

# Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56

## Effect of growth conditions and culture medium composition on bacteriocin production by *Enterococcus mundtii* Tw56

Marisol Vallejo\*, Pablo Ledesma\*\*, Luciano Anselmino\*\*\*, Emilio Marguet\*\*\*\*

---

### Resumen

*Enterococcus mundtii* Tw56 es una cepa productora de bacteriocina que fue aislada del contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes* sp.). El objetivo del presente trabajo fue determinar los factores fisicoquímicos y la composición del medio de cultivo para lograr un mayor rendimiento de células viables y producción de bacteriocina. No se observaron cambios en la producción del antimicrobiano cuando la glucosa fue sustituida por fructosa o maltosa en la formulación del medio MRS. Por el contrario, la mayor actividad de las bacteriocinas se obtuvo cuando se utilizó el extracto de carne como fuente única de nitrógeno. Mientras que la máxima biomasa se alcanzó a 35 °C, las temperaturas óptimas para la producción de bacteriocina se observaron a 25 y 30 °C. El pH inicial óptimo para el crecimiento celular y bioactividad fue 6,5, ambos parámetros disminuyeron cuando la experiencia comenzó a pH 6,0 o 5,5. La formación de biomasa y la producción de bacteriocina disminuyeron en presencia de cloruro de sodio. La cepa comenzó a producir bacteriocina en la fase exponencial tardía. La actividad aumentó en función de la masa celular y alcanzó el máximo al final de la fase exponencial (12 h). Una disminución de la actividad antimicrobiana se observó en la fase estacionaria (16 h), posiblemente debido a la degradación por enzimas proteolíticas.

**Palabras clave:** *Enterococcus mundtii* Tw56, bacteriocina, factores fisicoquímicos, medio de cultivo.

### Abstract

*Enterococcus mundtii* Tw56 is a bacteriocin-producing strain that was isolated from intestinal content of silverside (*Odontesthes* sp.). The aim of the present work was to determine physicochemical factors and culture medium composition for higher yield of viable cells and bacteriocin production. No changes were observed in the antimicrobial production when glucose was replaced by fructose or maltose in the MRS medium formulation. On the other hand, highest bacteriocin activity was obtained when meat extract was used as a sole nitrogen source. While the maximum biomass was achieved at 35 °C, the optimal temperatures for bacteriocin production were observed at 25 and 30 °C. The optimal initial pH for cell growth and bioactivity was 6.5, both parameters dropped when the experience started at pH 6.0 or 5.5. Biomass formation and bacteriocin production decreased in the presence of sodium chloride. The strain started producing the bacteriocin at the late exponential phase. The activity increased as a function of the cell mass and reached the maximum at the end of exponential phase (12 h). A decrease of antimicrobial activity was observed in the stationary phase (16 h), possibly due to degradation by proteolytic enzymes.

**Key words:** *Enterococcus mundtii* Tw56, bacteriocin, physicochemical factors, culture medium.

**Recibido:** noviembre 18 de 2013      **Aprobado:** septiembre 18 de 2014

---

\* Doctora en Biología. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. soltrelew@gmail.com

\*\* Licenciado en Biología. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. reuteriar@yahoo.com

\*\*\* Estudiante de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. patxlu@hotmail.com

\*\*\*\* Doctor en Bioquímica. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. emarguet@yahoo.com.ar

## Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo bacteriano utilizado tradicionalmente en fermentaciones industriales de alimentos de origen lácteo, vegetal o cárnico (Cleveland *et al.*, 2001). Estos microorganismos contribuyen al desarrollo de aroma, sabor y textura de los productos fermentados. Sin embargo, su efecto no se limita a brindar una calidad sensorial determinada a los alimentos, sino que las BAL son también responsables de su preservación, evitando el desarrollo de microorganismos contaminantes o patógenos (O'Sullivan *et al.*, 2002). Esta propiedad particular se debe a la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana inespecífica como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo y etanol. En forma adicional, algunas cepas de BAL tienen la propiedad de sintetizar bacteriocinas, péptidos de síntesis ribosomal que actúan en forma específica sobre la membrana de bacterias filogenéticamente relacionadas (Dobson *et al.*, 2012).

Las bacteriocinas producidas por BAL están categorizadas en 3 diferentes grupos: Clase I o lantibióticos, pequeños péptidos modificados luego de la traducción que contienen aminoácidos inusuales como la lantionina; Clase II, subdividida en las subclases IIa, IIb y IIc, constituida por bacteriocinas que no sufren modificaciones luego de su síntesis y Clase III, péptidos termosensibles (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996).

Durante los últimos años se ha desarrollado un especial interés por el estudio de bacteriocinas de la clase IIa para su potencial uso en preservación de alimentos puesto que presentan actividad contra patógenos de origen alimentario como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* (Gillor *et al.*, 2008).

Dentro de las BAL, la familia *Enterococcus* exhibe una alta frecuencia de cepas productoras de bacteriocinas, especialmente de la clase IIa. Su inclusión en procesos fermentativos de alimentos no sólo responde a esta característica fisiológica, sino que además este grupo posee actividades enzimáticas degradativas que conjuntamente a la utilización de citrato, contribuyen al desarrollo de sabores y aromas típicos (Franz *et al.*, 2007).

Su utilización en alimentación humana y/o animal resulta controversial puesto que algunas especies de esta familia se encuentran relacionadas con enfermedades nosocomiales como endocarditis, bacteriemia e infecciones pélvicas, abdominales y del sistema nervioso. Sin embargo, las especies vinculadas a patologías humanas quedan limitadas a *E. faecalis* y *E. faecium* mientras que las restantes resultan agentes etiológicos infrecuentes (Sabia *et al.*, 2008).

La exigencia de alimentos naturales impuesta por los consumidores, ha inducido al estudio de bacteriocinas y de bacterias productoras. La inclusión de antimicro-

bianos naturales o de cepas bacteriocinogénicas se presenta como una alternativa viable para reemplazar a los conservantes químicos (O'Sullivan *et al.*, 2002; Settanni *et al.*, 2008).

La preservación de alimentos, utilizando producción *in situ*, o la bacteriocina purificada o semipurificada, requiere estudiar y definir la relación entre las condiciones fisicoquímicas y el nivel de síntesis con el propósito de optimizar la actividad antimicrobiana. La producción de péptidos específicos está influenciada por el pH, la temperatura, la composición del medio, la densidad celular y la fase de crecimiento (Delgado *et al.*, 2005; Aktypis *et al.*, 2007; Todorov y Dicks, 2009; Kanmani *et al.*, 2011; Metsoviti *et al.*, 2011). Algunos autores describen una asociación directa entre la densidad celular y la producción de una determinada bacteriocina, sin embargo esta relación no siempre se corresponde con el incremento de la síntesis del antimicrobiano (Avonts *et al.*, 2004, Aktypis *et al.*, 2007).

En este estudio evaluamos la influencia de la composición del medio de cultivo, la temperatura, el pH, la concentración de NaCl y la fase de crecimiento sobre la producción de bacteriocina de la cepa *E. mundtii* Tw56. Esta BAL fue aislada del contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes sp.*) y seleccionada posteriormente sobre la base de su actividad específica antilisteria (Marguet *et al.*, 2011).

## Materiales y métodos

### Microorganismo e identificación fenotípica

La cepa *Enterococcus mundtii* Tw56, aislada previamente del contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes sp.*), se obtuvo de la colección perteneciente al Laboratorio de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia). La identificación fenotípica, a nivel de género y especie, se llevó a cabo según las recomendaciones de Manero y Blanch (1999). La cepa se reactivó con sucesivos cultivos en caldo y agar De Man, Rogosa y Sharp (MRS, Biokar, Francia) y se conservó en leche descremada suplementada con glicerol al 10 % a -30 °C.

### Identificación genotípica

Luego de una incubación a 35 °C durante 12 h en caldo MRS, la cepa se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 5 min. y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mediante la reacción de PCR se amplificó el gen que codifica el ARNr 16S, con un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), usando los cebadores universales para procariotas

5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' y 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3', según lo descrito por DeLong (1992). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### **Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes**

La actividad antibacteriana se determinó luego de cultivar la cepa *E. mundtii* Tw56 según los parámetros establecidos en cada experiencia. Luego del período de incubación, el cultivo se centrifugó a 8000 g a 4 °C durante 10 min. En todos los casos el sobrenadante libre de células (SLC) se ajustó a pH 6,8 con NaOH 0,5 M (Anedra, Argentina) y se sometió a un calentamiento de 100 °C durante 5 min. Posteriormente, el SLC se filtró utilizando membranas Sartorius de 0,22 µm de diámetro de poro (Sartorius, Alemania) y se almacenó a -30 °C hasta la realización de los ensayos.

La determinación cuantitativa de la actividad de los sobrenadantes se realizó por el método de difusión en placa. Se colocaron 50 µl de diluciones sucesivas del SLC en pocillos (6 mm de diámetro) practicados en placas de agar Tripticasa Soja (Britania, Argentina), sembrados previamente con 50 µl de un cultivo (0,5 de la escala Mc Farland) de *Listeria innocua* ATCC 33090. Las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h y luego se incubaron a 30 °C durante 24 h. La actividad se definió como la recíproca de la dilución más alta que exhibió inhibición completa de la bacteria blanco en la placa inoculada y se expresó en unidades arbitrarias (AU) por mililitro de SLC. (Floriano *et al.*, 1998).

### **Evaluación de la población bacteriana**

La población bacteriana de los cultivos se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro Jenway 6400. La conversión a biomasa celular, expresada en g/L, se realizó de acuerdo a la correlación entre la DO y el peso celular seco (Delgado *et al.*, 2005).

### **Fuentes de nitrógeno y carbono**

Para determinar la influencia de las fuentes de nitrógeno y carbono sobre la producción de bacteriocinas se utilizó la fórmula del caldo MRS original introduciendo las modificaciones correspondientes. En el caso de las fuentes de nitrógeno se reemplazaron los 10 g/L de pluripeptona y 10 g/L de extracto de carne que componen originalmente la fórmula del medio citado por 20 g/L de las siguientes fuentes proteicas: bacto-peptona® (Difco), casaminoácidos® (Difco), extracto de carne (Biokar), peptona (Merck) y triptona® (Merck).

En el caso de las fuentes de carbono, los 20 g/L de glucosa del medio original se reemplazaron por igual concentración de los siguientes azúcares: fructosa (Fluka), lactosa (Fluka), sacarosa (Mallinckrodt) y maltosa (Fluka). Todas las experiencias se realizaron a 25 °C y con un pH inicial de 6,5.

### **Factores fisicoquímicos**

La influencia del pH inicial sobre la actividad de los SLC se ensayó con valores de 6,5; 6,0 y 5,5 a 25 °C. Con el mismo propósito se determinó la actividad en caldo MRS suplementado con NaCl en concentraciones de 5, 10, 20, 40, y 60 g/L a 25 °C.

La influencia de la temperatura sobre la producción de bacteriocinas se determinó en caldo MRS comercial a 20, 25, 30, 35, 40 y 45 °C.

### **Curva de crecimiento vs actividad**

Se determinó la curva de crecimiento y la actividad de la bacteriocina producida en las condiciones óptimas determinadas en los ensayos descritos, durante un período de 24 h. Se tomaron muestras en forma aséptica cada 2 h para determinar su densidad óptica (DO) a 600 nm y su actividad (UA) según lo descrito anteriormente.

### **Análisis estadístico**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado; los promedios, desvíos estándar y análisis de la varianza (ANOVA) se calcularon mediante el uso del programa estadístico HyperStat. El ANOVA se aplicó para establecer diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### **Resultados y discusión**

La identificación bioquímica de *E. mundtii* Tw56 se confirmó por identificación genotípica mediante el secuenciamiento del gen ARNr 16S y posterior comparación con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank. Las 1396 bases secuenciadas exhibieron un 100% de homología con la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa *E. mundtii* ATCC 43186.

El efecto de la temperatura sobre la producción de bacteriocina se estudió en caldo MRS comercial en un rango de 20 °C a 45 °C. Exceptuando el ensayo a 45 °C, temperatura donde no se detectó actividad, en todos los otros casos la producción pudo ser demostrada a partir de la fase logarítmica y llegando al máximo al final de la misma.

La máxima producción se logró a 25 y 30 °C (tabla 1) mientras que la máxima población se alcanzó a los 35 °C, temperatura óptima para el crecimiento de *E. mundtii*. Estos resultados demuestran que no necesariamente existe asociación entre el nivel de actividad

**Tabla 1.** Crecimiento y actividad de *E. mundtii* Tw56 en función de la temperatura, pH inicial del medio y concentración de NaCl.

Composición del medio	Actividad* (UA/mL)	Masa celular** (g/L)
MRS control ( pH inicial 6,8; 30 °C)	20.480	2,35±0,12 <sup>a</sup>
MRS-20 °C	10.240	2,23±0,06 <sup>a</sup>
MRS-25 °C	20.480	2,26±0,15 <sup>a</sup>
MRS-35 °C	5.120	2,37±0,21 <sup>a</sup>
MRS-40 °C	1.280	2,13±0,11 <sup>a</sup>
MRS-45 °C	-	1,91±0,09 <sup>b</sup>
MRS-pH 6,5	20.480	2,28±0,16 <sup>a</sup>
MRS-pH 6,0	10.240	1,99±0,11 <sup>b</sup>
MRS-pH 5,5	10.240	1,91±0,13 <sup>b</sup>
MRS- NaCl 5 g/L	10.240	2,33±0,12 <sup>a</sup>
MRS- NaCl 10 g/L	2.560	2,30±0,14 <sup>a</sup>
MRS- NaCl 20 g/L	1.280	1,88±0,23 <sup>b</sup>
MRS- NaCl 40 g/L	640	1,75±0,18 <sup>b</sup>
MRS- NaCl 60 g/L	160	1,44±0,15 <sup>b</sup>

\* Ensayo realizado por triplicado.

\*\* Valor promedio ± desvío estándar. Los superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto a los valores del control.

antibiótica y el crecimiento de la cepa (Delgado *et al.*, 2005). Un dato relevante es que a 45 °C no se detectó producción de bacteriocina, sin embargo la cepa logró altos niveles poblacionales (1,91±0,09 g/L), característica de muchas especies de enterococos. Este resultado no está de acuerdo con los exhibidos en trabajos previos que muestran sólo una disminución marcada del nivel de actividad a la temperatura citada. (Zendo *et al.*, 2005; Settanni *et al.*, 2008; Kanmani *et al.*, 2011)

Se realizaron, en forma adicional, ensayos a más bajas temperaturas y se detectó tanto crecimiento como actividad hasta 8 °C (datos no mostrados).

La variación de la actividad con respecto al pH inicial del medio de cultivo se ensayó en caldo MRS a 25 °C ajustando el pH a 6,5; 6,0 y 5,5. Los mejores resultados se lograron cuando la experiencia se realizó a partir de un pH inicial de 6,5; valor aproximado al pH original del medio (6,8). En los 2 restantes casos se obtuvieron valores menores al obtenido a pH 6,5 (tabla 1).

Estos datos coinciden con los publicados por otros autores y en consecuencia se podría afirmar que la mayor producción se logra partiendo de un medio de cultivo con valores de pH aproximados al óptimo para el crecimiento de *E. mundtii* (Kanmani *et al.*, 2001; Todorov y Dicks, 2009). Algunas experiencias realizadas

en fermentadores a pH estable (6,5-7,0) no parecen mostrar resultados promisorios. En la mayoría de los casos el descenso de pH parece estar vinculado a una mayor producción de antimicrobiano (Guerra y Pastana, 2003; Aktypis *et al.*, 2007).

La bibliografía exhibe resultados contradictorios con respecto al efecto producido por la adición de NaCl a los medios de cultivo sobre la actividad específica. Algunos autores afirman que la presencia de pequeñas concentraciones de Na<sup>+</sup> aumentaría la actividad en cepas de BAL productoras de bacteriocinas (Neyens *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2005). Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico esta afirmación no presenta argumentos aceptables; el Na<sup>+</sup> es un catión que las BAL no utilizan en sus reacciones bioquímicas (Devriese y Pot, 1995). Su presencia en medios de cultivo implica la necesidad de eliminarlo del citosol por diversos mecanismos de transporte que necesitan, en todos los casos, gasto de energía. Los resultados obtenidos en esta experiencia afirmarían esta posición: en todos los casos donde fue adicionado NaCl se produjo una disminución de la producción del antimicrobiano y a concentraciones superiores a 1 %, el descenso fue aún más marcado (tabla 1).

La selección de una adecuada fuente de carbono resulta importante para lograr una rápida duplicación celular y alcanzar una población suficiente que pueda sintetizar altos niveles de bacteriocinas. La mayor actividad se logró cuando se incluyó en la formulación fructosa o maltosa, resultados comparables con la glucosa, azúcar empleado en el medio original. La utilización de lactosa exhibió una alta población final pero con una marcada disminución de la actividad, mientras que la inclusión de sacarosa en el medio de cultivo mostró, no sólo una baja producción de bacteriocinas sino también un bajo nivel poblacional final, fenómeno que indicaría alguna dificultad en el transporte o en el metabolismo de este disacárido (tabla 2). Estos resultados coinciden con los exhibidos en trabajos previos (Settanni *et al.*, 2008; Todorov y Dicks, 2009).

Una de las claves en la optimización de la producción de bacteriocinas constituye la elección de la fuente de nitrógeno. En nuestra experiencia se reemplazaron de la fórmula original del caldo MRS los 20 g/L correspondientes a sus 2 fuentes de N (pluripeptona y extracto de carne) por igual concentración de la única fuente y manteniendo en forma constante la concentración indicada para el extracto de levadura (5g/L).

Los mejores resultados como se puede observar en la tabla 2 se obtuvieron cuando se utilizó extracto de carne como fuente de N (40.960 UA/mL), duplicando la actividad obtenida en el control. El extracto de carne es uno de los derivados proteicos más costosos, sin embargo, analizando los resultados obtenidos constituye, en este caso, una buena elección para la producción de bacteriocinas.

**Tabla 2.** Crecimiento y actividad de *E. mundtii* Tw56 en función de diferentes nutrientes.

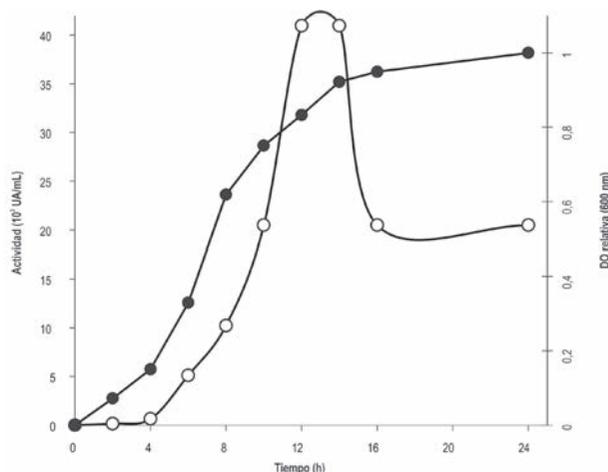
Composición del medio	Actividad* (UA/mL)	Masa celular** (g/L)
MRS control (pH inicial 6,8; 30 °C)	20.480	2,35±0,12 <sup>a</sup>
MRS-bactopectona	2.560	2,01±0,16 <sup>a</sup>
MRS-casaminoácidos	10.240	1,40±0,08 <sup>b</sup>
MRS-extracto de carne	40.960	2,48±0,07 <sup>a</sup>
MRS-peptona	5.120	1,46±0,41 <sup>b</sup>
MRS-triptona	10.240	2,32±0,18 <sup>a</sup>
MRS-fructosa	20.480	1,85±0,22 <sup>b</sup>
MRS-lactosa	2.560	2,16±0,11 <sup>a</sup>
MRS-sacarosa	5.120	0,51±0,09 <sup>b</sup>
MRS-maltosa	20.480	2,13±0,14 <sup>a</sup>

\* Ensayo realizado por triplicado.

\*\* Valor promedio ± desvío estándar. Los superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto a los valores del control.

Algunos trabajos vinculados con la producción de péptidos con capacidad antibiótica sugieren elevar la concentración de fuentes de nitrógeno para obtener niveles más altos de actividad (Kanmani *et al.*, 2011). Sin embargo, esto aumenta mucho el costo del medio de cultivo y además las altas concentraciones de derivados proteicos actúan como amortiguadores del pH impidiendo la acidificación del medio. Este efecto, como explicamos anteriormente en el caso de *E. mundtii* Tw56, disminuye la síntesis de bacteriocinas y en consecuencia no resulta recomendable.

En la figura 1 se puede observar la evolución del crecimiento de la población, expresada en DO relativa y la actividad antibiótica en función del tiempo. Para esta experiencia se cultivó la cepa en estudio utilizando en la formulación las mejores condiciones para la producción de bacteriocina: fructosa como fuente de carbono, extracto de carne como fuente de nitrógeno, se ajustó el pH a 6,5; no se adicionó NaCl y se incubó a 25 °C. La gráfica nos muestra una fase lag corta seguida por una fase logarítmica que llegó al máximo de población a las 12 h de incubación. La actividad de la bacteriocina se detectó a partir de las 6 h de incubación y llegó a su máximo a las 12 h donde alcanzó las 40.960 UA/mL. Luego de las 16 h se observó una disminución drástica de la actividad, fenómeno que coincide con lo descrito en anteriores trabajos (Todorov y Dicks, 2009; Kanmani *et al.*, 2011). La molécula de bacteriocina es un péptido muy estable en un amplio rango de pH y temperatura, en consecuencia esta disminución de la capacidad antibiótica no debería



**Figura 1:** Curva de crecimiento (●) expresada en DO relativa y actividad antimicrobiana (○) de *E. mundtii* Tw56 en función de tiempo.

atribuirse a las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo. Algunos autores indican que la inestabilidad se debe a la actividad enzimática de proteasas intracelulares inespecíficas que actuarían degradando el péptido sin embargo, esta afirmación nunca ha sido demostrada en forma fehaciente (Avonts *et al.*, 2004; Aktypis *et al.*, 2007).

## Conclusiones

La cepa *E. mundtii* Tw56, aislada del contenido intestinal de pejerrey mostró una alta actividad específica contra *L. innocua* ATCC 33090. El estudio de las variables fisicoquímicas y componentes del medio de cultivo permitió alcanzar una alta expresión de la bacteriocina, comparable con los resultados publicados por otros autores. En este caso particular, la composición óptima del medio de cultivo se logró incluyendo extracto de carne como única fuente de nitrógeno y fructuosa como única fuente de carbono en la fórmula del medio MRS. Sobre la base de esta fórmula, se estableció que las mejores condiciones para la producción de bacteriocina fueron a 25-30 °C, con un pH inicial de 6,5; en ausencia de NaCl y luego de 12 h de incubación. Estudios complementarios permitirán determinar la posibilidad de la potencial utilización de la cepa *E. mundtii* Tw56 como biopreservante en el campo de la industria alimenticia, estableciendo como condición previa, determinar la ausencia de genes vinculados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos para garantizar su inocuidad.

## Referencias bibliográficas

- Aktypis, A.; Tychowski, M.; Kalantzopoulos, G.; Aggelis, G. 2007. Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 92:207-220.

- Avonts, L.; Van Uytven, E.; De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* 14:947-955.
- Cleveland, J.; Montville, T.J.; Nes, I.F.; Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71:1-20.
- Delgado, A.; Brito, D.; Peres, C.; Noé-Arroyo, F.; Garrido-Fernández, A. 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiol.* 22:521-528.
- DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 89: 5685-5689.
- Devriese, L. A.; Pot, B. 1995. The genus *Enterococcus* en The genera of lactic acid bacteria. London, United Kingdom, Wood and Holzapfel ed. p 327-367
- Dobson, A.; Cotter, P.D.; Ross, R.P.; Hill, C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1-6.
- Floriano, B.; Ruiz-Barba, J.L.; 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4883-4890.
- Franz, C. M. A. P.; van Belkum, M.J.; Holzapfel, W.H.; Abriouel, H.; Gálvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293-310.
- Gillor, O.; Etzion, A.; Riley, M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 591-606.
- Guerra, N.P.; Pastrana, L. 2003. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 51-55.
- Kanmani, P.; Satishkumar, R.; Yuvaraj, N.; Alagesan Paari, K.; Pattukumar, V.; Venkatesan, A. 2011. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin production by an aquaculture probiotic *Enterococcus faecium* MC13 isolated from fish intestine. *Korean J. Chem. Eng.* 28:860-866.
- Klaenhammer, T.R. 1993 Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Manero, A.; Blanch, A.R. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4425-4430.
- Marguet, E.; Vallejo, M.; Sierralta Chichisola, V.; León Quispe, J. 2011. Actividad antagonista de bacterias ácido lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 45: 305-311.
- Metsoviti, M.; Paramithiotis, S.; Drosinos, E.H.; Skandamis, P.N.; Galiotou-Panayotou, M.; Papanikolaou, S. 2011. Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *New Biotech.* 28: 600-609.
- Nes, I.F.; Diep, D.B.; Havarstein, L.S.; Brurberg, M.B.; Eijsink, V.; Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 113-128.
- Neysens, P.; Messens, W.; De Vuyst, L. 2003. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.* 88:29-39.
- O'Sullivan, L.; Ross, R.P.; Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* 84: 593-604.
- Sabia, C.; Niederhausern, S.; Guerrieri, E.; Messi, P.; Anacarso, I.; Monicardi, G.; Bondi, M. 2008. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J. Appl. Microbiol.* 104: 970-979.
- Settanni, L.; Valmorri, S.; Suzzi, G.; Corsetti, A. 2008. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *Food Microbiol.* 25: 722-728.
- Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. 2009. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe.* 15:65-73.
- Zendo, T.; Eunggrutanagorn, N.; Fujioka, S.; Tashiro, Y.; Nomura, K.; Sera, Y.; Kobayashi, G.; Nakayama, J.; Ishizaki, A.; Sonomoto, K.; 2005. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1181-1190.