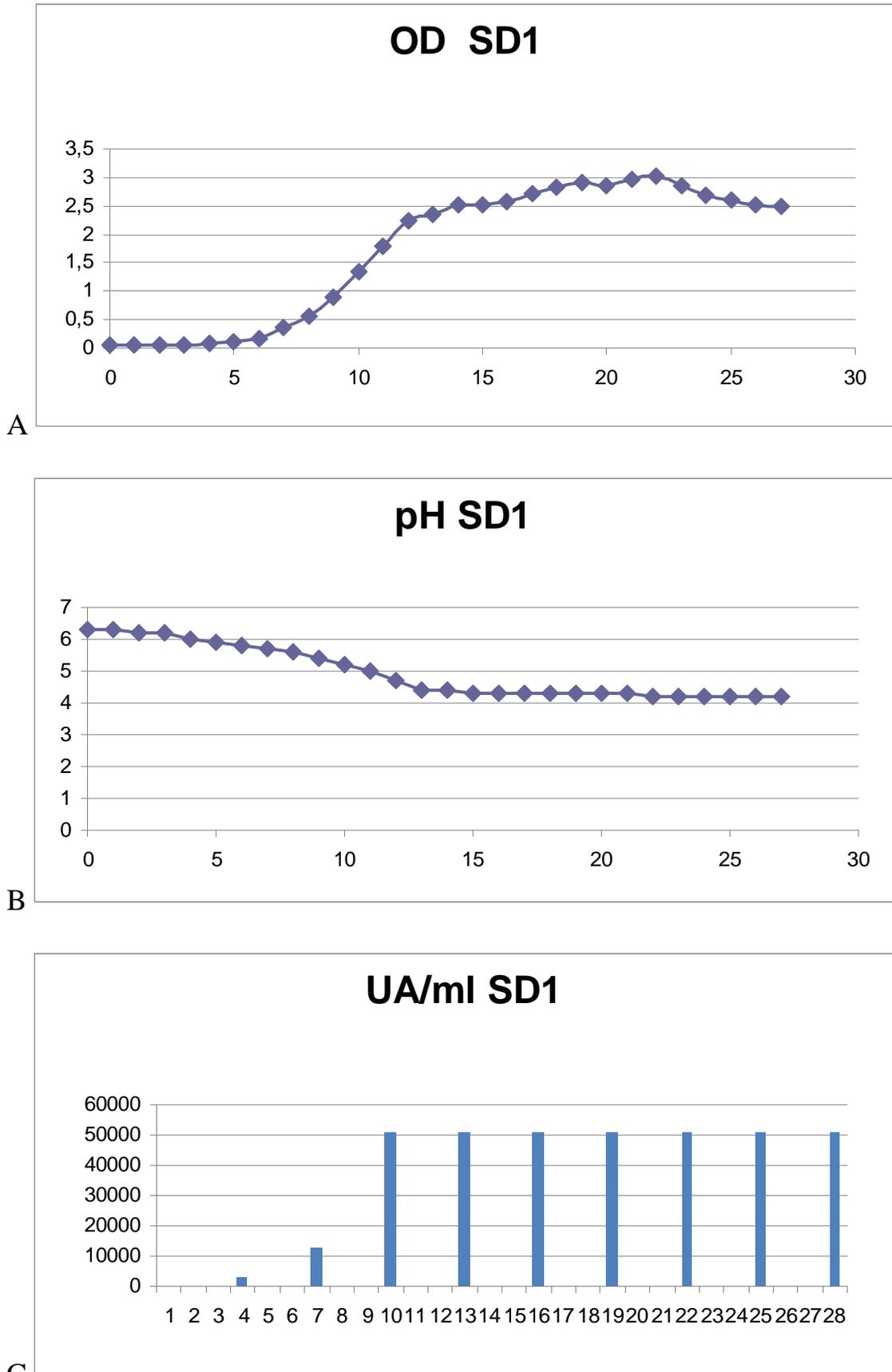


Fig. 26 - (A) curva di crescita (OD), **(B)** andamento del pH e **(C)** produzione della batteriocina SD1 da parte di *E. faecium* SD1.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

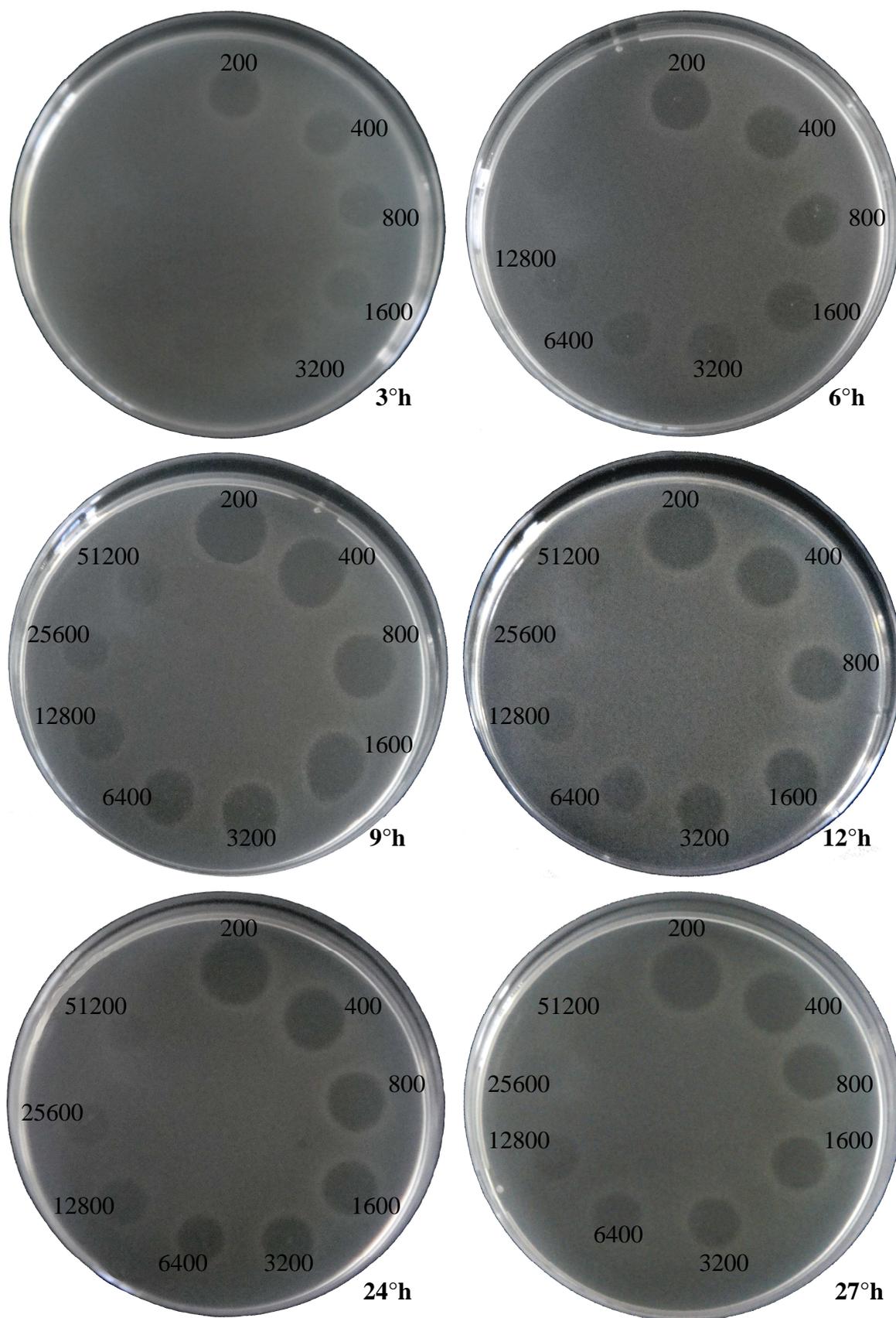


Fig. 27 – *E. faecium* SD1. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

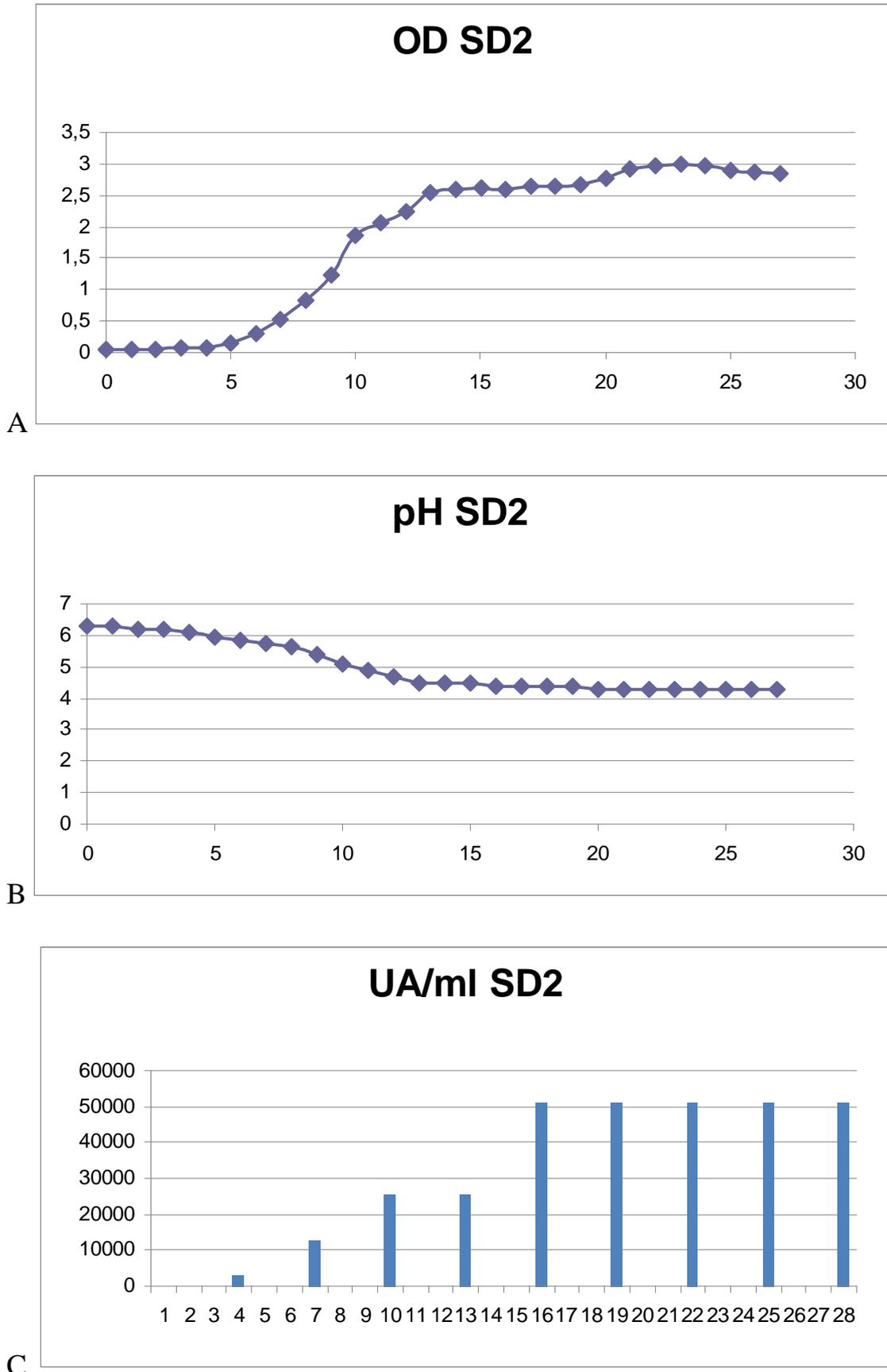


Fig. 28 - (A) curva di crescita (OD), **(B)** andamento del pH e **(C)** produzione della batteriocina SD2 da parte di *E. faecium* SD2.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

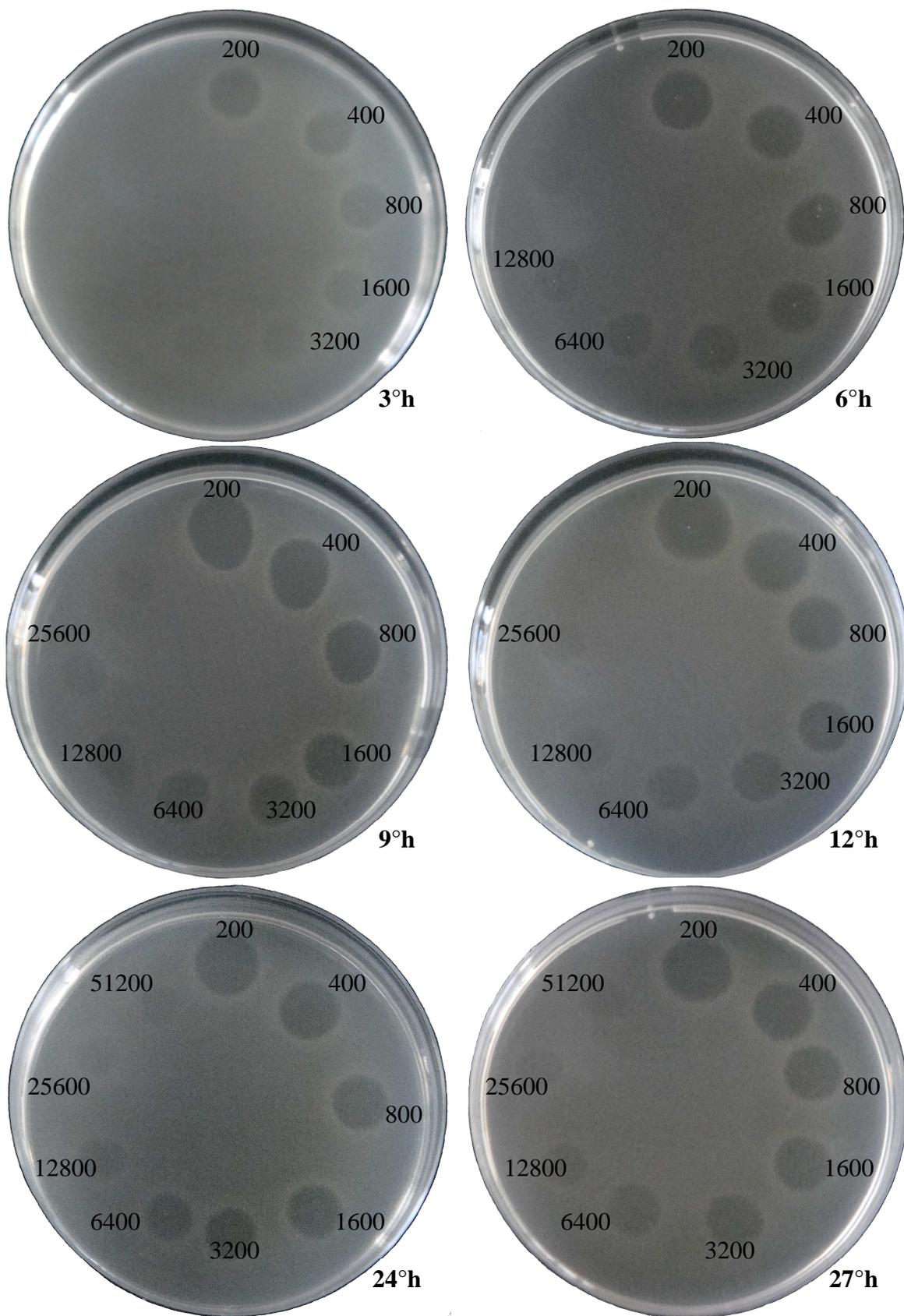


Fig. 29 – *E. faecium* SD2. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

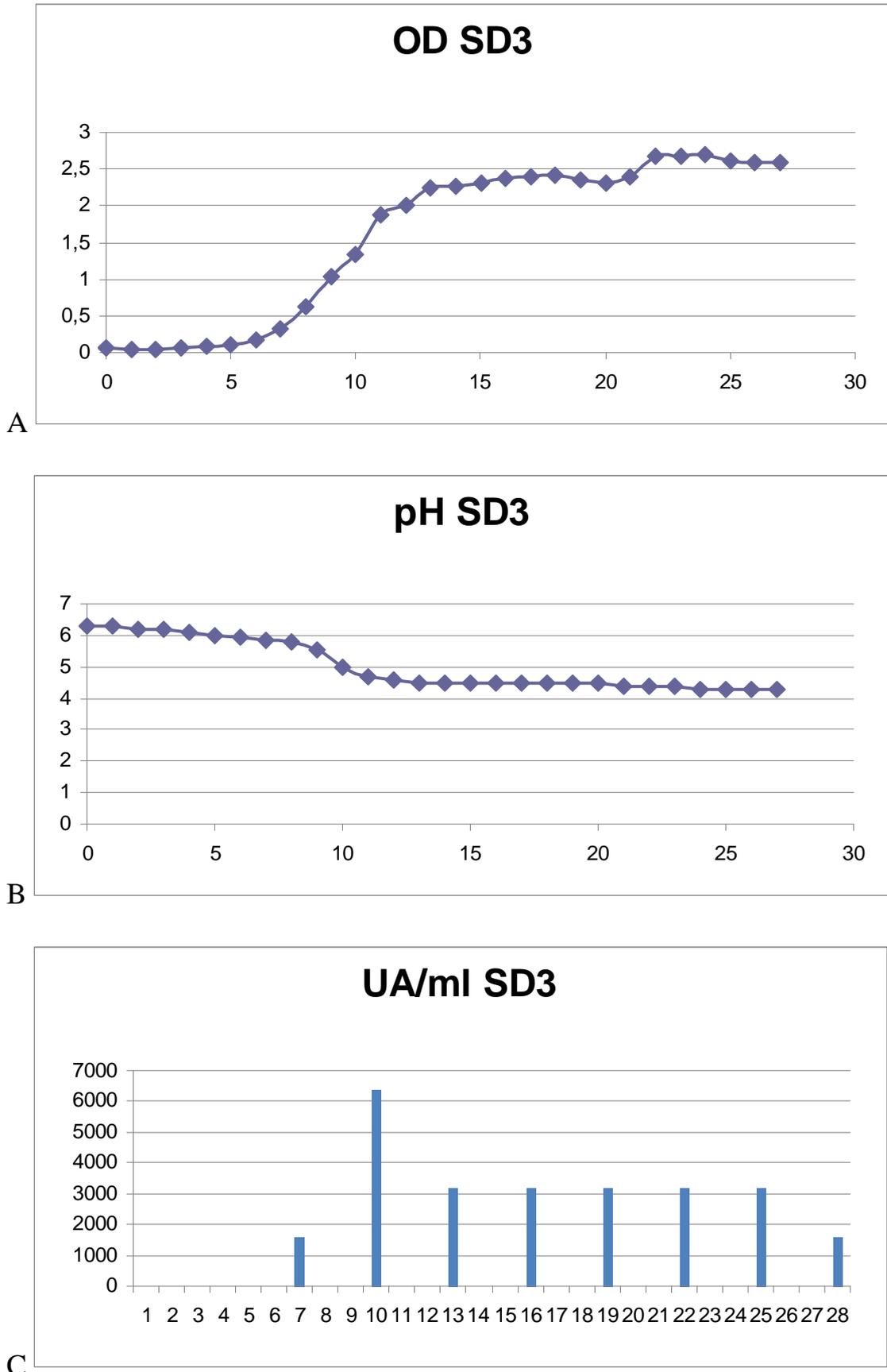


Fig. 30 - (A) curva di crescita (OD), **(B)** andamento del pH e **(C)** produzione della batteriocina SD3 da parte di *E. faecium* SD3.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

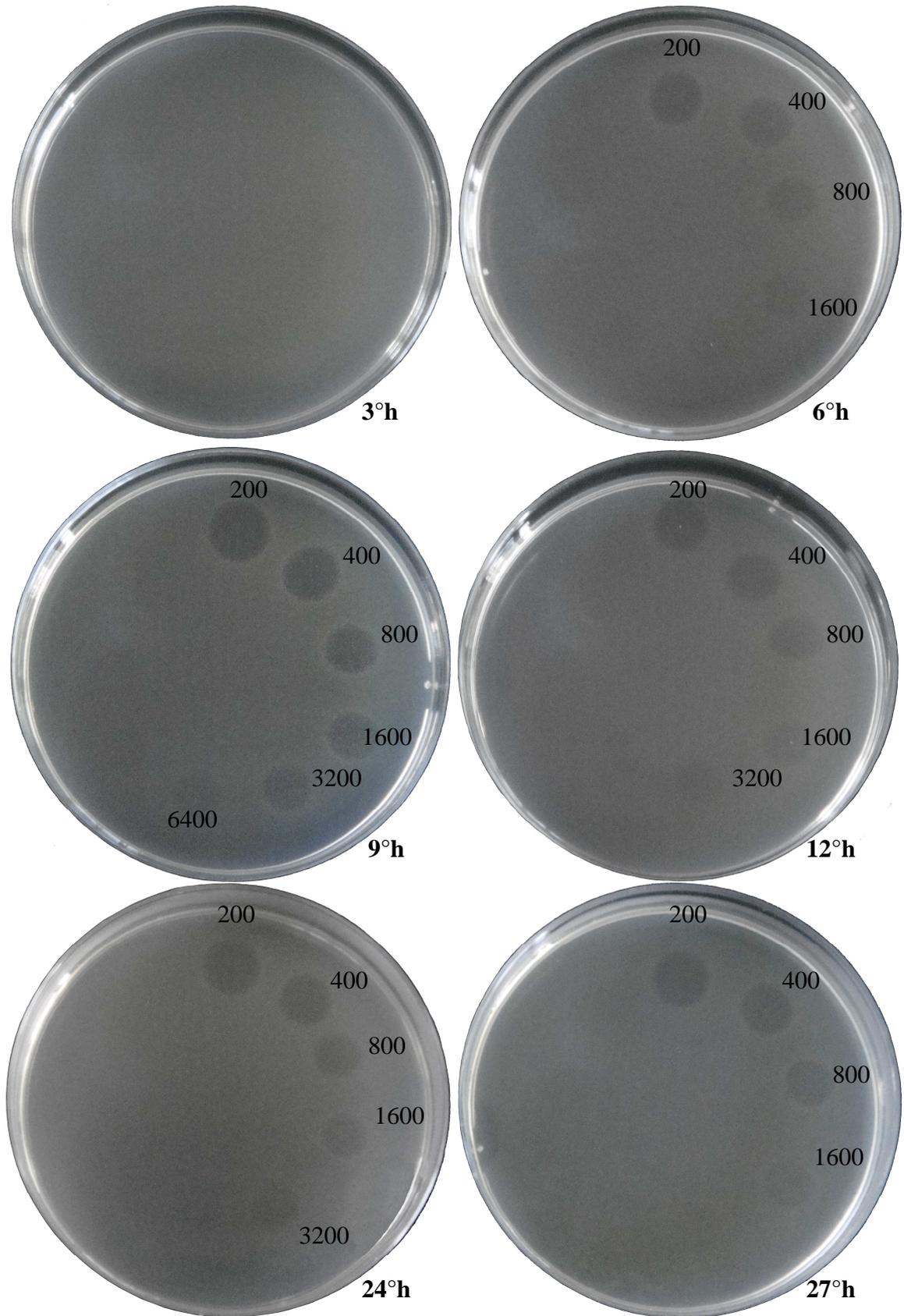


Fig. 31 – *E. faecium* SD3. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

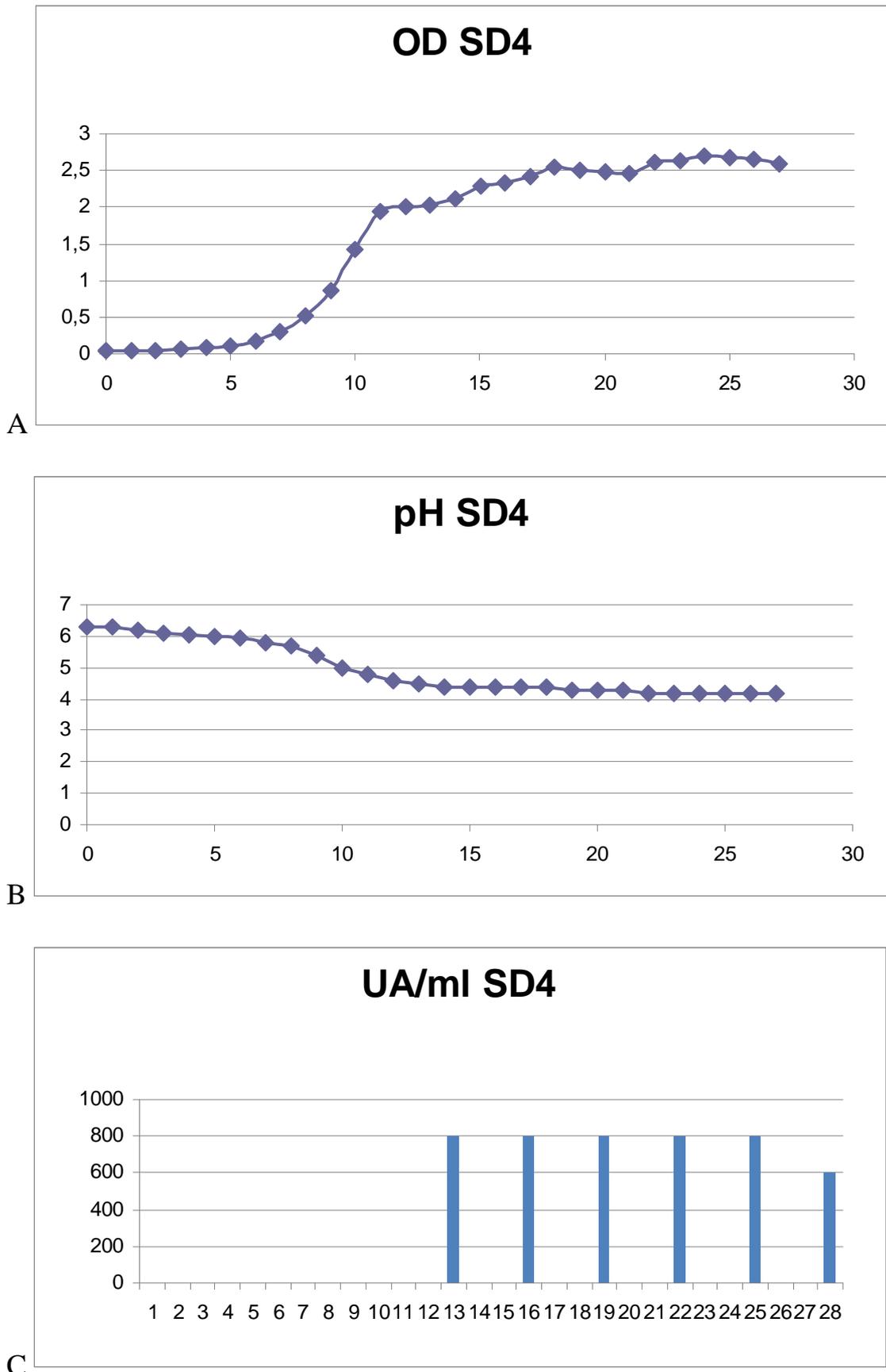


Fig. 32 - (A) curva di crescita (OD), **(B)** andamento del pH e **(C)** produzione della batteriocina SD4 da parte di *E. faecium* SD4.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

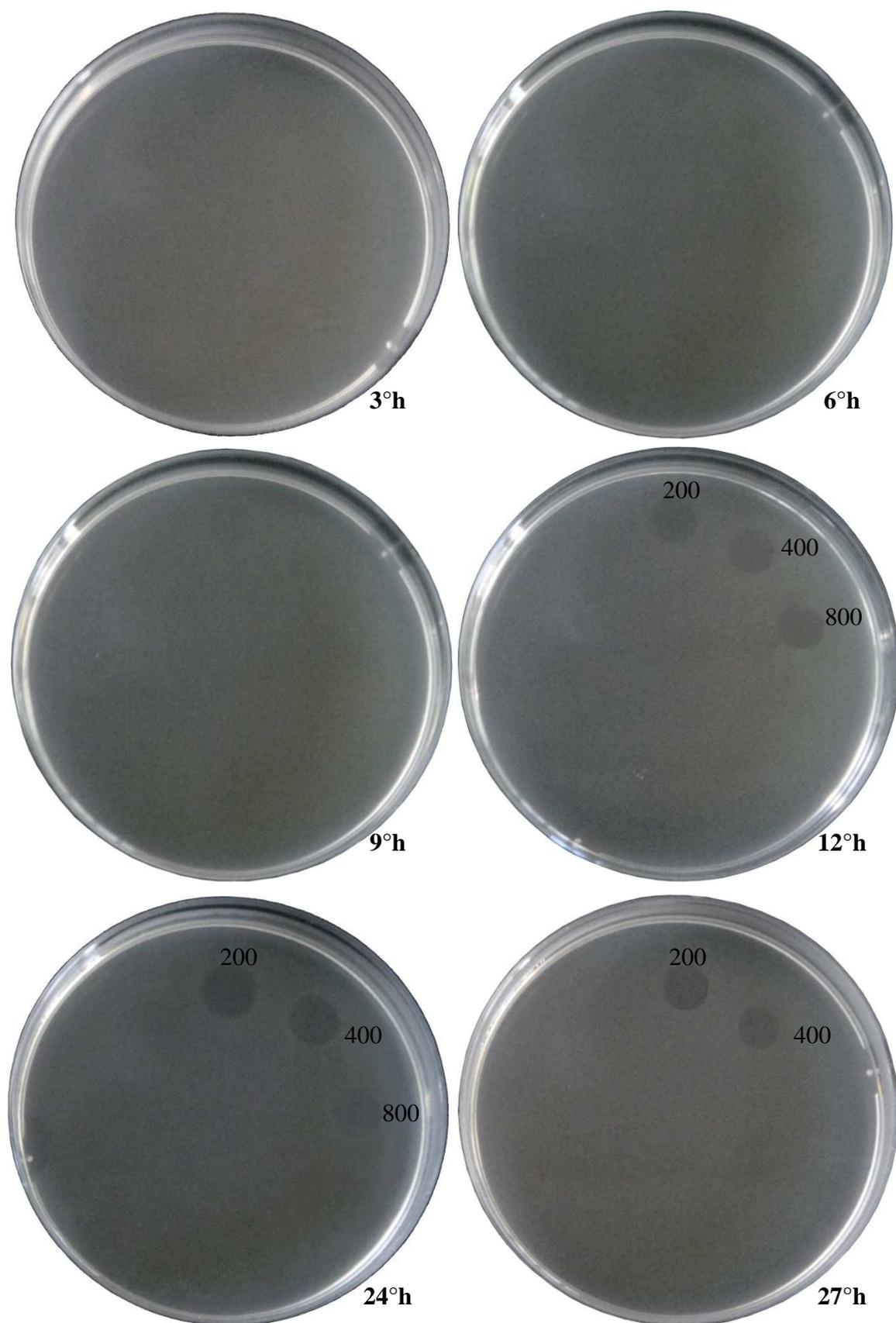


Fig. 33 – *E. faecium* SD4. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

L'effetto della composizione del mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine

E' stato detto fin qui detto che la produzione delle batteriocine è fortemente dipendente da diverse variabili quali il pH del mezzo, la temperatura d'incubazione, etc. e che i massimi livelli di attività non sono sempre correlati con la massa cellulare o con il tasso di crescita del microrganismo produttore (Kim et al., 1997; Bogovic-Matijasic and Rogelj, 1998). Maggiori livelli nella produzione delle batteriocine si ottengono spesso in condizioni differenti, di solito non ottimali, come ad esempio temperature più basse rispetto a quelle richieste per una crescita ottimale (Todorov and Dicks, 2004; Parente et al., 1994; Parente and Ricciardi, 1994; Mortvedt-Abildgaard et al., 1995; De Vuyst et al., 1996; Matsusaki et al., 1996; Krier et al., 1998; Aasen et al., 2000; Todorov et al., 2000).

Inoltre è stato visto che il livello della produzione delle batteriocine viene spesso aumentata, oltre che correggendo i valori di pH del mezzo, come descritto nel test precedente, dall'apporto al terreno di fattori influenzanti la crescita come carboidrati, azoto, vitamine e fosfato di potassio.

Come conseguenza delle risposte avute precedentemente, scaturite dall'impiego di diversi substrati di crescita, si può quindi affermare che per la produzione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 siano richiesti determinati nutrienti; questo aspetto è già stato osservato per altri peptidi, ad esempio le batteriocine ST194BZ, ST414BZ ed ST664BZ, prodotte da differenti ceppi di *L. plantarum* (Todorov and Dicks, 2005_b; Todorov and Dicks, 2006).

Fonti azotate. In un esperimento condotto utilizzando il ceppo SD1, l'aggiunta di triptone (20g/L), od una combinazione di estratto di carne ed estratto di lievito nel rapporto 1:1, o di una combinazione di triptone, estratto di carne ed estratto di lievito in rapporto 1:0,5:0,5 ad un terreno MRS base ha determinato un livello di produzione della batteriocina di 25.600 UA/mL (tabella 9), mentre la crescita in presenza di una combinazione di triptone ed estratto di carne (1:0,6) ha ridotto la produzione della batteriocina del 50%. Il livello di attività raggiunto in presenza del solo estratto di lievito (20g/L), del solo estratto di carne (20 g/l) o della combinazione di triptone ed estratto di lievito (1:0,6) risultava essere di 6.400 UA/mL (tabella 9).

Per la batteriocina prodotta dall' *E. faecium* SD2, il livello più alto di produzione della batteriocina (25.600 UA/ml), per quello che riguarda le sole fonti azotate come variabili, è stato ottenuto con la combinazione di triptone, estratto di carne ed estratto di

lievito in rapporto 1:0,5:0,5. Sono stati rilevati livelli di attività di 6.400 UA/ml quando sono stati aggiunti singolarmente triptone (20 g/l), estratto di carne (20 g/l) od una combinazione di triptone ed estratto di lievito (1:0,6) (tabella 9), mentre il livello si è ulteriormente ridotto del 50% (3.200 UA/ml) nel caso di utilizzo delle combinazioni triptone ed estratto di carne (1:0,6) e di estratto di carne con estratto di lievito (1:0,6). Il livello più basso di attività lo si è ottenuto con l'aggiunta del solo estratto di lievito (20 g/l) come unica fonte di azoto, risultando in soli 1.600 UA (tabella 9).

Per quanto riguarda la batteriocina SD3 l'aggiunta di triptone (20g/L) oppure della combinazione triptone, estratto di carne ed estratto di lievito (1:0,5:0,5), al terreno MRS base ha prodotto un livello di batteriocina di 1.600 UA/mL, che è anche il massimo livello raggiunto dal ceppo SD3 (tabella 9), mentre la crescita del ceppo in presenza di estratto di carne (20 g/l), di estratto di lievito (20 g/l) oppure della combinazione di estratto di carne ed estratto di lievito nel rapporto di 1:1, ha diminuito la produzione della batteriocina del 50% (400 UA/ml). I più bassi livelli nella produzione della batteriocina SD3 si sono avuti con le combinazioni di triptone ed estratto di lievito (1:0,6) e di triptone con estratto di carne (1:0,6) (tabella 9).

Risultati simili, come andamento, sono stati osservati per la produzione della batteriocina SD4, che è prodotta ai massimi livelli (800 UA/ml) dalla presenza di triptone (20g/L) oppure dalla combinazione nel rapporto di 1:0,5:0,5 di triptone con estratto di carne ed estratto di lievito (tabella 9), mentre quando si aggiungono singolarmente al terreno MRS base l'estratto di carne (20 g/l) oppure l'estratto di lievito (20 g/l) od ancora la combinazione degli estratti di carne e di lievito (1:1) il livello di attività della batteriocina si riduce del 50% (400 UA/ml). Come con la batteriocina SD3, anche per la batteriocina SD4 le riduzioni più forti si sono osservate quando il ceppo di *E. faecium* è stato fatto crescere in presenza di triptone ed estratto di lievito (1:0,6) oppure di triptone ed estratto di carne (1:0,6) (tabella 9).

Risultati simili sono stati riportati per la produzione della plantaricina 423 (Verellen et al., 1998), della batteriocina ST712BZ (Todorov and Dicks, 2007) e per le batteriocine ST151BR ed ST112BR (Todorov and Dicks, 2004_a; Todorov and Dicks, 2004_b). Il Triptone è la risorsa chiave di azoto indispensabile per una ottimale produzione della batteriocina AMA-K (Todorov, 2008). Diverso è il caso della plantaricina 423, nella quale le produzioni ottimali sono state ottenute integrando MRS base con nell'ordine, peptone batteriologico, casaminoacidi, triptone ed estratto di carne. Una spinta alla

produzione della batteriocina per mezzo dell'estratto di lievito e dell'estratto di carne, è stata riportata per la helveticina J (Joerger and Klaenhammer, 1986). Infine, per quanto fino ad oggi osservato, il triptone è la primaria fonte azotata per la produzione delle batteriocine da parte del *L. plantarum*.

Zuccheri. La crescita dell' *E. faecium* SD1 in presenza di glucosio in concentrazione di 20.0 e 30.0g/L ha portato ad una produzione di batteriocina SD1 di 25.600 UA/ml (tabella 9), mentre si è osservato un decremento del 50% (12.800 UA/ml) con concentrazioni di 5g/l e 10 g/l; inoltre livelli più alti di glucosio (50 g/l) hanno prodotto un più basso livello di attività di solo 1.600 UA/ml (tabella 9). E' stata testata, in MRS modificati, anche la sostituzione del glucosio con il lattosio ed i risultati ottenuti mostrano che la concentrazione ottimale di lattosio, per la sintesi della batteriocina SD1 è di 10 g/l (51.200 UA/ml), mentre con concentrazioni di 5 g/l oppure di 20 g/l si sono registrati livelli di attività ridotti del 50%, 25.600 Ua/ml (tabella 9). Aumentando la concentrazione del glucosio la relativa produzione della batteriocina si riduce ulteriormente. Sostituendo il glucosio con il mannosio alla concentrazione di (20.0g/L), è stata rilevata l'attività di 25.600 UA/ml, la stessa ottenuta con le stesse concentrazioni di glucosio (Tabella 9).

La crescita dell' *E. faecium* SD2 in presenza di glucosio in concentrazione di 20.0 g/l ha prodotto un valore di attività di 25.600 UA/ml di batteriocina SD2 (tabella 9), mentre quando sono stati utilizzati quantitativi di glucosio sia inferiori (5g/l e 10 g/l) che superiori (30 g/l e 50 g/l) ai 20.0 g/l sono stati registrati livelli inferiori di produzione della batteriocina, rispettivamente 3.200 UA/ml, 6.400 UA/ml, 6.400 UA/ml, 800 UA/ml (tabella 9). Quando il glucosio è stato sostituito con il lattosio sono stati rilevati alti livelli nella sintesi della batteriocina SD2 con 51.200 UA/ml utilizzando 5.0 g/l, 10 g/l, 20g/l e 30 g/l (tabella 9), con una riduzione del 50% (25.600 UA/ml) con concentrazioni di lattosio di 50 g/l. La crescita del ceppo SD2 in presenza di 20 g/l di mannosio produceva la stessa attività di 51.200 UA/ml del lattosio utilizzato alla stessa concentrazione di 20 g/l, mentre sostituendo il glucosio con il ramnosio (20 g/l) si sono raggiunti livelli di attività della batteriocina SD2 di 6.400 UA/ml (tabella 9).

Con l'utilizzo del glucosio, in ragione di 20 g/l, come fonte zuccherina per la crescita dell'*E. faecium* SD3 sono stati osservati livelli di attività di 1.600 UA/ml (tabella 9), mentre sono stati misurati decrementi in presenza di 5g/l, 10g/l, 30 g/l e 50 g/l di glucosio, rispettivamente 200 UA/ml, 200 UA/ml, 400 UA/ml e 200 UA/ml (tabella 9). La

crescita in MRS modificati dove il glucosio è stato sostituito dal lattosio ha mostrato quale concentrazione ottimale di lattosio per la produzione della batteriocina SD3 quella di 10g/l (3200 UA/ml), mentre con 20 g/l di lattosio si è avuta una riduzione del 50% , cioè 1.600 UA/ml. Utilizzando concentrazioni di lattosio di 5.0 g/l, 30g/l oppure di 50 g/l, sono stati livelli molto bassi nel livello di attività (tabella 2). La crescita in presenza di mannosio (20 g/l) ha fatto rilevare la stessa attività prodotta da 20 g/l di glucosio e da 20 g/l di lattosio (tabella 9).

La concentrazione di 20 g/l di glucosio ha determinato, per la batteriocina SD4, la produzione di 800 UA/ml come livello di attività (tabella 9), mentre un decremento (200 UA/ml) è stato registrato con concentrazioni di glucosio di 5g/l, 10g/l e 30 g/l ed invece, nessuna produzione di batteriocina si è avuta con la concentrazione di 50 g/l (tabella 9). La sostituzione del glucosio con il lattosio ha mostrato che i livelli di concentrazione ottimali per la massima produzione della batteriocina sono 5 g/l e 10g/l (400 AU/ml), con solo 200 UA/ml quando il quantitativo di lattosio è stato aumentato a 20.0 g/l, 30g/l e 50 g/l (tabella 9). L'impiego del mannosio (20 g/l) in luogo del glucosio (20 g/l) ha prodotto lo stesso livello di attività di 800 UA/ml (tabella 9).

In bibliografia si riporta che il *L. plantarum* AMA-K in presenza di glucosio (20 e 50 g/l) ha prodotto 12.800 UA/ml di batteriocina AMA-K (Todorov, 2008), registrando un aumento dell'attività (25.600 UA/ml) quando la concentrazione di glucosio è stata innalzata a 30g/l ed un abbassamento dell'attività con minori concentrazioni di zucchero di 5.0g/l e 10.0g/l, rispettivamente 3.200 UA/ml e 6.400 UA/ml (Todorov, 2008). La crescita in presenza di maltosio (20 g/l) o di saccarosio (20 g/l) ha mostrato gli stessi livelli produttivi dei 20.0g/L di glucosio, mentre gli zuccheri mannosio (20.0g/l) e fruttosio (20.0g/l) hanno ridotto l'attività del 75%, cioè a 3.200 UA/ml (Todorov, 2008). In presenza di 20 g/l di lattosio e di 20 g/l di gluconato la riduzione nella produzione della batteriocina AMA-K è stata perfino maggiore con 1.600 UA/ml. Questi risultanti sono abbastanza sorprendenti, poiché il ceppo è stato isolato da un latte fermentato, ma allo stesso tempo indicano che la produzione della batteriocina dipende da una combinazione di fattori. Sulla base di questi risultati, la produzione della batteriocina AMA-K viene stimolata quando le cellule sono lasciate crescere in un terreno addizionato di 30.0g/l di glucosio (Todorov, 2008).

K₂HPO₄ ed KH₂PO₄. La produzione della batteriocina SD1 è stata diversamente influenzata dalla presenza di differenti concentrazioni del dipotassio-idrogeno-fosfato (K₂HPO₄) o del potassio-diidrogeno-fosfato (KH₂PO₄). La produzione ottimale di batteriocina SD1 (25.600 UA/ml) si è ottenuta utilizzando concentrazioni di 2.0g/l e 10.0 g/l di K₂HPO₄; altre concentrazioni differenti che sono state testate hanno avuto un effetto negativo sulla sintesi della batteriocina SD1, ed in particolare l'attività è scesa del 50% a valori di 12.800 UA/ml con 5.0 g/l (tabella 9). La sostituzione del K₂HPO₄ con il KH₂PO₄ ha indotto una diminuzione sia nella crescita dell' *E. faecium* SD1 sia nella produzione della batteriocina (tabella 9), così come anche la combinazione del K₂HPO₄ con il KH₂PO₄ (2.0g/l e 2.0g/l) ha raggiunto un livello di attività abbastanza modesto di 3.200 UA/ml (tabella 9).

Risultati simili si sono registrati per la batteriocina SD2, poichè anche in questo caso la produzione è stata influenzata dalle diverse quantità impiegate di K₂HPO₄ o di KH₂PO₄. La massima produzione di batteriocina SD2 (25.600 UA/ml) è stata rilevata in presenza di 2.0g/l di K₂HPO₄, il quale se utilizzato a concentrazioni diverse, sia più alte che più basse, presenta un effetto negativo sul livello di batteriocina prodotto (tabella 9). Come osservato per la batteriocina SD1, la sostituzione del K₂HPO₄ con il KH₂PO₄ ha avuto come risultato la riduzione della crescita dell'*E. faecium* e la diminuzione della relativa produzione della batteriocina (tabella 9); una riduzione dell'attività della batteriocina SD2 (3.200 UA/ml) è stata determinata anche dalla combinazione, con concentrazioni di 2.0g/l e 2.0g/l, del K₂HPO₄ con il KH₂PO₄.

Quando l'*E. faecium* SD3 e l' *E. faecium* SD4 sono stati esaminati per la produzione delle rispettive batteriocine sono stati rilevati risultati molto simili. La produzione ottimale (1.600 UA/ml) per la batteriocina SD3 si ha in presenza di 2.0g/l di K₂HPO₄, mentre concentrazioni più alte di K₂HPO₄ hanno avuto un effetto negativo, così come anche la sostituzione del K₂HPO₄ con il KH₂PO₄ ha determinato una riduzione sia nello sviluppo del microrganismo sia nella sintesi della batteriocina (tabella 9). Con la combinazione del K₂HPO₄ e del KH₂PO₄ in concentrazioni di 2.0g/l e 2.0g/l si è avuta la perdita totale di attività della batteriocina SD3 (tabella 9).

La produzione della batteriocina SD4 è stata influenzata in modo simile alla batteriocina SD3; infatti, anche la produzione ottimale della batteriocina SD4 (200 UA/ml) è stata ottenuta in presenza di 2.0g/l di K₂HPO₄ (tabella 2), mentre sia l'uso di

concentrazioni diverse sia la sostituzione del K_2HPO_4 con il KH_2PO_4 hanno avuto effetti negativi sul livello della batteriocina SD4 (tabella 9). Anche in questo caso la combinazione del K_2HPO_4 con il KH_2PO_4 (2.0g/l e 2.0g/l) ha provocato una totale perdita dell'attività (tabella 9).

L'effetto del dipotassio-idrogeno-fosfato e del potassio-diidrogeno-fosfato sulla produzione delle batteriocine è ben riportato in letteratura. Nel caso della plantaricina UG1, l'uso del K_2HPO_4 in concentrazione di 7.0g/l ha determinato un incremento dell'attività (Enan et al., 1996), mentre nella produzione della batteriocina ST712BZ, prodotta dal *L. pentosus* ST712BZ, differenti concentrazioni di K_2HPO_4 e di KH_2PO_4 non ne hanno influenzato significativamente il livello (Todorov and Dicks, 2007). Nella produzione della batteriocina ST112BR, sono stati rilevati maggiori livelli di attività quando il mezzo conteneva 5.0g/l, 10.0g/l 20.0g/l di KH_2PO_4 (Leroy and De Vuyst, 2003). Per la ottimale produzione della plantaricina ST31 si sono rese necessarie concentrazioni di K_2HPO_4 comprese tra 2.0g/l e 5.0g/l (Todorov et al., 2000).

Glicerolo. La massima produzione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 (rispettivamente 25.600 UA/ml, 25.600 UA/ml, 1.600 UA/ml ed 800 UA/ml) è stata osservata in assenza di glicerolo (tabella 9). Crescenti concentrazioni di glicerolo da 5.0g/l fino a 20.0g/l hanno portato livelli decrescenti della produzione delle batteriocine, progressivi nel caso delle batteriocine SD3 ed SD4, altalenanti per le batteriocine SD1 ed SD2 (tabella 9). In letteratura sono riportati risultati simili per la produzione delle batteriocine ST151BR, ST112BR, ST712BZ e della plantaricina ST31 (Todorov and Dicks, 2004_a; Todorov et al., 2000; Todorov and Dicks, 2004_b; Todorov and Dicks, 2007). E' noto che un aumento del glicerolo conduce ad un abbassamento dell'attività dell'acqua; la produzione della batteriocina AMA-K può essere influenzata da stress osmotici o per mezzo del legame della batteriocina alle membrane cellulari o ad altre molecole, in ogni caso agevolati dalla presenza del glicerolo.

Tween 80. La massima produzione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 (rispettivamente 25.600 UA/ml, 25.600 UA/ml, 1.600 UA/ml ed 800 UA/ml) è stata registrata in presenza di 1.0 g/l di Tween 80, mentre maggiori concentrazioni di Tween 80 hanno un effetto negativo sulla produzione delle quattro batteriocine (tabella 9). Risultati differenti sono stati registrati nella produzione della batteriocina AMA-K, il cui ottimo è stato rilevato in presenza di 1.0g/l, 1.5g/l e 2.0g/l di Tween 80, il quale a concentrazioni

più basse esplica un effetto negativo sulla produzione della batteriocina AMA-K (Todorov, 2008).

Acetato di sodio. In presenza della concentrazione di 5.0 g/l di acetato di sodio, la produzione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 raggiunge i massimi livelli. Tutte le altre concentrazioni testate hanno mostrato di ridurre l'attività delle batteriocine (tabella 9).

Solfato di magnesio e solfato di manganese. In assenza di questi due sali, la produzione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 è stata inferiore, se confrontata con quella ottenuta quando questi due sali sono stati impiegati alle concentrazioni con cui entrano a far parte del terreno MRS (tabella 9). Anche la produzione della batteriocina AMA-K richiede la presenza del solfato di magnesio e del solfato di manganese come componente del mezzo di crescita (Todorov 2008), poiché l'esclusione di questi sali determina la riduzione della produzione della batteriocina AMA-K (Todorov 2008).

Citrato triammonico. Risultati simili sono stati ottenuti per effetto del citrato triammonico; normalmente, questo componente è presente nel terreno MRS nella dose di 2.0g/l, ed a questa concentrazione si è avuta una produzione ottimale delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4. Sia l'esclusione del citrato triammonico dal mezzo di crescita, che l'uso di concentrazioni crescenti a 4.0 g/l si sono risolti in una riduzione del livello di attività delle batteriocine (tabella 9). In letteratura sono riportati risultati simili per la produzione della batteriocina AMA-K (Todorov 2008).

Tabella 9. Influenza, a diverse concentrazioni, dei componenti del brodo MRS sulla produzione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4.

Componenti	Concentrazione (g/L)	Attività batteriocina (UA/ml)			
		SD1	SD2	SD3	SD4
Triptone	20.0	25 600	6 400	1 600	800
Estratto di carne	20.0	6 400	6 400	400	400
Estratto di lievito	20.0	6 400	1 600	400	400
Triptone + estr. di carne	12.5 + 7.5	12 800	3 200	200	200
Triptone + estr. di lievito	12.5 + 7.5	6 400	6 400	200	200
Estratto di carne + estratto di lievito	10.0 + 10.0	25 600	3 200	400	400
Triptone + estr. di carne + estratto di lievito	10.0 + 5.0 + 5.0	25 600	25 600	1 600	800
Glucosio	5.0	12 800	3 200	200	200
Glucosio	10.0	12 800	6 400	200	200
Glucosio	20.0	25 600	25 600	1 600	800
Glucosio	30.0	25 600	6 400	400	200
Glucosio	50.0	1 600	800	200	0
Lattosio	5.0	25 600	51 200	800	400
Lattosio	10.0	51 200	51 200	3 200	400
Lattosio	20.0	25 600	51 200	1 600	200
Lattosio	30.0	12 800	51 200	400	200
Lattosio	50.0	6 400	25 600	200	200
D-mannitolo	20.0	–	–	–	–
Mannosio	20.0	25 600	51 200	1 600	800
Ramnosio	20.0	–	6 400	–	0
Glicerolo	0	25 600	25 600	1 600	800
Glicerolo	2.0	6 400	6 400	400	400
Glicerolo	5.0	3 200	6 400	400	400
Glicerolo	8.0	3 200	12 800	400	400
Glicerolo	10.0	6 400	12 800	400	200
Glicerolo	20.0	6 400	6 400	200	200

MRS (Oxoid) (controllo)	55.0	25 600	25 600	1 600	800
MRS pH 3.0	55.0	–	–	–	–
MRS pH 4.0	55.0	–	–	–	–
MRS pH 5.0	55.0	800	800	0	0
MRS pH 6.0	55.0	25 600	25 600	1 600	800
MRS pH 7.0	55.0	25 600	12 800	1 600	400
BHI (Oxoid)	37.0	25 600	12 800	200	200
Milk (Oxoid)	50.0	6 400	3 200	0	0
Milk (Oxoid)	100.0	6 400	12 800	0	0
$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$	2.0 + 2.0	3 200	3 200	0	0
K_2HPO_4	0.0	–	–	200	200
K_2HPO_4	2.0	25 600	25 600	1 600	800
K_2HPO_4	5.0	12 800	1 600	400	200
K_2HPO_4	10.0	25 600	800	800	200
KH_2PO_4	0.0	–	–	200	200
KH_2PO_4	2.0	–	–	–	–
KH_2PO_4	5.0	–	–	200	–
KH_2PO_4	10.0	–	–	0	0
Solfato di magnesio	0	6 400	400	200	200
Solfato di magnesio	0.1	25 600	25 600	1 600	800
Solfato di manganese	0	3 200	6 400	200	400
Solfato di manganese	0.05	25 600	25 600	1 600	800
Triammonio citrato	0	12 800	6 400	400	400
Triammonio citrato	2.0	25 600	25 600	1 600	800
Triammonio citrato	4.0	1 600	12 800	0	0
Tween 80	1.0	25 600	25 600	1 600	800
Tween 80	2.0	3 200	6 400	200	200
Tween 80	5.0	3 200	6 400	200	200
Acetato di sodio	0.0	3 200	1 600	400	400
Acetato di sodio	5.0	25 600	25 600	1 600	800
Acetato di sodio	10.0	1 600	1 600	200	200

Crescita del microrganismo target in presenza delle batteriocine

Supernatanti con valori di 25.600 UA/ml della batteriocina SD1, 25.600 UA/ml della batteriocina SD2 e 1.600 UA/ml della batteriocina SD3, sono stati aggiunti a colture microbiche di *L. monocytogenes* 211, *L. monocytogenes* 220 e *L. monocytogenes* 637 ($OD_{600nm} = 0.1$) durante la terza ora d'incubazione e quindi all'inizio della fase esponenziale di crescita; il controllo era rappresentato dagli stessi ceppi di *Listeria monocytogenes* lasciati crescere nelle stesse condizioni (inoculo al 2% in brodo BHI a 37°C) ma senza la presenza delle batteriocine.

L'aggiunta dei surnatanti contenenti le batteriocine ha represso la crescita microbica per tutta la durata della fase esponenziale che, nel controllo ha registrato una durata di 6 h, avendo avuto inizio alla 3° h ed essendosi conclusa alla 9° h, momento nel quale si è registrato l'inizio della fase stazionaria. La repressione ha avuto un andamento molto simile per queste tre batteriocine (Fig. 34) prodotte dai ceppi di *E. faecium* SD1, SD2, SD3. Nella relativa conta in piastra dei campioni, dopo le 12 h e mostrandoti bassi valori di densità ottica, non sono state rilevate cellule vitali di *L. monocytogenes* 211 in presenza delle batteriocine SD1, SD2 ed SD3; questo suggerisce che l'azione delle tre relative batteriocine, nei confronti della *L. monocytogenes* 211 è battericida.

Nel caso della batteriocina prodotta dall'*E. faecium* SD4, invece, quando questa batteriocina è stata aggiunta alle stesse colture microbiche di *L. monocytogenes* 211, *L. monocytogenes* 220 e *L. monocytogenes* 637 ($OD_{600nm} = 0.1$) durante la terza ora d'incubazione e quindi all'inizio della fase esponenziale di crescita, è stata osservata una inibizione insufficiente ed alla dodicesima ora la riduzione della crescita dei microrganismi test è stata di circa il 50% se confrontata con il controllo non trattato. Questo suggerisce che l'azione della batteriocina SD4 non è battericida quanto piuttosto batteriostatica.

Le batteriocine SD1, SD2, SD3 possono perciò essere impiegate nel controllo della contaminazione alimentare da *Listeria*. Va sottolineato, infatti, che questi esperimenti sono stati eseguiti con un alto numero iniziale di cellule di *Listeria* (approssimativamente 10^8 CFU/mL). Poiché molto difficilmente negli alimenti si riscontrano valori nel numero di cellule così elevati, ma di solito, anche nei cibi contaminati e quindi alterati, il numero di cellule che ci si attende è più basso, questi risultati suggeriscono che l'azione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 sarà più che sufficiente.

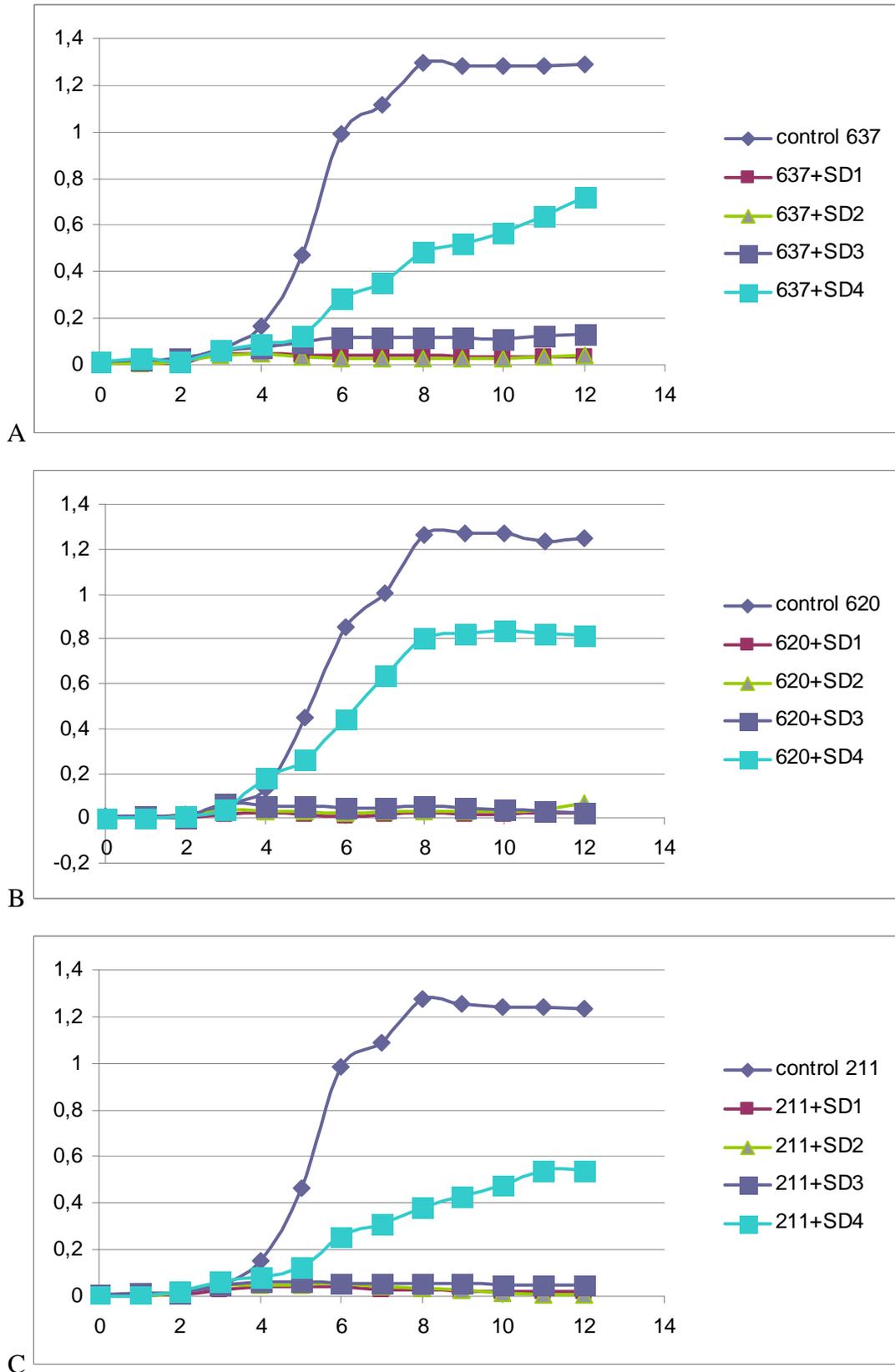


Figura 34. Curva di crescita di *L. monocytogenes* 637 (A), *L. monocytogenes* 620 (B) e *L. monocytogenes* 211 (C) in presenza delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4.

Riduzione delle cellule vitali del microrganismo target in presenza delle batteriocine

Non sono state riscontrate neppure cellule vitali quando, cellule in fase stazionaria di *L. monocytogenes* 211, sono state esposte all'azione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 a 37°C per 1 h.

Nel test eseguito utilizzando sempre la *L. monocytogenes* 211 come microrganismo sensibile, ma utilizzando la batteriocina dell'*E. faecium* SD4, è stata riscontrata una riduzione nel numero della conta vitale da 5.7×10^8 CFU/ml a 3.4×10^5 CFU/ml. Una simile riduzione è considerata insufficiente per l'utilizzo nella bioconservazione degli alimenti.

Trattamenti di cellule in fase stazionaria di *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC 19119, *L. innocua* 2030C ed *E. faecium* HKLHS ($10^8 - 10^9$ CFU/mL) con batteriocina ST44AM prodotta dal ceppo ST44AM di *Pediococcus pentosaceus* mostravano una completa inibizione della crescita (Todorov and Dicks, L.M.T. 2009), poiché dopo 1 h di contatto non è stata rilevata alcuna cellula vitale di *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC 19119, *L. innocua* 2030C ed *E. faecium* HKLHS. Per contro, non si è avuta nessuna variazione significativa nel controllo non trattato, nel numero di cellule vitali di *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC 19119, *L. innocua* 2030C od *E. faecium* HKLHS. Risultati simili sono stati ottenuti quando sono state trattate un minore numero di cellule, sempre degli stessi ceppi microbici *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC 19119, *L. innocua* 2030C ed *E. faecium* HKLHS (Todorov and Dicks, 2009). Risultato analogo è stato riportato per le batteriocine HA-6111-2 ed HA-5692-3 prodotte da *P. acidilactici* nei confronti del ceppo di *E. faecium* HKLHS (Albano et al. 2007).

Adsorbimento delle batteriocine sulle cellule target

La batteriocina SD1 è stata adsorbita per il 42.86% sulle cellule di *L. monocytogenes* 211, sulle cellule di *L. monocytogenes* 620 e sulle cellule di *E. faecium* ATCC 19443, mentre per il 57.14% sulle cellule *L. monocytogenes* 637 e solo per il 28.57% sulle cellule di *L. sakei* ATCC 15521 (tabella 10). Per la batteriocina SD2 è stato registrato un adsorbimento del 42.86% sulla *L. monocytogenes* 211, sulla *L. monocytogenes* 637 e sulle cellule di *E. faecium* ATCC 19443, mentre è risultato del 57.14% sulle cellule di *L. monocytogenes* 620 e sulle cellule di *L. sakei* ATCC 15521 (tabella 10). L'adsorbimento della batteriocina SD3 è stato del 71.43% sulle cellule di *L. monocytogenes* 620, mentre è risultato minore con valori del 57.14% sulle cellule di *L. monocytogenes* 211, sulle cellule di *L. monocytogenes* 637 e sulle cellule di *L. sakei* ATCC 15521, mentre ha registrato valori del 42.86% sulle cellule di *E. faecium* ATCC 19443 (tabella 10). Infine la batteriocina SD4 è stata adsorbita al 33% sulle cellule di *L. monocytogenes* 211, su quelle di *L. monocytogenes* 620, sulle cellule di *L. monocytogenes* 637 e sulle cellule di *L. sakei* ATCC 15521, mentre l'adsorbimento maggiore è stato osservato sulle cellule dell' *E. faecium* ATCC 19443 con un valore del 66.67% (tabella 10).

Sono diversi i casi citati in letteratura, come i diversi livelli di adsorbimento osservati per la batteriocina bacHV219, ma in generale i più alti livelli di adsorbimento sono stati registrati su ceppi sensibili rispetto a ceppi dimostratisi resistenti all'azione della batteriocina (Todorov et al., 2007). Sono stati riportati risultati simili per la pediocina N5p (Manca de Nadra et al, 1998) che è stata adsorbita al 100% dalle cellule sensibili di *O. oeni* X2L, per 80% dalle cellule di *Lactobacillus hilgardii* e da quelle di *O. oeni* L10, ed al 70% dalle cellule di *L. hilgardii* 6D (Manca de Nadra et al, 1998), mentre è stata adsorbita meno del 20% dai batteri rivelatisi resistenti alla pediocina N5p (Manca de Nadra et al, 1998). La buhnericina LB è stata adsorbita per il 100% dalle cellule sensibili di *L. plantarum*, *Pediococcus dextranicus*, *O. oeni* ed *E. faecalis*, ma ha anche registrato un adsorbimento del 100% da parte di un ceppo insensibile di *Pediococcus cerevisiae* (Yildirim et al., 2002). Nel caso della plantaricina 423, adsorbimento ha oscillato dal 17% per lo *Streptococcus caprinus* ATCC 700066 al 67% per il *L. plantarum* LMG 13556, il *L. curvatus* DF38, la *L. innocua* LMG 13568 ed il *L. sakei* DSM 20017, mentre i ceppi microbici sensibili alla plantaricina 423 l'hanno adsorbita in modo maggiore (Todorov and Dicks, 2006).

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

L'influenza del pH sull'adsorbimento delle batteriocine

L'adsorbimento ottimale della batteriocina SD1 (57.14%) sulle cellule della *L. monocytogenes* 211 è stato registrato a pH 8.0 ed a pH 10.0, mentre a valori di pH inferiori (6.0 e 4.0) si è avuta una riduzione dell'adsorbimento (tabella 10). Il massimo adsorbimento della batteriocina SD2 (57.14%) sulle cellule della *L. monocytogenes* 211 è stato ottenuto a pH 10.0, mentre una diminuzione nell'adsorbimento della batteriocina SD2 è stato riscontrato a valori di pH 8.0, 6.0 e 4.0 (tabella 10). Il più alto adsorbimento della batteriocina SD3 (71.43%) da parte delle cellule di *L. monocytogenes* 211 è stato rilevato a pH 4.0, per contro valori di pH maggiori hanno provocato riduzione nell'adsorbimento sulla stessa *Listeria monocytogenes* 211 (tabella 10). L'ottimale adsorbimento della batteriocina SD4 (66.67%) sulle cellule della *L. monocytogenes* 211 è stato registrato a pH 4.0; quando il pH è stato corretto a valori più alti (6.0, 8.0 e 10.0) si è avuta una riduzione nell'adsorbimento da parte del microrganismo bersaglio (tabella 10). Questi risultati mostrano il potenziale applicativo di queste batteriocine ai diversi intervalli di pH; le batteriocine SD1 ed SD2 potrebbero trovare applicazione in prodotti a valori di pH neutri o superiori, mentre le batteriocine SD3 ed SD4 potrebbero essere utilizzati in prodotti con pH bassi. Le differenze nell'adsorbimento dovute ai diversi valori di pH potrebbero essere dovute a specifiche interazioni che s'instaurano tra le batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 ed il ceppo bersaglio. Nel caso della buchnericina LB, il migliore adsorbimento sulle cellule di *L. plantarum* è stata registrata a pH 5.0 – 8.0 (Yildirim et al., 2002); il migliore adsorbimento della plantaricina 423 sull'*E. faecium* HKLHS si è avuto con valori di pH compresi tra 8.0 e 10.0 mentre il migliore adsorbimento della stessa batteriocina sul *L. sakei* DSM20017 ha oscillato da pH 2.0 a pH 6.0 (Todorov and Dicks, 2006).

L'influenza della temperatura sull'adsorbimento delle batteriocine

La temperatura ha dimostrato d'influenzare l'adsorbimento delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 sulle cellule di *L. monocytogenes* 211. Alle temperature di 25°C e 37°C sono stati osservati livelli di adsorbimento del 57.14% per la batteriocina SD1 sulla *Listeria monocytogenes* 211 come microrganismo test, mentre vi è stata una riduzione dell'adsorbimento al 42.86% alle temperature di 4°C e 30°C (tabella 10). Il più alto livello di adsorbimento ottenuto (42.86%) dalla batteriocina SD2 sulle cellule della *Listeria monocytogenes* 211 è stato rilevato alle temperature di 30°C e 37°C; quando sono state testate temperature più basse, 4°C e 25°C, si sono ottenuti livelli di adsorbimento inferiori,

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

del 28.57% (tabella 10). La batteriocina SD3, alla temperatura di 4°C mostra livelli di adsorbimento del 100% quando testata sulla *Listeira monocytogenes* 211, mentre con valori di temperatura crescenti a 25°C, 30°C e 37°C si hanno cali progressivi rispettivamente a valori del 71.43%, 57.14% e 42.86% nell'adsorbimento della batteriocina stessa (tabella 10). L'adsorbimento ottimale della batteriocina SD4 sulle cellule della *Listeira monocytogenes* 211 è stato osservato alle temperature di 4°C, 25°C e 37°C, dove sono stati raggiunti livelli del 66.67% (tabella 10). L'adsorbimento è, quindi, stato influenzato dalla temperatura e risultati simili sono stati osservati per altre batteriocine.

In bibliografia è riportato che un aumento della temperatura, con valori compresi da 25°C fino a 60°C, ha avuto un effetto negativo sull'adsorbimento della batteriocina bacHV219 sulle cellule di *E. faecium* HKLHS, risultando essere del 40% per l'intervallo di temperatura indicato, ed un adsorbimento ottimale con valori dell'80% a temperature di 4°C. È stato rilevato, inoltre, un totale adsorbimento (100%) per la stessa batteriocina nei confronti dell' *E. faecalis* E88, quando sono state impiegate temperature di esposizione di 4°C, 10°C, 45°C e 60°C, mentre un decremento di adsorbimento del 20% è stato rilevato alla temperatura di 37°C (Todorov et al., 2007). Diversi sono i casi della batteriocina buchnericina LB, che ha registrato livelli di adsorbimento identici sulle cellule di *L. plantarum* dopo un esposizione a diverse temperature di 0, 10, 25, 50 ed 80°C (Yildirim et al., 2002) e della plantaricina 423, dove variazioni della temperatura non ha prodotto effetti nell'adsorbimento sulle cellule dell'*E. faecium* HKLHS (Todorov and Dicks, 2006).

L'effetto dei sali inorganici e dei composti organici sull'adsorbimento delle batteriocine

Per questa prova di adsorbimento delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4, sono stati utilizzati NaCl, Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄, SDS, Tween 20, Tween 80. L'adsorbimento della batteriocina SD1 sulle cellule della *L. monocytogenes* 211 è risultato essere del 57.14% in presenza del Tween 80, del Tween 20, di Na₂HPO₄ ed NaH₂PO₄, con un decremento (42.86%) con cloruro di sodio, mentre nessun adsorbimento è stato registrato con SDS (tabella 10). Per quanto riguarda la batteriocina SD2 sono stati osservati livelli di adsorbimento del 57.14% in presenza del Tween 80 e del Na₂HPO₄, livelli del 42.86% con Tween 20 e con NaH₂PO₄ mentre i più bassi livelli di adsorbimento (14.29%) sono stati ottenuti utilizzando SDS ed NaCl (tabella 10). Per quanto riguarda la batteriocina SD3 il più alto livello di adsorbimento (85.71%) sulle cellule della *L. monocytogenes* 211 è stato

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

raggiunto con l'impiego del sodiodiidrogenofosfato (NaH_2PO_4), livelli intermedi del 71.43% sono stati rilevati in presenza del Tween 80, di SDS e del disodioidrogenofosfato (Na_2HPO_4), mentre i più bassi livelli di adsorbimento (57.14%) si sono osservati con NaCl e Tween 20 (tabella 10). Rispetto alle altre tre batteriocine, la SD4 ha ottenuto risultati diversi di adsorbimento sempre sulle cellule di *L. monocytogenes* 211, toccando il 100% in presenza di SDS, seguito dal 66.67% con Tween 80 e Tween 20 ed il 33.33% da NaCl, Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 (tabella 10).

La letteratura riporta diversi lavori sull'adsorbimento delle batteriocine da parte dei microrganismi bersaglio; un incremento nell'adsorbimento della batteriocina bachV219 prodotta *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 sul ceppo di *E. faecium* HKLHS è stato rilevato in presenza di Triton X-100, β -mercapto-etanolo, cloroformio, NaCl, KH_2PO_4 e MgCl_2 (Todorov et al., in press, 42); l'adsorbimento della stessa bachV219 ma su *E. faecalis* E88 ha registrato livelli più alti quando impiegata in associazione con sodio acetato, Na_2CO_3 , Triton X-100, etanolo 80%, metanolo, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgCl_2 , KCl, Tris e NH_4 -citrato (Todorov et al., 2007). Triton X-100, Triton X-114 cloroformio hanno incrementato l'adsorbimento della plantaricina 423 su *E. faecium* HKLHS (Todorov and Dicks, 2006). Il ceppo di *L. sakei* DSM 20017 trattato con NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgCl_2 , KCl, KI, Tris, NH_4 -citrato, Na_2CO_3 , SDS, β -mercapto-etanolo, etanolo 80% e metanolo ha portato ad una riduzione nell'adsorbimento della plantaricina 423 (Todorov and Dicks, 2006). Nessuna variazione nell'adsorbimento è stata osservata in presenza di sodio acetate o di EDTA, mentre un incremento è stato dato da Triton X-100, Triton X-114 e cloroformio (Todorov and Dicks, 2006). L'adsorbimento della buchnericina LB su cellule di *L. plantarum* è diminuito in presenza di NaCl, NH_4Cl , MgCl_2 , KCl, KI e Tris, mentre il trattamento delle cellule con NH_4 -citrato, sodio acetato, NaCO_3 , EDTA, SDS, triton-X, 2-mercapto-etanolo, etanolo 80% e metanolo 80% non ha avuto effetto sull'adsorbimento della buchnericina LB su *L. plantarum* (Yildirim et al., 2002). L'adsorbimento della pediocina N5p su *P. pentosaceus* E5p è aumentato in presenza di MgCl_2 , MgSO_4 , MnCl_2 , MnSO_4 , mentre NaCl, KCl, KI, NH_4Cl , CaCl_2 , Na_3PO_4 , Na_2SO_4 , EDTA ed etanolo non lo hanno influenzato (Nieto-Lozano et al., 2002). Per contro i sali organici ed il sodio acetato hanno ridotto l'adsorbimento della pediocina N5p sulle cellule bersaglio. Infine, l'adsorbimento della stessa batteriocina viene incrementato del 25% in presenza di SDS (Manca de Nadra et al, 1998).

Tabella 10. Effetto della temperatura, pH, tensioattivi e sali sull'adsorbimento delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 sui microrganismi sensibili

	Adsorbimento (%) delle batteriocine prodotte da <i>E. faecium</i>			
	SD1	SD2	SD3	SD4
<i>L. monocytogenes</i> 211, 4b	42.86	42.86	57.14	33.33
<i>L. monocytogenes</i> 620, 4b	42.86	57.14	71.43	33.33
<i>L. monocytogenes</i> 637, 1/2c	57.14	42.86	57.14	33.33
<i>E. faecium</i> ATCC 19443	42.86	42.86	42.86	66.67
<i>L. sakei</i> ATCC 15521	28.57	57.14	57.14	33.33

Adsorbimento (%) delle batteriocine da <i>Enterococcus faecium</i> su <i>L. monocytogenes</i> 211, 4b				
Temperatura (°C)				
4	42.86	28.57	100	66.67
25	57.14	28.57	71.43	66.67
30	42.86	42.86	57.14	33.33
37	57.14	42.86	42.86	66.67

pH				
4.0	42.86	28.57	71.43	66.67
6.0	42.86	42.86	57.14	33.33
8.0	57.14	42.86	57.14	33.33
10.0	57.14	57.14	42.86	0

Tensioattivi e sali (1%)				
Tween 80	57.14	57.14	71.43	66.67
Tween 20	57.14	42.86	57.14	66.67
SDS	0	14.29	71.43	100
NaCl	42.86	14.29	57.14	33.33
Na ₂ HPO ₄	57.14	57.14	71.43	33.33
NaH ₂ PO ₄	57.14	42.86	85.71	33.33

Determinazione della dimensione in Tricine SDS-PAGE

L'agar spot test, realizzato utilizzando 10 µl dei retentati per ciascuno dei tagli molecolari di 30, 10 e 3 kDa, nonché l'eluato del 3kDa, ottenuti trattando consecuzionalmente lo stesso campione, così come precedentemente descritto nei materiali e metodi, ha fornito dei primi risultati indicativi sulla dimensione di queste sostanze ad attività antimicrobica. Nel caso delle batteriocine SD1 ed SD2 si sono ottenuti 2 aloni d'inibizione, uno con la frazione con cut-off da 30 kDa e l'altro con taglio da 10 kDa. Con le batteriocine SD3 ed SD4 invece, è stato ottenuto un solo alone d'inibizione, relativo alla frazione con cut-off a 30 kDa, mentre non è stata riscontrata alcuna attività negli altri tre tagli molecolari (figura 35).

Da questo primo risultato parziale, quindi, le batteriocine oggetto di studio sembrerebbe possano avere dimensioni molecolari uguali o superiori ai 10 kDa. Invece, secondo quanto evidenziato con il gel in tricine-SDS-PAGE (figure 36, 37), in ambiente denaturante, le batteriocine sono risultate essere dei piccoli peptidi con una massa molecolare compresa tra i 5 ed i 10 kDa, così come la quasi totalità delle batteriocine prodotte dal genere *Enterococcus*.

Questa differenza la si spiega con la capacità da parte delle batteriocine, di solito sotto forma di oligomeri, di creare aggregati o co-aggregati (dimeri, tetrametri) che, quindi vengono trattenuti dai tagli di peso molecolare superiori, mentre nell'SDS-PAGE questi vengono scomposti nelle singole frazioni monometriche attive, essendo il test fortemente denaturante per le strutture terziarie e quaternarie delle proteine, conservando comunque la capacità inibitoria.

Ad oggi, su un totale di 25 enterocine conosciute, ben 24 hanno dimensioni inferiori ai 10 kDa, con la sola esclusione della Enterolisina A che possiede una massa molecolare di 34.500 daltons.

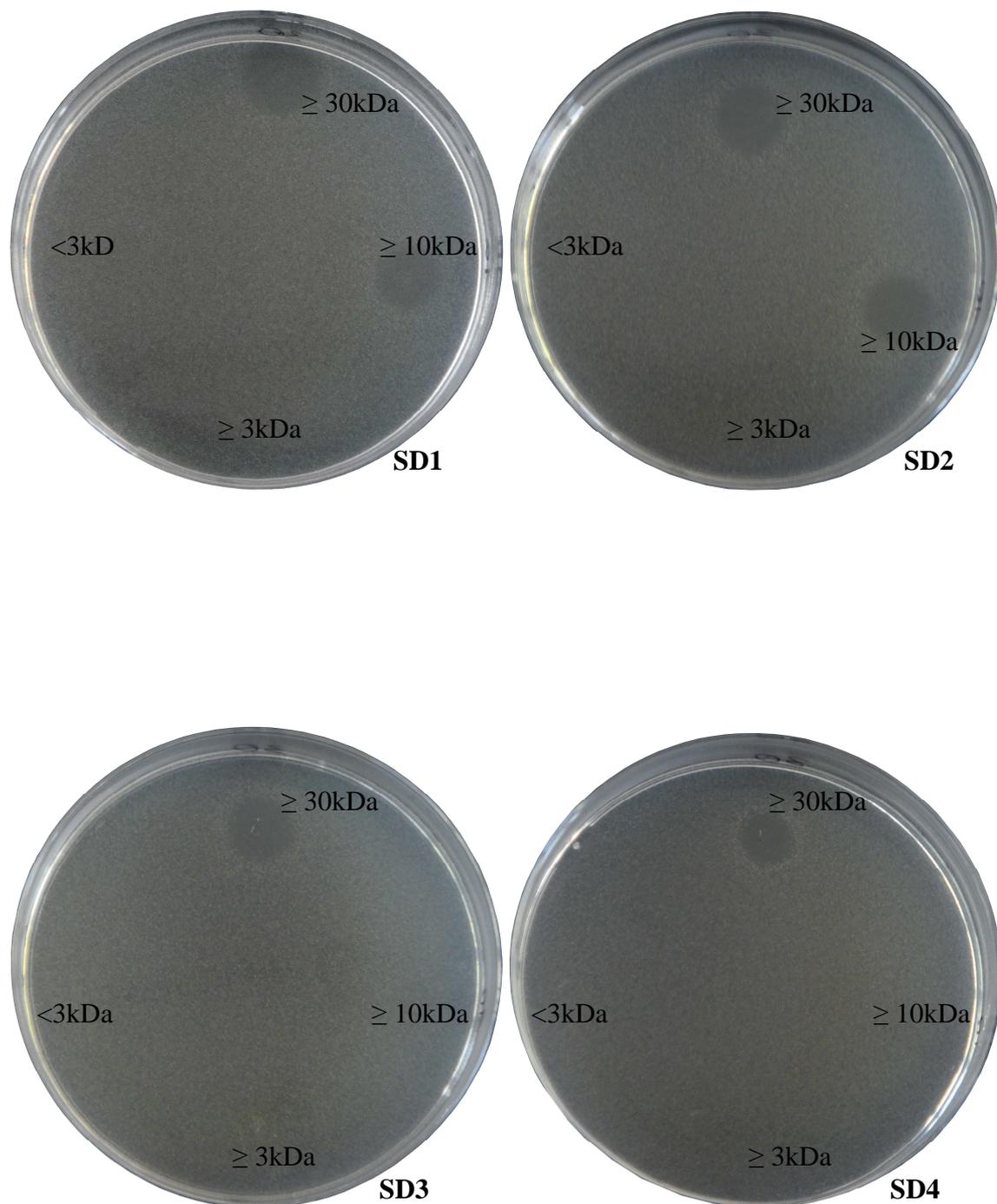


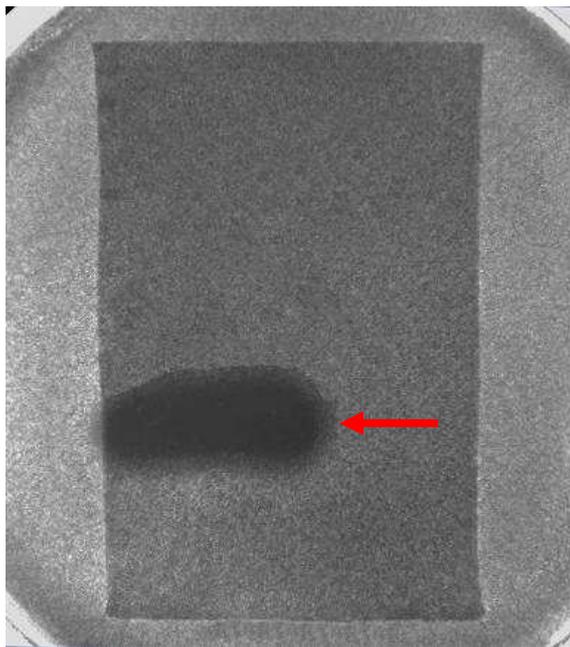
Fig. 35 - Aloni di inibizione da surnatanti a diversi tagli molecolari, ottenuti con concentratori da 30, 10 e 3 kDa.

Autore: Stefano Schirru

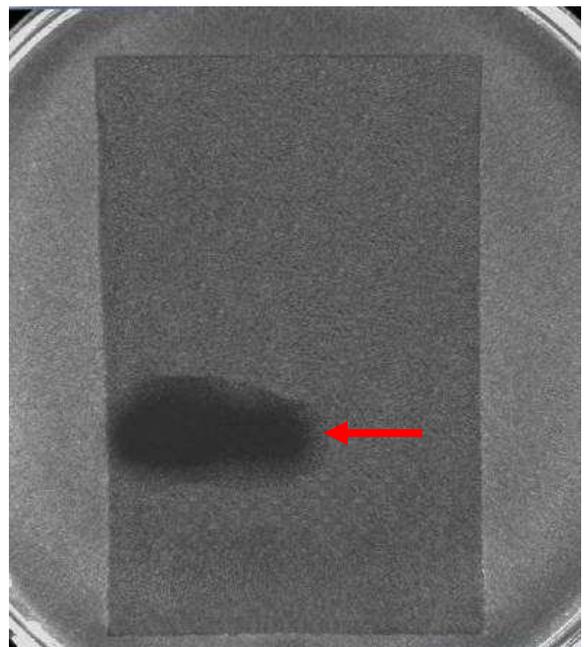
Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

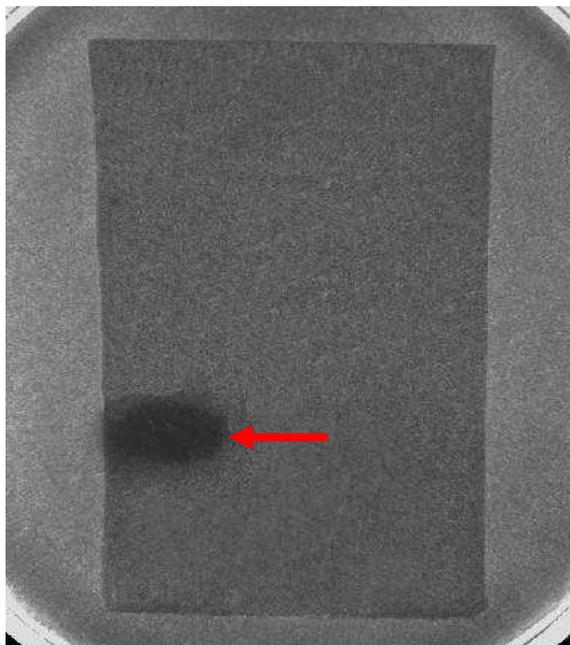
Università degli Studi di Sassari



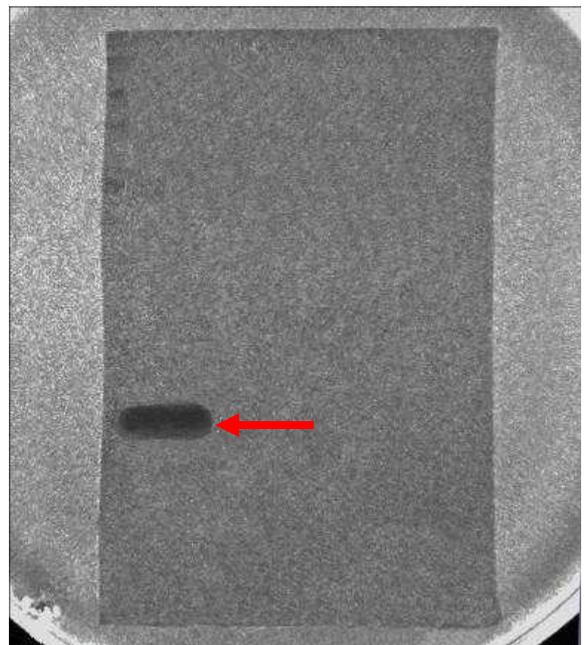
CEPPO SD1



CEPPO SD2



CEPPO SD3



CEPPO SD4

Fig. 36 - Tricine-SDS-PAGE delle batteriocine. La metà del gel ricoperto con cellule di *L. monocytogenes* mostra la zona d'inibizione nella crescita del microrganismo. Le zone d'inibizione indicano la posizione delle bande del peptide attivo.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari

Università degli Studi di Sassari

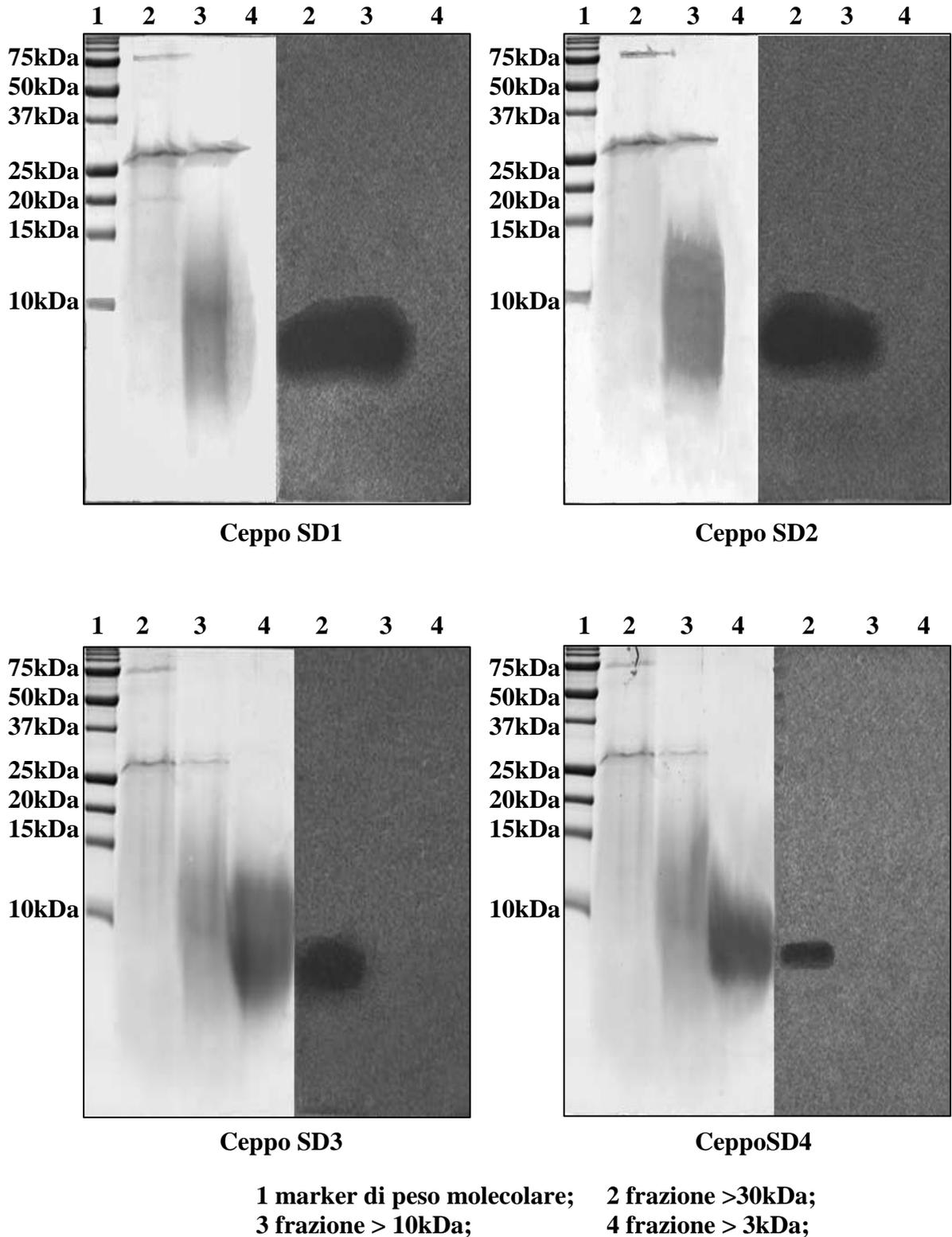


Fig.37 - Determinazione della dimensione delle batteriocine, mediante affiancamento delle metà dei gel ottenuti in tricine-SDS-PAGE. Sulla sinistra di ciascun immagine la metà del gel colorato con Coomassie, sulla destra quella impiegata per il test di attività biologica.

CONCLUSION

Conclusioni

Gli enterococchi sono ampiamente diffusi in natura, ben rappresentati nei prodotti alimentari fermentati e nei prodotti lattiero caseari; in particolare nei formaggi tradizionali del bacino del mediterraneo, contribuiscono alla formazione di sapori ed aromi tipici. Inoltre, sembra che rivestano una certa importanza anche in altri prodotti fermentati quali gli insaccati, le olive ed i vegetali. Tali microrganismi sono produttori di batteriocine attive sia nei confronti di batteri degradativi-putrefattivi sia di microrganismi patogeni, in particolare la *Listeria*. Questa capacità potrebbe essere uno strumento molto utile nella produzione e nella conservazione di diversi prodotti, come ad esempio i formaggi da latte crudo, i formaggi tradizionali dall'aroma molto spiccato o gli insaccati fermentati a bassa acidità. Inoltre, gli enterococchi sono stati e vengono usati come probiotici.

Gli enterococchi solitamente risultano essere ben rappresentati in molti prodotti di origine animale e questo trova diverse plausibili spiegazioni, tra le quali il fatto che la produzione delle batteriocine li agevola nella colonizzazione dei cibi, prendendo così il sopravvento sugli altri gruppi microbici presenti, effetto valido particolarmente per le carni fermentate e per i prodotti lattiero caseari. La forte presenza degli enterococchi, che spesso costituiscono la popolazione microbica predominante di diversi prodotti fermentati di origine animale, non può comunque, essere spiegata solo con la produzione delle batteriocine, ma anche attraverso la loro grande resistenza verso i diversi parametri che influenzano la vita dei microrganismi quali il calore, i bassi valori di attività dell'acqua e le alte concentrazioni di sale. La produzione di batteriocine, in combinazione con l'ampio spettro di resistenza nei confronti di diversi agenti fisici e chimici, potrebbe spiegare il perché questi batteri sono così naturalmente vigorosi e perché occupano una così grande varietà di nicchie ecologiche.

Le stesse batteriocine prodotte dai ceppi di *E. faecium* isolati da latte di capra prodotto in Sardegna, che sono state l'argomento di questo studio, hanno dimostrato di avere interessanti potenzialità; infatti nei vari test a cui sono state sottoposte, hanno dimostrato:

- Di possedere capacità antagonistica nei confronti della *L. monocytogenes*; l'inibizione mostrata nei confronti di questo microrganismo suggerisce che, dette batteriocine possano essere ascritte nella classe IIA (batteriocine ad azione anti *Listeria*) dello

schema di classificazione generale. Da sottolineare l'azione d'inibizione mostrata dalle batteriocine SD1, SD2 ed SD3 nei confronti di diversi ceppi di *Salmonella* poichè, l'attività contro batteri gram negativi è un fenomeno abbastanza inusuale ed è stato rilevato solo per poche batteriocine, come l'enterocina AS-48 ed MR99 rispettivamente prodotte dai ceppi di *E. faecalis* S-48 ed MR99, e l'enterocina 012 prodotta dall'*Enterococcus gallinarum*. Anche una batteriocina prodotta da un ceppo di *Lactobacillus plantarum* isolato da molassa, ha mostrato di possedere attività contro *A. baumannii*, così come è stata riportata attività antimicrobica nei confronti di specie batteriche gram negative per la batteriocina ST4SA prodotta da *E. mundtii* ST4SA.

- Di essere termoresistenti, arrivando a conservare, nel caso delle batteriocine SD1 ed SD2, l'attività antimicrobica anche dopo essere state sottoposte al trattamento di sterilizzazione classica (121°C X 15').
- Di possedere grande resistenza verso variazioni sensibili del pH, mostrando di mantenere praticamente inalterata la capacità antimicrobica in un range di pH da 2 a 11.
- La capacità di conservare tale attività inibitoria anche quando sono state sottoposte all'azione di diversi agenti tensioattivi e sali inorganici.
- Produrre diversi valori di Unità Arbitraria nell'arco delle 24 h, con picchi di 51200 UA/ml per i ceppi SD1 ed SD2, 3200 per l'SD3 e 800 per l'SD4.
- La loro natura proteica quando trattate con diversi enzimi proteolitici, nonché la perdita della loro capacità antimicrobica per azione di enzimi glicolitici (α -amilasi), che dimostra la presenza, nella frazione attiva, di una componente glicosidica.
- Di reprimere la crescita microbica per tutta la durata della fase esponenziale, quando sono state aggiunte a colture microbiche dei microrganismi sensibili durante la terza ora d'incubazione e quindi all'inizio della fase esponenziale di crescita.
- Di avere azione battericida nei confronti della *L. monocytogenes*. Infatti, nella conta in piastra del microrganismo target successiva all'aggiunta delle batteriocine sia in fase di crescita esponenziale che in fase stazionaria, non sono state rilevate cellule vitali di *L. monocytogenes* 211.
- Essere adsorbite sulla parete delle cellule bersaglio a diversi valori di pH, con le batteriocine SD1 ed SD2 che hanno mostrato un adsorbimento ottimale a pH superiori a 6, mentre le batteriocine SD3 ed SD4 sono state adsorbite preferenzialmente a valori di 6 od inferiori. Questi risultati mostrano il potenziale applicativo di queste batteriocine ai diversi intervalli di pH; le batteriocine SD1 ed SD2 potrebbero infatti trovare

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

applicazione in prodotti a valori di pH neutri o superiori, mentre le batteriocine SD3 ed SD4 potrebbero essere utilizzati in prodotti con pH bassi.

- Di avere una dimensione molecolare inferiore ai 10 kDa, come la quasi totalità delle batteriocine da enterococchi. Ad oggi, su un totale di 25 enterocine conosciute, ben 24 hanno dimensioni inferiori ai 10 kDa, con la sola esclusione della Enterolisina A che possiede una massa molecolare di 34.500 daltons.

Le enterocine sono generalmente attive contro la *L. monocytogenes* e possono anche essere attive nei confronti del *C. tyrobutyricum*, un microrganismo responsabile del gonfiore tardivo dei formaggi a lunga stagionatura. L'uso degli enterococchi produttori di batteriocine come colture starter nella produzione dei formaggi potrebbe prevenire lo sviluppo dei clostridi ed inibire la crescita della *L. monocytogenes*, così come dimostrato da studi recenti. Infine gli enterococchi produttori di batteriocine o le stesse batteriocine purificate sono state impiegate, in prove sperimentali, come bioconservanti nella produzione di diversi alimenti.

Le batteriocine possono svolgere un importante ruolo nell'ecologia batterica e questo probabilmente spiega la grande capacità di produrre batteriocine da parte degli enterococchi. Nella maggior parte dei casi, sembra che la produzione delle batteriocine sia regolata e che avvenga in condizioni di crescita ideali, anche se per contro, c'è chi sostiene che la produzione massima delle batteriocine non si abbia nelle migliori condizioni di sviluppo del microrganismo produttore. Perciò la scelta di adatte condizioni di crescita come la composizione del mezzo, il tempo e la temperatura d'incubazione, l'attività dell'acqua, etc., sono assolutamente determinanti nella fase di monitoraggio di ceppi potenziali produttori di batteriocine.

E' noto che alcune batteriocine vengono prodotte in mezzo solido e non in brodo colturale, altre sono fortemente influenzate dalla temperatura; ad esempio l'*E. faecium* L50 produce almeno tre batteriocine che vengono prodotte a temperature differenti, come differenti sono temperature ideali a cui vengono prodotte. Queste batteriocine sono L50A, L50B, enterocina P ed enterocina Q. Ciò che rende unici gli enterococchi è il grande numero di differenti batteriocine prodotte dai membri di questo gruppo batterico.

Poichè queste batteriocine sono generalmente attive nei confronti di batteri patogeni di origine alimentare, suscita grande interesse il tentativo di farne un uso biotecnologico ai fini della conservazione degli alimenti, sia attraverso l'uso del ceppo produttore sia utilizzando direttamente la batteriocina purificata.

Per contro alcuni enterococchi sono portatori di potenziali fattori di virulenza e possono risultare patogeni; inoltre, nell'ultima decade è andato aumentando il numero degli enterococchi resistenti alla vancomicina, anche se fortunatamente, tutte queste importanti caratteristiche sono specie-specifiche. Per queste motivazioni, nella selezione di ceppi di enterococchi interessanti per l'industria alimentare, l'assenza di qualsiasi patogenicità o di geni di resistenza agli antibiotici sono requisiti fondamentali.

Un ostacolo all'uso degli enterococchi come colture starter è che essi non sono considerati GRAS (generally recognized as safe), ed inoltre sono stati associati con infezioni nosocomiali.

Perciò sono necessari studi per garantire che il ceppo in esame sia "sicuro" in termini di virulenza potenziale, specialmente perché ceppi isolati dai cibi hanno mostrato di possedere determinanti per la virulenza. E' imperativo, quindi, che qualsiasi ceppo di enterococco batteriocina-produttore, prima del suo eventuale utilizzo come coltura starter o come microrganismo probiotico sia testato per potenziali fattori di virulenza e per la resistenza agli antibiotici.

Tutto quanto detto è naturalmente valido anche per i ceppi di *E. faecium* e le batteriocine da essi prodotte che, sono stati studiati in questo lavoro di tesi. Essi, come suddetto, presentano le diverse caratteristiche positive comuni al gruppo degli enterococchi, ma necessitano di essere testati per quel che riguarda l'aspetto "sicurezza" prima di un loro eventuale utilizzo nell'industria alimentare.

CONTENTS

8

FIGURE

Lista tabelle

Tab.1 - Aspetti caratteristici delle batteriocine ed altri antibiotici convenzionali	4
Tab.2 - Esempi di batteriocine prodotte da batteri lattici	16
Tab.3 - Confronto di sistemi classificazione per le batteriocine dei batteri lattici	30
Tab.4 - Enterocine prodotte da enterococchi (Foulquié Moreno et al., 2006)	31
Tab.5 - Enterocine descritte in letteratura come simili ad altre già note	32
Tab.6 - Confronto dei sistemi di classificazione generali delle batteriocine e la recente proposta di classificazione delle batteriocine da enterococchi di Franz et al., (2007)	33
Tab.7 - Nuova classificazione, sequenza aminoacidica e peso molecolare delle enterocine mature (Franz et al., (2007)	34
Tab.8 - Spettro di attività antibatterica delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4	83
Tab.9 - Influenza, a diverse concentrazioni, dei componenti del brodo MRS sulla produzione delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4	120,121
Tab.10 - Effetto della temperatura, pH, tensioattivi e sali sull'adsorbimento delle batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4 sui microrganismi sensibili	129

Lista Figure

- Fig.1 -** Un diagramma schematico della biosintesi dei lantibiotici:
(1) Formazione della prebatteriocina; (2) La prebatteriocina è modificata da Lan B e LanC, traslocata attraverso un ABC-trasportatore dedicato LanT e processata da LanP, risultando una batteriocina matura; (3) La proteina Istidina chinasi (HPK) reagisce alla presenza della batteriocina attivando un processo di fosforillazione; (4) Il gruppo fosfato (P) è trasferito a un regolatore (RR); (5) RR attiva la trascrizione del gene regolatore; e (6) produce immunità alla cellula mediante proteine che legandosi alla batteriocina ne impediscono l'attività antibatterica, LanI_____ **11**
- Fig.2 -** Un diagramma schematico della biosintesi delle batteriocine della classe II:
(1) Formazione della prebatteriocina e del prepeptide del Fattore d'induzione (IF); (2) La prebatteriocina e il pre-IF sono processate e traslocate dal ABC-trasportatore risultando una batteriocina matura e IF; (3) La proteina Istidina chinasi (HPK) reagisce alla presenza del IF attivando un processo di fosforillazione; (4) Il gruppo fosfato (P) è trasferito a un regolatore (RR); (5) RR attiva la trascrizione del gene regolatore; e (6) produce immunità alla cellula mediante proteine che legandosi alla batteriocina ne impediscono l'attività antibatterica._____ **13**
- Fig.3 -** Le colicine sono codificate in un operone. Generalmente, questo operone comprende tre geni intimamente connessi: 1) un gene che codifica la colicina, che funziona da killer verso le cellule avversarie; 2) un gene immunitario che codifica la sintesi della proteina che è in grado di conferire alla cellula produttrice una immunità specifica nei confronti dell'azione della colicina; 3) un gene di lisi, che codifica la sintesi di una proteina in grado di provocare la produzione di cellule che lisano. Essa esercita la funzione di liberare la colicina nell'ambiente in cui è inserita la popolazione microbica. Questi geni si trovano in un operone, e sono codificati dal processo di replicazione del plasmide nella cellula di *E. coli*._____ **14**
- Fig.4 -** Modello dell'inserzione della Nisina nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare_____ **20**
- Fig.5 -** Analisi dei clusters delle batteriocine da enterococchi in base all'omologia delle sequenze. Gli aminoacidi consenso, sono indicati in blocchi_____ **36**
- Fig.6 -** Foto al SEM dei microrganismi testati: **A)** *L. monocytogenes* DSMZ 20.600; **B)** *E. coli*. DSMZ 30083_____ **77**

Fig.7 -	Foto al SEM dei microrganismi testati: A) <i>S. aureus</i> DSMZ 20231. B) <i>Salmonella choleraesuis</i> DSMZ 13772. _____	78
Fig.8 -	Foto al SEM dei ceppi di <i>Enterococcus faecium</i> produttori di batteriocine _____	79
Fig.9 -	Foto al SEM dei ceppi di <i>Enterococcus faecium</i> produttori di batteriocine _____	80
Fig.10 -	Spot test su MRS con evidenti gli aloni di inibizione dei ceppi produttori nei confronti di <i>L. monocytogenes</i> DSMZ20600 _____	81
Fig.11 -	Spot test su MRS Agar. Piastra sx con Pronase incluso nel mezzo di crescita; piastra dx preparata senza Pronase. Ceppo SD1 ex 100, ceppo SD2 ex 102 _____	82
Fig.12 -	Spot test su MRS Agar. Piastra sx con Pronase incluso nel mezzo di crescita; piastra dx preparata senza Pronase. Ceppo SD3 ex 155, ceppo SD4 ex 159 _____	82
Fig.13 -	Saggio dell'attività e calcolo dell'unità arbitraria alla 24°ora per ciascun ceppo produttore _____	86
Fig.14 -	Saggio di conservazione dell'attività inibente della batteriocina SD1 dopotattamento ad alte temperature. I tempi di esposizione, dove non specificato, si riferiscono alla temperatura di 100°C _____	88
Fig.15 -	Saggio di conservazione dell'attività inibente della batteriocina SD2 dopo trattamento ad alte temperature. I tempi di esposizione, dove non specificato, si riferiscono alla temperatura di 100°C. _____	88
Fig.16 -	Saggio di conservazione dell'attività inibente della batteriocina SD3 dopo trattamento ad alte temperature. I tempi di esposizione, dove non specificato, si riferiscono alla temperatura di 100°C _____	89
Fig.17 -	Saggio di conservazione dell'attività inibente della batteriocina SD4 dopo trattamento ad alte temperature. Si riportano i relativi tempi di esposizione alla temperatura di 90°C per la piastra a sinistra, ed a 100°C per la piastra alla destra _____	89
Fig.18 -	Test di sensibilità delle diverse batteriocine a vari enzimi (1mg /ml, 37°C x 2h) _____	91
Fig.19 -	Effetto del pH sull'attività della batteriocina SD1 _____	93
Fig.20 -	Effetto del pH sull'attività della batteriocina SD2 _____	94
Fig.21 -	Effetto del pH sull'attività della batteriocina SD3 _____	95

Fig.22 -	Effetto del pH sull'attività della batteriocina SD4_____	96
Fig.23 -	Effetto dei tensioattivi sulle diverse batterio cine_____	98
Fig.24 -	L'effetto positivo del Tween 80 sulla produzione delle batteriocine, confronto tra MRS ed MRS modificato (senza tween 80)._____	99
Fig.25 -	Produzione espressa in UA/ml delle batteriocine SD1 (A), SD2 (B), SD3 (C) ed SD4 (D) a 12, 24, 36 h ed a diversi valori di temperatura di 21, 30 e 37°C._____	101
Fig.26 -	(A) curva di crescita (OD), (B) andamento del pH e (C) curva di produzione della batteriocina SD1 da parte di <i>E. faecium</i> SD1_____	105
Fig.27 -	(D) Ceppo SD1. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml_____	106
Fig.28 -	(A) curva di crescita (OD), (B) andamento del pH e (C) curva di produzione della batteriocina SD2 da parte di <i>E. faecium</i> SD2_____	107
Fig.29 -	(D) Ceppo SD2. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml_____	108
Fig.30 -	(A) curva di crescita (OD), (B) andamento del pH e (C) curva di produzione della batteriocina SD3 da parte di <i>E. faecium</i> SD3_____	109
Fig.31 -	(D) Ceppo SD3. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml _____	110
Fig.32 -	(A) curva di crescita (OD), (B) andamento del pH e (C) curva di produzione della batteriocina SD4 da parte di <i>E. faecium</i> SD4_____	111
Fig.33 -	(D) Ceppo SD4. Produzione della batteriocina espressa in UA/ml_____	112
Fig.34 -	Curva di crescita di <i>L. monocytogenes</i> 637 (A), <i>L. monocytogenes</i> 620 (B) e <i>L. monocytogenes</i> 211 (C) in presenza di batteriocine SD1, SD2, SD3 ed SD4_____	123
Fig.35 -	Aloni di inibizione da surnatanti a diversi tagli molecolari_____	131
Fig.36 -	Tricine-SDS-PAGE delle batteriocine. La metà del gel ricoperto con cellule di <i>L. monocytogenes</i> mostra la zona d'inibizione nella crescita del microrganismo. Le zone d'inibizione indicano la posizione delle bande del peptide attivo_____	132
Fig.37 -	Determinazione della dimensione delle batteriocine, mediante affiancamento delle metà dei gel ottenuti in tricine-SDS-PAGE. Sulla sinistra di ciascun immagine la metà del gel colorato con Coomassie, sulla destra quella impiegata per il test di attività biologica._____	133

BIBLIOGRAPHIA

Bibliografia

- Aasen I.M., Moreto T., Katla T., Axelsson L. and Storro I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 159-166.
- Abee T., Romboust F. M., Hungenhaltz J., Gruhard G. and Letellier L. (1994). Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott a grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1962-1968.
- Abee T., Krockel L., Hill C., (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, pp 169 – 185.
- Abriouel H., Lucas R., Ben Omar N., Valdivia E., Maqueda M., Martínez-Cañamero M. and Gálvez A. (2005). Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *System. Appl. Microbiol.*, 28, 383–397.
- Abriouel H, Valdivia E, Galvez A, Maqueda M. (2001). Influence of physicochemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocin AS-48. *Curr Microbiol*, 42, 89–95.
- Achemchem F., Martinez-Bueno M., Abrini J., Valdivia E. and Maqueda M. (2005). *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 141–150.
- Albano H., Todorov S.D., van Reenen C.A., Hogg T., Dicks L.M.T. and Teixeira P. (2007). Characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 239-247.
- Altschul S.F., Madden T.L., Scäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389-3402.
- Ananou S, Gálvez A., Martýnez-Bueno M., Maqueda M. and Valdivia E. (2005). Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* 0157:H7. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1364-72.
- Anastasiadou S., Papagianni M., Filiouisis G., Ambrosiadis I. and Koidis P. (2008). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 448–454.
- Arlindo S., Calo P., Franco C., Prado M., Cepeda A. and Barros-Velázquez J. (2006). Single nucleotide polymorphism analysis of the enterocin P structural gene of *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 1229 – 1238.

- Atrih A., Rekhif N., Milliere J.P. and Lefebvre G., (1993). Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Can. J. Microbiol.* 39, 1173–1179.
- Audisto M.C., Oliver G. and Apella M.C. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 235-241.
- Aymerich T., Garriga M., Ylla J., Vallier J., Monfort J.M. and Hugas M. (2000). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CT492. Optimization of *in vitro* production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 686-694.
- Aymerich T., Holo H., Havastein L.S., Hugas M., Garriga M. and Nes I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1676 – 1682.
- Balla E. and Dicks L.M.T. (2005). Molecular analysis of the gene cluster involved in the production and secretion of enterocins 1071A and 1071B and of the genes responsible for the replication and transfer of the plasmid pEF1071. *Int. J. Food Microbiol.*, 99: 33–45.
- Balla E., Dicks L.M.T., Du Toit M., van der Merwe M.J. and Holzapfel W.H. (2000). Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1298–1304.
- Barefoot S.F. and Klaenhammer T.R. (1984). Purification and Characterization of the *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin Lactacin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26, 328-334.
- Bennik M.H.J., Vanloo B., Brasseur R., Gorris L.G.M. and Smid E.J. (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1373, 47–58.
- Ben Omar N., Castro A., Lucas R., Abriouel H., Yousif N.M.K., Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., Pérez-Pulido R., Martínez-Canãmero M. and Gálvez, A. (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 118– 130.
- Benz R., Jung G. and Sahl H.G. (1991). Mechanism of channel-forming lantibiotics in black lipid membranes. In: Jung G., Sahl H-G, editors. *Nisin and novel lantibiotics*. Leiden: ESCOM; pp 359-372.
- Beukes E. M., Bester B. H. and Mostert J. F (2001). The Microbiology of South African traditional fermented milks. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 189-197.

- Bhunja A.K., Johnson M. and Ray B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology* 2, 319-322.
- Bhunja A.K., Johnson M.C. and Ray B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 261–268.
- Biswas S.R., Ray P., Johnson M.C. and Ray B (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1265-1267.
- Bogovic-Matijasic B. and Rogelj I. (1998). Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221 – production studies in MRS–media at different pH–values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochem.*, 33, 345-352.
- Boman H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 61– 92.
- Boman H.G. (1996). Peptide antibiotics: holy or heretic grail of innate immunity? *Scand. J. Immunol.*, 43, 475 – 82.
- Bonfoh B., Wasem A., Traorè A.N., Fanè A., Spillmann H., Simbè C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Farah Z., Zinsstag J. (2003). Microbiological quality of cows milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, 14, (7), 495–500.
- Booth M.C., Bogie C.P., Sahl H.G., Siezen R.J., Hatter K.L. and Gilmore M.S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol. Microbiol.* 21, 1175–1184.
- Brashears M., Reilly S. and Guillard S. E. (1998). Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *E. coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. *Journal of Food Protection*, 61, 166-179.
- Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O.P., Sahl, H.G. and de Kruijff B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286, 2361 – 2364.
- Bridge P. D. and Sneath P. H. A. (1983). Numerical Taxonomy of *Streptococcus*. *Journal of General Microbiology*, 129, 565-597.
- Brock T. D. (1995). *Biology of Microorganisms*. New Jersey : Prentice Hall.
- Brul S. and Coote P. (1999). Preservatives agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-17.
- Bruno M.E.C. and Montville T.J. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(9), 3003-3010.

- Buchman G.W., Banerjee S. and Hansen J.N. (1988). Structure and expression of the gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.*, 263, 16260 – 16266.
- Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Scoffs H.M.E., Terras F.R.G., Thevissen K. and Osborn R.W. (1994). Gene encoded antimicrobial peptides from plants. In: Boman, HG., Marsh, J., Goode, JA., editors.,: *Antimicrobial peptides*. New York: Wiley, pp 91 – 106.
- Cantoni C., Arcidiacono M. and Stella S. (2002). Localizzazione di *Listeria monocytogenes* in macelli suini. *Industrie alimentari*, XLI, 17–24.
- Caridi A. (2002). Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*. *J. Ind Microbiol Biotechnol.*, 29, 303–8.
- Casaus P., Nilsen T., Cintas L.M., Nes I.F., Hernández P.E. and Holo H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology.*, 143, 2287–2294.
- Caserio, G. (2002). *Listeria monocytogenes* nella lavorazione di prodotti carnei ed ittici. Atti della Conferenza Nazionale: La sicurezza microbiologica nella produzione di alimenti per il 21° secolo - *Listeria monocytogenes* nelle produzioni alimentari, 10 maggio 2002 Bologna.189.
- Chen H. and Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2, (3), 81-100.
- Chen Y., Ludescher R.D. and Montville T.J. (1997). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin-PA1 and its fragments to phospholipids vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4770–4777.
- Chikindas M.L., Venema K., Ledebøer A.M., Venema G. and Kok J. (1995). Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous host. *Lett. Appl Microbiol.*, 21, 183 –
- Chin H.S., Chin J.S., Kim J.M., Yang R. and Yoon S.S. (2001). Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Sci. Biotech.*, 10,335-341.
- Cintas L.M., Casaus P., Håvarstein L.S., Hernández P.E. and Nes I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4321–4330.
- Cintas L.M., Casaus P., Herranz P.E., Håvarstein L.S., Holo H., Hernández P.E. and Nes I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182, 6806–6814.

- Cintas L.M., Casaus P., Holo H., Hernández P.E., Nes I.F. and Håvarstein L.V. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180, 1988–1994.
- Cleveland J., Mantville T. J., Ness I. F. and Chiknids M. L. (2001). Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71,1-20.
- Concon J. M. (1980). *Food Toxicology: contaminants and additives (part B)*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Coppola S., Villani F., Coppola R. and Parente E. (1990). Comparison of different starter systems for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait* 70, 411– 423.
- Cortezzo D.E., Setlow B., Setlow P. (2004). Analysis of the action of compounds that inhibit the germination of spores of *Bacillus* species. *J. of Appl. Microbiol.* 96, (4), 725-741.
- Cotter P., Hill C. and Ross R.P. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.*, vol 4, (2),
- Crispie F., Flynn J., Ross R., Hill C. and Meaney W. (2004). Update on the development of a novel dry cow therapy using a bismuth-based intramammary teat seal in combination with the bacteriocin lacticin 3147. *Irish-Veterinary-Journal*, 57, (11), 652-656.
- Daeschel M.A. (1989). Antimicrobial substances from acid latic bacteria for use as food preservative. *Food Technology*, 43, 164-167.
- Daeschel, M. A. and Ray, B. E. (1992). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Boca Raton : CRC Press.
- Daeschel M.A., McKeney M.C. and McDonald L.C. (1990). Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.*, 7, 91-98.
- Davidson P. M. and Hoover D. G. (1993). Antimicrobial components from latic acid bacteria. In: Salminen, A. Von Wright, A. (Eds.). *Latic acid bacteria*. New York : Chapman & Hall. pp.127-150.
- Davies E. A. (1999). Effective use of nisin to control latic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *Journal of Food Protection*, 9, 1004-1010.
- Davis I. (1999). What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Molecular Microbiology*, 4, 1227-1232.
- Daw M. A. and Falkiner F. (1996). Bacteriocins: nature, functions and structure. *Micron*, 27, 467-479.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. and Ross P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058–1071.

De Kwaadsteniet M., Fraer T., Van Reenen C.A. and Dicks L.M.T. (2006). Bacteriocin T8, a novel class Iia sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4761–4766.

Del Campo R., Tenorio C., Jiménez-Díaz R., Rubio C., Gómez-Lus R., Baquero F. and Torres C. (2001). Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 905–912.

Delbès C., , Ali-Mandjee L. and Montel M.C. (2007). Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. *Applied And Environmental Microbiology*, 73, (6), 1882–1891.

Dellaglio F., Bottazzi V. and Troatelli L.D. (1973). Deoxyribonucleic acid homology and vase composition in some thermophilic lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, 74,289-297.

Delves-Broughton J. (1990). Nisin and its use as food preservative. *Food Technol.*, 40, 100 – 117.

Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J. and Hugenholtz J. (1996). Application of the bacteriocin nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, 193 – 202.

De Man J.C., Rogosa M. and Sharpe M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 130-135.

de Vos W.M., Kuipers O.P., van der Meer J.R. and Siezen R.J. (1995). Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: posttranslationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 17, 427–437.

Devriese L.A. and Pot B. (1995). *The genus Enterococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzappel, W.H. (Eds.), *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, pp. 327– 367.

Devriese L.A., Pot B. and Collins M.D., (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 399 – 408.

De Vuyst L. and Vandame E. J. (1994). *Bacteriocins of latic acid bacteria. Microbiology, genetics and application*. New York : Chapman & Hall.

De Vuyst L. and Vandamme E. (1994). *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (Blackie London, United Kingdom pp. 539

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

- Disegna L., Ottaviani F., Giaccon D. and Loddo (1988). Il ruolo della tecnologia e l'importanza dell'ecologia microbica nella prevenzione dei rischi igienico sanitari da *Listeria monocytogenes* nei prodotti di origine animale – Atti del convegno “*Listeria monocytogenes*” Tiene, 24-25 ottobre 1988. Istituto di tecnica e sperimentazione lattiero-casearia ed agroalimentare, pp 43 – 70.
- Doi K., Eguchi T., Choi S.H., Iwatake A., Ohmomo S. and Ogata S. (2002). Isolation of enterocin SE-K4-encoding plasmid and a high enterocin SE-K4 producing strain of *Enterococcus faecalis* K-4. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 434–436.
- Duffes F., Corre C., Leroy F., Dousset X. and Boyaval P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semi-purified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Prot.*, 62, 336 – 342.
- Durst J. and Berencsi, G. (1975). *Data about listeriosis in Hungary* pp 106 – 111. In problem of listeriosis. Proceeding of the 6 International symposium on listeriosis (M. Woodbine, Ed.) pp 112 – 114. Leicester University Press, Leicester U.K.
- Dutton C.J., Haxell M.A., McAuthur H.A.I and Wax R.G., (2002). *Peptide Antibiotics, Discovery, Modes of Action and Applications*. Marcel Dekker, New York.
- Economou A. (1998). Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processing enzyme. *Mol. Microbiol.*, 27, 511–518.
- Eguchi T., Kaminaka K., Shima J., Kawamoto S., Mori K., Choi S.H., Doi K., Ohmomo S. and Ogata S. (2001). Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 247–253.
- Enan G., El-Essawy A.A., Uyttendaele M. and Debevere J. (1996). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int. Journal of Food Microbiol.*, 30, 189-215.
- Ennahar S., Asou Y., Zendo T., Sonomoto K. and Ishizaki A. (2001). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food. Microbiol.* 70, 291–301.
- Ennahar S. and Deshamps N. (2000). Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 449 – 457.
- Farber J.M. and Peterkin P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food born pathogens. *Microbiol. Rev.*, 55, 476 – 511.
- Fariás M.E., Fariás R.N., de RuízHolgado A.P. and Sesma F. (1996). Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL35, a ‘pediocin-like’ bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22, 412 – 419.

- Fernández-Díaz M.J. (1983). Olives. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology. Food and Feed Production by Microorganisms*, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 379–397.
- Ferreira M.A.S.S. and Lund B.M. (1996). The effect of Nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22, 433 – 438.
- Fimland G., Blingsmo O., Sletten K., Jung G., Nes I.F. and Nissen-Meyer J. (1996). New biological active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C- terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3313 – 3318.
- Fimland G., Johnsen L., Dalhus B. and Nissen-Meyer J. (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Peptide Sci.* 11, 688–696.
- Fiorentini A. M., Ernani S. S., Porto A. C. S., Jaciara Z. M. and Franco, B. D. G. M. (2001). Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 42-46.
- Florey H. W. (1996). The use of microorganisms for therapeutic e structure. *Micron*, 27, 467- 479.
- Floriano B., Ruiz-Barba J.L. and Jiménez-Díaz R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4883–4890.
- Flynn S., van Sinderen D., Thornton G.M., Holo H., Nes I.F. and Collins J.K. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiol.*, 62, 973 – 984.
- Folli C., Ramazzina I., Arcidiaco P., Stoppini M. and Berni R. (2003). Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221, 143–149.
- Foschino R., Invernizzi A., Barucco R. and Stradiotto K, (2002). Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69, 2, 213-225.
- Foulquié Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. and De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 1 – 24.
- Franz C.M.A.P. and Holzapfel W.H. (2004). The Genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. *The Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 3rd edn (Salminen S, von Wright A & Ouwehand A, eds), pp. 199–247. Marcel Dekker, New York.

- Franz C.M.A.P., Grube A., Hermann A., Abriouel H., Stärke J., Lombardi A., Tauscher B. and Holzapfel W.H. (2002). Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2550 – 2554.
- Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H. and Stiles M.E. (1999a). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1–24.
- Franz C.M.A.P., Schillinger U. and Holzapfel W.H. (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology* 29, 255– 270.
- Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H. and Holzapfel W.H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105–122.
- Franz C.M.A.P., van Belkum M.J., Holzapfel W.H., Abriouel H. and Antonio Gálvez (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31, 293–310.
- Franz C.M.A.P., van Belkum M.J., Worobo R.W., Vederas J.C. and Stiles M.E. (2000). Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology*, 146, 621–631.
- Franz C.M.A.P., Worobo R.W.W., Quadri L.E.N., Schillinger U., Holzapfel W.H., Vederas J.C. and Stiles M.E. (1999b). Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2170–2178.
- Fuqua C., Parsek M.R. and Greenberg E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.*, 35, 439-68.
- Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E., Quesada A. and Montoya E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.*, 32, 765–771.
- Gálvez A., Valdivia E., Abriouel H., Camafeita E., Mendez E., Martínez-Bueno M. and Maqueda M. (1998). Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch. Microbiol.*, 171, 59–65.
- Galvin M., Hill C. and Ross R.P. (1999). Lactocin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 255-258.
- Garneau S., Martin N. and Vederas J.C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84, 577 – 592.

- Gelsomino R., Vancanneyt M., Cogan T.M., Condon S., Swings J. (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3560–3565.
- Gilmore M.S., Segarra R.A., Booth M.C., Bogie C.P., Hall L.R., Clewell D.B. (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 – encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.*, 176, 7335-7344.
- Giraffa G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 163– 171.
- Giraffa G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222.
- Giraffa G., Carminati D. and Neviani E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection* 60, 732– 738.
- Gonzales B., Arca P., Mayo B. and Suarez J.E. (1994). Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2158 – 2163.
- Gordon D. and Riley M. A. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7, 129-133.
- Ghosh S., Van Heel D. and Playford R.J. (2004). Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? *Gut*, 53, 620-622.
- Gotteland M., Brunser O. and Cruchet S. (2006). Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 23, (8), 1077-1086.
- Gould G. W. (1995). Industry perspective on the use of natural antimicrobial and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, 35, 82-86.
- Green G., Dicks L.M.T., Bruggeman G., Vandamme E.J. and Chikindas M.L. (1997). Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 127–132.
- Gross, D. C. and Vidaver A. K. (1979). Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 25, 367-347.
- Gudder A., Wiedemann I. and Sahl H.G. (2000). Post-translationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Biopolymers*, 55, 62–73.
- Hakovirta J., Reunanen J. and Saris P.E.J. (2006). Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products. *Appl. Envir. Microbiol.* 72, 1001-1005.
- Hancock, R. E. and Chapple, D. S. (1999). Peptides antibiotics antimicrobial. *Agents in Chemotherapy*, 43, 1317-1323.

- Hardie and Whiley., (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 26, 1S– 11S.
- Harris L.J., Daeschel M.A., Stiles M.E. and Klaenhammer T.R. (1989). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52, 384-387.
- Harris L. J., Fleming H. P. and Klaenhammer T. R. (1997). Development in nisin research. *Food Research International*, 25, 57-66.
- Hastings J.W., Sailer M., Johnson K., Roy K.L., Vederas J.C. and Stiles M.E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, 173, 7491–7500.
- Hayes P. R. (1993). *Microbiologia e Higiene de los Alimentos*. Zaragoza : Acribia.
- Hécharde Y., Derijard D.B., Lattelier F. and Cenatiempo Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 2725 – 2731.
- Henderson J.T., Chopko A.L. and Van Wassenaar P.D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.*, 295, 5 – 12.
- Herranz C., Martínez J.M., Rodríguez J.M., Hernández P.E. and Cintas L.M. (2001). Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 378-383.
- Herranz C., Mukhopadhyay S., Casaus P., Martínez J., Rodríguez J.M., Nes I.F., Cintas L.M. and Hernández P.E. (1999). Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* 39, 282–290.
- Herranz C., Mukhopadhyay S., Casaus P., Martínez J.M., Rodríguez J.M., Nes I.F., Hernández P.E. and Cintas L.M. (2001). *Enterococcus faecium* P 21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.*, 18, 115–131.
- Heu S., Oh J., Kang Y., Ryu S., Cho S.K., Cho Y. and Cho M. (2001). Gly gene cloning and expression and purification of Glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *Glycines* 8ra. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, (9), 4105-4110.
- Hickey R.M., Twomey D.P., Ross R.P. and Hill C. (2003). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*, 149, 655–664.
- Higgins C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 8, 67 -113.

Hongoh Y., Yuzawa H., Ohkuma M. and Kudo T., (2003). Evaluation of Primers and PCR Condition for Analysis of 16S rRNA Genes From a Natural Environment. *FEMS Microb. Lett.* 221, 299-304.

Holck A., Axelsson L., Birkeland S-E, Aukrust T. and Blom H. (1992). Purification and aminoacid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* Lb706. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 2715 – 2720.

Holo H. and Nes I.F. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55, 50-61.

Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S. and Nes I.F. (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147, 643 – 651.

Holzappel W.H., Geisen R. and Schillinger U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Micro.* 24, 343–362.

Hout E., Meghrou J., Barrena-Gonzales C. and Petitdemange H. (1996). Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* J46: isolation and characterization of the protein and its gene. *Anaerobe*, 2, 137 – 145.

Hugas M., Garriga M. and Aymerich M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 223– 233.

Hurst A. (1981). Nisin. *Applied Microbiology*, 27, 85-122.

Inoue T., Tomita H. and Ike Y. (2006). Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1202–1212.

Ivanova I., Kabadjova P., Pantev A., Danova S. and Dousset X. (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* susp. *lactis* B14 isolated from boza-Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatal.—Vestn. Mosk. Univ. Kimia*, 41, 47– 53.

Ivanova I, Miteva V, Stefanova Ts, Pantev A, Budakov I, Danova S, et al. (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int. J. Food Microbiol.*, 42, 147–58.

Jack R. W., Tagg J. R. and Ray B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59, 171-200.

Jack R.W., Wan J., Gordon J., Harmark K., Davidson B.E., Hillier A.J. et al. (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG 126. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2897- 2903.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

- Jacob F., Lwaff A., Siminonvich A. and Wallman E. (1953). Definition de quelques terms relatifs à la lysogenie. *Annales de Institut Pasteur*, 84, 222-224.
- Jennes W., Dicks L.M.T. and Verwoerd D.J. (2002). Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.*, 88:349-57.
- Jimenez-Diaz R., Rios-Sanchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barrba J.L. and Piard J.C. (1993). Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1416-1424.
- Joerger M.C. and Klaenhammer T.R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, 167, 439-446.
- Johanson J.L., Cassenes R.G. and Schoeni J.L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimental infected cattle and in hard salami. *Applied and environmental microbiology*, 54, 497 – 501.
- Joosten H.M.L.J., Nuñez M., Devreese B., van Beeumen J. and Marugg J.D. (1996). Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4220 – 4223.
- Jung, G. In: Jung, G., Sahl, H-G, editors (1991). *Lantibiotics: a survey, Nisin and novel lantibiotics*. Leiden: ESCOM Science Publishers, pp 1- 34.
- Kaletta C., Entian K.D., Kellener G., Jung G., Reis M. and Sahl H.G. (1989). Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Arch. Microbiol.*, 152, 16–9.
- Kagkli D.M., Vancanneyt M., Hill C., Vandamme P. and Cogan T.M. (2007). *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology*, 114, (2), 243-251.
- Kalmokoff M.L., Cyr T.D., Hefford M.A., Whitford M.F. and Teather R.M. (2003). Butyriovibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyriovibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Can. J. Microbiol.*, 49, 763–773.
- Kato T., Matsuda T., Ogawa E., Ogawa H., Kato H., Doi U. and Nakamura R. (1994). Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 277-282.
- Kaur K., Andrew L.C., Wishart D.S. and Vederas J.C. (2004). Dynamic relationship among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha elix as a receptor-bindingregion. *Biochemistry* 43, 9009-20.

- Kawai Y., Ishii Y., Arakawa K. et al. (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2906–2911.
- Kawamoto S., Shima J., Sato R., Eguchi T., Ohmomo S., Shibato J., Horikoshi N., Takeshita K. and Sameshima T. (2002). Biochemical and genetic characterization of mundtacin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3830–3840.
- Kawulka K.E., Sprules T., Diaper C.M., Whittall R.M., McKay R.T., Mercier P., Zuber P. and Vederas J.C. (2004). Structure of subtilosin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. *Biochemistry*, 43, 3385–3395.
- Kelly W.J., Asmundson R.V. and Huang C.M. (1996). Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.*, 81, 657–662.
- Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O. and Kok J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1589–1597.
- Keppler K., Geisen R. and Holzapfel W. H. (1994). An α -amylase sensitive bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *Food Microbiol.* 11, 39-45.
- Ker A. and Tate M. E. (1984). Agracins and biological and control of craw gall. *Microbiology Science*, 1, 1-14.
- Kim W.S., Hall R.J. and Dunn N.W. (1997). The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 429–433.
- Kleanhammer T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimic*, 70, 337- 49.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by latic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-45.
- Klement Z., Rodolph K. and Sands D. C. (1990). *Methods in phytobacteriology*. Buldapeste : Akadémiai Kiado.
- Knoetze H., Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2008). A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, (3), 228-234.
- Ko S.H. and Ahn C. (2000). Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimachi. *Food. Sci. Biotechnol.*, 9, 263–9.

- Kominsky G. M. R. (1999). Avaliação da sensibilidade de microrganismos selecionados a diferentes concentrações de nisina em salsichas comuns e de frango. *Higiene Alimentar*, 13, 56-62.
- Krier F., Revol-Junelles A.M. and Germain P (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 359-363.
- Kuipers O.P. et al., (1993). Characterization of the Nisin Gene Cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis* Requirement of Expression of the nisA and nisI Genes for Development of Immunity. *Eur. J. Biochem.*, 216, 281-91.
- Kumar M., Kumar Tiwari S. and Srivastava S. (2009). Purification and Characterization of Enterocin LR/6, a Bacteriocin from *Enterococcus faecium* LR/6. *Appl Biochem Biotechnol*, DOI 10.1007/s12010-009-8586-z.
- Leal-Sánchez M.V., Jiménez-Díaz R., Maldonado-Barragán A., Garrido-Fernández A. and Ruiz-Barba J.L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4465–4471.
- Ledda A., Scintu M.F., Pirisi A., Sanna S. and Mannu L. (1994). Technological characterization of lactococci and enterococci for the manufacture of Fiore Sardo sheep cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 45, 443– 456.
- Le Duc H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O. and Cutting S.M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. and Envir. Microbiol.* 70, (4), 2161-2171.
- Lee N. K., and Paik H. D. (2001). Partial characterisation of lactocin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*, 18, 17–24.
- Legnani P., Leoni E., Soppesa F. and Bisbini P. (1995). Sulla presenza di *Listeria spp.* In prodotti alimentari della provincia di Belluno. *L'igiene Moderna*, 103, 2.
- Leisner J.J., Greer G.G. and Styles M.E. (1996). Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2610 – 2614.
- Lerat E. and Moran N.A. (2004) The evolutionary history of quorum-sensing-systems in bacteria. *Mol. Biol. Evol.*, 21, (5), 903-913.
- Leroy F. and De Vuyst L. A. (2003). Combined model to predict the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC494, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1093–1099.
- Lewus C.B., Kaiser A. and Montville T.J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1683-1688.

Lewus C.B., Sun S. and Montville T.J. (1992). Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. *Appl. and Envir. Microbiol.*, 58, 1, 143-149.

Linnet P.E. and Strominger J.L. (1973). Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4, 231 – 236.

Litopoulou-Tzanetaki E. and Tzanetakis N. (1992). Microbiological study of whitebrined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology* 9, 13– 19.

Liu W. and Hansen J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2551-2558.

Lopez-Pedemonte T.J., Roig-Sagues A.X., Trujillo A.J., Capellas M. and Guamis B. (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *J. Dairy Sci.* 86, 3075-3081.

Losteinkit C., Uchiyama K., Ochi S., Takaoka T., Nagahisha K. and Shioya S. (2001). Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 390–395.

Luchansky J.B. (1999). Overview on applications for bacteriocin-producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 335.

Maisnier-Patin S., Forni E. and Richard J. (1996). Purification, partial characterisation and mode of action of enterococin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 255–270.

Maisnier-Patin S., Deschamps N., Tatini S.R. and Richard J. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72, 249-263.

Manca de Nadra M.C., Sandino de Lamelas D. and Strasser de Saad A.M. (1998). Pediocin N5p from *Pediococcus pentosaceus*: Adsorption on bacterial strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 39, 79-85.

Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis I.G. and Anifantakis E.M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 82, 153– 161.

Martínez-Bueno M., Maqueda M, Gálvez A., Samyn B., van Beeumen J., Coyette J. and Valdivia E. (1994). Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.*, 176, 6334–6339.

Martinez B. and Rodriguez A. (2005). Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiology Letters*, 252, (1), 67-72.

- Martin-Platero A.M., Valdivia E., Ruiz-Rodriguez M., Soler J.J., Martin-Vivaldi M., Maqueda M. and Martinez-Bueno M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4245 – 4249.
- Marugg J.D., Gonzales C.F., Kunka B.S., Ledebouer A.M., Pucci A.M., Toonen M.Y., Walzer S.A., Zoetmulder L.C.M. and Vandenberg P.A. (1992). Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2360 – 2367.
- Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. and Drosinos E.H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Sci.*, 64, 265-271.
- Matsusaki H., Endo N., Sonomoto K. and Ishizaki A (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 36-40.
- Matic A.T.R. and Hirsch A. (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2, 5–7.
- Mc Auliffe O., Ryan M.P., Ross R.P., Hill C., Breeuwer P. and Abee T. (1998). Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 439 - 445.
- Mc Mullen L.M. and Stiles M.E. (1996). Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, 59 (suppl.), 64-71.
- McCormick J.K., Poon A., Sailer M., Gao Y., Roy K.L., McMullen L.M., et al. (1998). Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4757 – 4766.
- Messi P, Bondi M., Sabia C., Battini R. and Manicardi G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 193–8.
- Michel V., Hauwuy A. and Chamba J.F. (2001). Raw cow milk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Lait*, 81, (5), 575-592.
- Miller K.W., Schamber R., Osmangaoglu O. and Ray B. (1998). Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1997–2005.
- Miller M.B. and Bassler B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 165-99.

- Montville, T.J. and Winkowski, K., (1997). *Biologically based preservation systems and probiotic bacteria*. In: Doyle M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., editors. *Food Microbiology*. Fundamentals and frontiers. USA: ASM Press; pp 557 – 576.
- Moreno I., Learyer A. L. S. and Leitão M. F. (2000). Detection and characterization of bacteriocins producing of *Lactobacillus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 184-192.
- Morgan S., Ross R.P. and Hill C. (1995). Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcin A, B and M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2995-3001.
- Morrison D, Woodford N and Cookson B (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symp.*, 83(Suppl), 89S–99S.
- Mortverd-Abildgaard C.I., Nissen-Meyer J., Jelle B., Grenov B., Skaugen M. and Nes I.F. (1995). Production and pH-dependent bacteriocidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 175–179.
- Mortverdt, C.I., Nissen-Meyr, J., Sletten, K. and Nes I.F. (1991). Purification and aminoacid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1829 – 1834.
- Motta A.S. and Brandelli A. (2003). Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 163–167.
- Mulders J. W. M., Boerrigter I. J., Rollema H. S., Siezen R. J. and de Vos W. M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic Nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201, 581-584.
- Murray B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 46–65.
- Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J. and Dicks L.M.T. (2001). Growth optimisation of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 1131-1138.
- Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V. and Holo H., (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 113–128.
- Nicolas, J.A., (1985). Contamination des vivande set des produits de charcuterie par *Listeria monocytogenes* en Haute. *Vienne Science des Aliments* 5, 175 – 180.
- Nieto Lozano J.C., Nissen-Meyer J., Sletten K., Pelaz C. and Nes I.F., (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1985 – 1990.

- Nieto-Lozano J.C., Reguera-Useros J.I., Pelaez-Martinez M.C. and De la Torre A.H. (2002). Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Sci.*, 62, 237-243.
- Nilsen T., Nes I.F. and Holo H. (2003). Enterolysin A, a cell walldegrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2975–2984.
- Nilsson L., Chen Y., Chikindas M. L., Huss H. H., Gran L. and Monteville T. J. (2000). Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 769-774.
- Nissen-Meyer J. and Nes I.F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.*, 167, 67–77.
- Nissen-Meyer J., Larsen A., Sletten K., Daeschel M. and Nes I.F. (1993). Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two-peptides. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 1973 – 1978.
- Noble C.J. (1978). Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J. Clin. Pathol.* 4, 1182–1186.
- Ogden K. and Tubb R.S. (1985). Inhibition of beer-spoilage lactic acid bacteria by nisin. *J. Ins.t Brew.*, 91, 390–2.
- O’Keeffe T., Hill C. and Ross R.P. (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1506–1515.
- O’Sullivan L., Ross R.P. and Hill C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593 – 604.
- Ottaviani F. (2002). Microrganismi patogeni, marcatori, e deterioranti: sommario delle caratteristiche e delle modalità di ricerca analitica. *Manuale della sicurezza microbiologica degli alimenti e delle acque* (Oxoid), pag. 55.
- Paker M. W., Pattus F., Tucker A. D. and Tsernoglou D. (1989). Structure of the membrane forming fragment of the colicin A. *Nature*, 37, 93-96.
- Pantev A., Kabadjova P., Dalgarrondo M., Haertlè T., Ivanova I., Chobert J.M. (2002). Isolation and partial characterization of antibacterial substance produced by *Enterococcus faecium* A 2000. *Folia Microbiol.*, 47, 391-400.
- Papagianni M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*. 21, 465 – 499.
- Parente E., and Ricciardi A. (1994). Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19, 12-15.

- Parente E., Ricciardi A. and Addario G. (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140VWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 388-394.
- Peck M.W. (1997). *Clostridium botulinum* and the safety of refrigerated processed foods of extended durability. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 186-192.
- Pelczar M., Reid R. and Chan E. C. S. (1980). *Microbiologia*. São Paulo : McGraw-Hill.
- Piard J.C., Muriana P.M., Desmazeaud M.J. and Klaenhammer T.R. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine – containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ481. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 279 – 284.
- Piva A. and Headon D.R. (1994). Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiol.*, 140, 697 – 702.
- Polentarutti M., Piasenzotto L., Comi G., Conte L. and Surmely A. (2001). Influence of season on raw milk and on Montasio cheese aroma. *Industria Alimentari*, 40, (409), 1331-1342.
- Pugsley A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 50–108.
- Quadri L.E.N., Kleerebezem M., Kuipers O.P., de Vos W.M., Roy K.L., Vederas J.C. and Stiles M.E. (1997). Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 179, 6163–6171.
- Quadri L.E.N., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C. and Stiles M.E. (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.*, 269, 12204 – 12221.
- Ray B. (1996). *Fundamental food microbiology*. Washington : CRC Press.
- Ray S.K., Johnson M.C. and Ray B. (1989). Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Industrial Microbiology* 4, 163-171.
- Reisinger P., Seidel H., Tschesche H. and Hammes W.P. (1980). The effect of Nisin on murein synthesis. *Arch. Microbiol.*, 127, 187 – 193.
- Riley M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocins evolution. *Annals in Reviewed Genetic*, 32, 255 - 278.
- Riley M.A. and Wertz J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84, 357 – 64.
- Rince A., Dufour A., Le Pogam S., Thuault D., Bourgeois C.M. and Le Pennec J.P. (1994). Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of

- lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1652 – 1657.
- Ross R.P., Galvin M., Mc Auliffe O., Morgan S.M., Ryan M.P., Twomey D.P., Meaney W.J. and Hill C. (1999). Developing application for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 337-346.
- Ross P.R., Morgan S. and Hill C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.*, 79, 3 – 16.
- Ruhr E. and Sahl H.G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic Nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27, 841 – 845.
- Ryan M.P. (1999_a). Biochemical characterization of a novel two-component lantibiotic, lacticin 3147: exploitation for food and biomedical applications. Ph.D. Thesis, University College Cork, Ireland.
- Ryan M.P., Jack R., Josten W., Sahl H.G., Jung G. and Ross R.P. (1999_b). Extensive post-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147. *J. Biol. Chem.*, 274, 37544 – 37550.
- Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R.P. and Hill C. (1998). Evaluation of lactocin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2287-2290.
- Saavedra L., Minahk C., de Ruiz Holgado A.P. and Sesma F. (2004). Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH₂-terminal sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 2778–2781.
- Sahl H.G. (1994). Gene-encoded Antibiotics made in bacteria. In: Bomam, HG., Marsh, J., Goode, JA., editors. *Antimicrobial peptides*. New York: Wiley; p. 27 – 53.
- Sahl H.G. and Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 149, 120-124.
- Sahl H.G., Jack R.W. and Bierbaum G. (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230, 827 – 853.
- Sahl H.G., Kordel M. and Benz R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.*, 149, 120 – 124.
- Salminen S., Isolauri E. and Salminen E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilising the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 251-262.

Samelis J., Roller S. and Metaxopoulos J. (1994). Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 475 – 486.

Sánchez-Hidalgo M., Maqueda M., Gálvez A., Abriouel H., Valdivia E. and Martínez-Bueno M. (2003). The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1633–1641.

Scägger H. and Von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.

Schleifer K.H. and Kilpper-Bälz R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 31– 34.

Schleifer K.H. and Kilpper-Bälz R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 1 –19.

Schillinger U. (1990). Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Bills, D. D. and Kung, S. (Eds.). *Biotechnology and Food Safety*. Boston : Butterworth-Heinemann. pp. 55-74.

Schillinger U. and Lucke F.-K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1901 – 1906.

Schillinger U., Becker B. Vignolo G. and Holzapfel W.H. (2001). Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *Intern. J. Food Microbiol.*, 71, 159-168.

Schillinger U., Geisen R., and Holzapfel W.H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 158– 64.

Settanni L. and Corsetti A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123–138.

Shiba T., Wakamiya T., Fukase K., Ueki Y., Teshima T. and Nishikawa M. (1991). Structure of the lanthionine peptide nisin, ancovenin and lanthiopeptin. In: Jung, G., Sahl, H.-G. (Eds.), *Nisin and Novel Lantibiotics*. ESCOM Science Publishers, Leiden, pp. 113–122.

Sinell H. J. (1989). Interacting factors affecting mixed populations. In: Silliker, J. H. *Microbial Ecology of Foods*. New York : Academic Press. pp.215-240.

Siragusa G.R. and Nettles Cuter C. (1993). Brochocin-C, a new bacteriocin produced by *Brochothrix campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2326 – 2328.

Autore: Stefano Schirru

Titolo: Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra

Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari
Università degli Studi di Sassari

Skaugen M., Nissen-Meyer J., Jung G., Stefanovic S., Sletten K. and Abdigaard CIM. (1994). In vitro conversion of L-serrine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *J. Biol. Chem.*, 269, 27183 – 27185.

Soomro A.H., Masud T. and Anwaar K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1: 20-24.

Sparo M.D., Castro M.S., Andino P.J., et al. (2006). Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 123-34.

Stainer R. U., Ingraham J. L., Wheelis M. L. and Pairtes P. R. (1986). *The Microbial World*. New Jersey : Prentice Hall.

Stackebrandt and Teuber. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 317– 324.

Stevens K.A., Klapes N.A., Sheldon B.W. and Klaenhammer T.R. (1992). Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1786–8.

Stevens K.A., Sheldon B.W., Klapes N.A. and Klaenhammer T.R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gramnegative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3613–5.

Stiles M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, 331-345.

Stiles and Holzapfel (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.

Stockewell V. O., Moore L. W. and Looper J. E. (1993). Fate of agrobacterium radiobacter K84 in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2112-2120.

Stoffels g., Sahl H.G. and Gudmundsdottir A. (1993). Carnocin U149, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various gram-positive bacteria including *Listeria* sp. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 199 – 210.

Tadashi B. and Schnneewind O. (1998). Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends in Microbiology*, 6, 66-71.

Tagg J.R., Dajani A.S. and Wannamaker N.W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. 40, 722 – 756.

Todokoro D., Tomita H., Inoue T. and Ike Y. (2006). Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6955–6964.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Braz. J. Microbiol.*, 38, 166-172.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2009). Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*, 132, (2-3), 117-126.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2005_b). Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 165-173.

Todorov, S.D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, (1), 178-187.

Todorov, S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action. A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40, (2), 209-221.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2004). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World J. Microbiol Biotechnol*, 20, 643–50.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2004). Influence of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST112BR, a strain isolated from traditional South African beer. Proceedings of National conference with foreign participation, 3-4 Juny, 2004, Stara Zagora, Bulgaria. Volume IV, Human medicine. Part 1. Clinical and molecular biology, microbiology. Physiology and pharmacology. Publishing group: Stara Zagora Union of Scientists. 132-136.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2006). Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. *Biologia*, 61, 269-274.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2006). Parameters affecting the adsorption of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423 isolated from sorghum beer. *Biotechnol. J.*, 1, 405-409.

Todorov S.D. and Dicks L.M.T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 318-326.

Todorov S.D., Botes M., Danova S.T. and Dicks L.M.T. (2007). Probiotic properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *Journal of Applied Microbiology*. 103, (3), 629-639.

- Todorov S.D., Gotcheva B., Dousset X., Onno B. and Ivanova I. (2000). Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, 14, 50-55.
- Todorov S.D., Nyati H., Meincken M. and Dicks L.M.T. (2007). Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*, 18, 656-664.
- Todorov S.D., Onno B., Sorokine O., Chobert J.M., Ivanova I. and Dousset X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. *Int. J. Food Microbiol.*, 48, 167-177.
- Todorov S.D., Van Reenen C.A. and Dicks, L.M.T. (2004). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50, 149-157.
- Tomita H., Fujimoto S., Tanimoto K. and Ike Y. (1996). Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.*, 178, 3585–3593.
- Tomita H., Fujimoto S., Tanimoto K. and Ike Y. (1997). Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromoneresponsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.*, 179, 7843–7855.
- Torrebranca M., Meseguer I. and Ventosa A. (1995). Bacteriocin biology. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 201-205.
- Turner D.L., Brennan L., Meyer H.H., Lohaus C., Siethoff C., Costa H.S. et al. (1999). Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic. *Eur. J. Biochem.*, 264, 833 – 839.
- Twomey D., Ross R.P., Ryan M., Meaney B. and Hill C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 165 – 185.
- Tychaczek P.S., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Vogel R.F. and Hammes W.P. (1992). Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sakei* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 460 – 468.
- Upreti G.C. and Hinsdill R.D. (1975). Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agent. Chemoth.*, 7, 139 – 145.
- van Belkum M. (1991). Lactococcal bacteriocins: genetics and mode of action. Ph. D. Thesis, University of Groningen, The Netherlands.
- van Belkum M.J. and Stiles M.E. (2000). Nonlantibiotic antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 323–365.

- van Reenen C.A., Dicks L.M.T. and Chikindas M.L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 31131–7.
- Van Reenen C.A., Van Zyl W.H., Chikindas M.L. and Dicks L.M.T. (2002). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 81, 29-40.
- Verellen T.L.J., Bruggeman G., Van Reenen C.A., Dicks L.M.T. and Vandamme E.J. (1998). Fermentation optimisation of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 174-179.
- Vignolo G., Kairuz M.N., Holgado A.R. and Oliver G. (1995). Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 5–10.
- Vignolo G., Fadda S., Kairuz M. N., Holgado A.R. and Oliver G. (1996). Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 397- 402.
- Wachsman M.B., Farías M.E., Takeda E., Sesma F., De Ruiz Holgado A.P., De Torres R.A. and Coto C.E. (1999). Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 12, 293–299.
- Wiedemann I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O., Bierbaum G., de Kruijff B. et al. (2002). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and the inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.*, 276, 1772 – 1779.
- Worobo R.W., Henkel T., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C. and Stiles M.E. (1994). Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, 140, 517–526.
- Yamamoto Y., Togawa Y., Shimosaka M. and Okazaki M. (2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5746–5753.
- Yang R., Johnson M.C. and Ray B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3355-3359.
- Yildirim Z., Avşar Y.K. and Yildirim M. (2002). Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri*. *Microb. Res.*, 157, 103-107.

Yoon Y.C., Park H.J., Lee N.K. and Paik H.D. (2005). Characterization and enhanced production of enterocin HJ35 by *Enterococcus faecium* HJ35 isolated from human skin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 296-303.

Zendo T., Eungruttanagorn N., Fujioka S., Tashiro Y., Nomura K., Sera Y., Kobayashi G., Nakayama J., Ishizaki A. and Sonomoto K. (2005) . Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1181–1190.