

# Isolation and characterization of bioactive compounds produced by lactic acid bacteria

Susana C. Ribeiro



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

Departamento de Ciências Agrárias

2016

Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, especialidade em Tecnologia Alimentar apresentada à Universidade dos Açores.

Academic thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Agricultural Sciences, Food Technology at the University of the Azores.

**Supervisor:**

Prof. Dr. Célia Costa Gomes da Silva  
Assistant Professor  
University of the Azores, Terceira, Portugal

**Co-supervisors:**

Prof. Dr Catherine Stanton  
Adjunct Professor  
University College Cork, Cork, Ireland  
Research Officer  
Teagasc-Agriculture and Food Development Authority

Prof. Dr. R. Paul Ross  
Head of College  
College of Science, Engineering and Food Science  
University College Cork, Cork, Ireland

The work described in this thesis was financially supported by National funds from FCT- ‘Fundação para a Ciência e Tecnologia’, Project PTDC/AGR-ALI/104385/2008.



PhD grant of Susana C. Ribeiro, M3.1.2/F/011/2011, was supported by:



The studies described in this thesis were performed at the Food Technology Group, Department of Agricultural Sciences, CITA – A, University of the Azores, Angra do Heroísmo, Portugal and at Teagasc -Agriculture and Food Development Authority, Cork, Ireland. CITA-A and Teagasc are also fully acknowledged.





## List of publications

This thesis is based on the following papers, which will be referred in the text by chapters.

- II. **Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese**  
Ribeiro, S.C., Coelho, M.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G.  
Journal of Applied Microbiology (2014) 116, 573-85
- III. **An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481**  
Ribeiro, S.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P., Stanton, C., Silva, C.C.G.  
International Dairy Journal (2016) 63, 18-28
- IV. **Characterization of enterocins produced by potentially probiotic strains isolated from Pico cheese and application on model fresh cheese**  
Ribeiro, S.C., Ross, R.P., Stanton, C., Silva, C.C.G.  
Submitted manuscript 2016
- V. **Conjugated Linoleic Acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from an artisanal Azorean cheese**  
Ribeiro, S.C., Stanton, C., Yang, B., Ross, R.P., Silva, C.C.G.  
Submitted manuscript 2016
- VI. **Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria isolated from traditional Pico cheese**  
Ribeiro, S.C., Stanton, C., Ross, R.P., Silva, C.C.G.  
Manuscript 2016

## Other publications by the author

### Full papers

- i. **Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria**  
Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D. International Journal of Food Microbiology (2014) 191, 53-59
- ii. **Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia**  
Jaouani, I., Abbassi, M.S, Ribeiro, S.C., Khemiri, M., Mansouri, R., L. Messadi, L., Silva, C.C.G.  
Journal of Applied Microbiology (2015) 119, 1089-100

### Proceedings

Ribeiro, S.I.C., Coelho, M.C., Dapkevicius M.L.N.E, Rosa, H.J.D., Madruga, J.S., Silva, C.C.G. (2016) Novel Probiotic fresh cheese with a lacticin 481 producer *Lactococcus lactis* strain, 13<sup>o</sup> Encontro de Química dos Alimentos, Porto, Abstract Book, C021-PP33.

Ribeiro S.I.C., Ross R.P., Stanton C., Silva C.C. (2014) Conjugated linoleic acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from an artisanal Azorean cheese. 11th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, the Netherlands, Abstract Book, B081.

Ribeiro S.I.C., Ross R.P., Stanton C., Silva C.C. (2014) Characterization of a bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from Pico cheese, 12<sup>o</sup> Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, Abstract Book, S4-PP28.

Ribeiro S.I.C., Ross R.P., Stanton C., Silva C.C. (2014) Health-promoting potential of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese, 12<sup>o</sup> Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, Abstract Book, S5-PP09.

Ribeiro S., Stanton C., Ross P., Silva C.C.G. (2013) Péptidos bioactivos em produtos lácteos Açorianos, Jornadas “Ciência nos Açores- que futuro?”, Ponta Delgada, Livro de resumos, pp 133.

Ribeiro, S., Costa, M., Dapkevicius, M.L., Silva, C.C.G. (2013). Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Enterococcus* strains isolated from a traditional Azorean cheese, SfAM Summer Conference, Cardiff, País de Gales, Reino Unido.

## ABSTRACT

Characterization of traditional cheeses, namely those with Protected Designation of Origin (PDO) status, is of extremely importance, not only for maintaining the quality of the end product, but also for economic and even ecologic reasons. These raw milk cheeses are considered a crucial source of lactic acid bacteria (LAB), genetically diversified, that can offer particular, health promoting and technological features. So, 114 LAB isolated from a traditional Azorean cheese (Pico cheese), were studied for their potential to produce bioactive compounds that can display safety and health benefits. Technological features were also evaluated, having in mind the development of functional food products and further industrial applications. The LAB isolates were firstly screened for production of antimicrobial substances, bacteriocins, against a group of pathogenic bacteria. Eight LAB strains, one *Lactococcus lactis* (L3A21M1) and seven *Enterococcus faecalis* (L2B21K3, L3B1K3, L3A21K6, L3A21K7, L3A21M3, L3A21M8, L3A1M6) were able to inhibit the growth of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* and within this group three strains also inhibited *Clostridium perfringens*. These bacteriocin producing strains were evaluated for some technologically relevant properties (Chapter II). The *E. faecalis* strain L3A21M3 displayed a good rate of acidification, while other *Enterococcus* strains presented medium/slower acidifier capacity. In contrast, *Lc. lactis* L3A21M1 was the slowest acid producer. All strains exhibited good autolytic ability, presenting 38% autolysis after 4h of incubation. Growth at different conditions of temperature and salt revealed maximum growth of strains at 30 °C and 2% of salt. One strain, *E. faecalis* L3A1M6, was positive for proteolytic activity and two strains of *E. faecalis* L3B1K3 and L3A21M3 exhibited lypolytic activity. In addition, strain *Lc. lactis* exhibited the highest level of diacetyl production. Safety evaluation showed that strain *Lc. lactis* was negative for all virulence genes while enterococci were positive for the presence of some virulence genes. Nevertheless, none of the isolates were classified as resistant to important antibiotics. Some of the eight bacteriocin-producing strains presented relevant technological properties to be used as adjunct cultures for the dairy industry.

The bacteriocin produced by strain *Lc. lactis* L3A21M1 was purified, characterized and identified (Chapter III). These strain produced a bacteriocin-like peptide with the molecular mass of 2900.23 Da, similar to lacticin 481. This bacteriocin

was heat stable, active across a wide pH range, exhibited a broad spectrum of activity and a bacteriostatic mode of action against *L. monocytogenes* both in culture media and in model cheeses. The bacteriocin-producer showed relevant probiotic features as good auto-aggregation, co-aggregation ability with *L. monocytogenes*, relatively hydrophobic and basic cell surface, low tolerance to acidic conditions, but good resistance to pancreatin and bile salts. In addition, the strain was able to reduce the adhesion of *L. monocytogenes* to Caco-2 and HT-29 cells in competition, displacement, inhibition and invasion experiments. Bacteriocins produced by *E. faecalis* strains were also characterised (Chapter IV) indicating that the activity of most enterocins were not affected by pH, heating and chemical or surfactant agents. However, *E. faecalis* strains L3A21M3 and L3A21M8 produced thermolabile enterocins. Maximum enterocin productions were observed during the stationary phase and were enhanced with some medium components. Cell-free supernatants of enterococci strains exhibited a bacteriostatic mode of action against *L. monocytogenes*. PCR amplification with specific primers indicated that strain L3A21M8 carried the gene encoding cytolysin. Probiotic studies also revealed the ability of strains to form biofilms, high hydrophobic character, and good auto-aggregation and co-aggregation capacity with *L. monocytogenes*. Acidic pH (2.5), bile and pancreatin concentrations of 0.3% and 0.1% respectively were used as stress conditions. Two strains L3A21M3 and L3B1K3 presented the higher survival rate under these conditions. All strains were able to adhere to all intestinal cells tested (Caco-2 and HT-29 cells). Moreover, all strains presented a high capacity to interfere with the adhesion and invasion of *L. monocytogenes* to Caco-2 and HT-29 cells. The enterocin produced by *E. faecalis* L3B1K3 was partially purified and applied to model cheeses contaminated with *L. monocytogenes*. The semi-purified enterocin reduced survival of *Listeria* on fresh cheeses in a dose dependent manner. Furthermore, the highest dose tested (2048 AU/g cheese) was effective to reduce *Listeria* counts to undetected values throughout storage (6 to 72 h).

The ability to convert free linoleic acid to conjugated linoleic acid (CLA) was also evaluated among LAB strains isolated from Pico cheese (Chapter V). Two strains of *Lactobacillus plantarum* (L2C21E8 and L3C1E8) were recognized as potential CLA producers. Further analysis of CLA isomers by gas chromatography identified C18:2 *cis*-9, *trans*-11 as the mainly produced isomer (8-10 µg/mL) followed by C18:2 *trans*-9, *trans*-11 isomer (4-6 µg/mL). Assessment of probiotic features of these strains demonstrated strong biofilm capacity, high cell surface hydrophobicity, as well as good



auto-aggregation ability. Moreover, strains were capable of surviving to bile salts (0.3%) and pancreatin (0.1%), but only the highest CLA producer strain (L3C1E8), was able to resist to low pH (2.5) after 2 h. These strains were also able to adhere to intestinal human cells (Caco-2 and HT-29 cells) and interfere in the adhesion of *Escherichia coli* to HT-29 cells, preventing colonization of this bacteria. In addition, these two CLA producers were also shown to produce high amounts of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA, >400 mg/L), along with other five strains (*Lactobacillus paracasei* L3B21R2, L3B21K4, L3C21M6, L3C1R1 and *Lb. plantarum* L2A21R1, Chapter VI).

Overall, the present work demonstrated the potential of several LAB strains isolated from Pico cheese to produce bioactive compounds with high potential to be use in the development of functional foods.



## RESUMO

A caracterização de queijos tradicionais, em especial os de denominação de origem protegida, é extremamente importante, não só para a obtenção do produto final desejável, mas também de um ponto de vista económico e até ecológico. Estes queijos fabricados com leite cru são uma fonte crucial de bactérias do ácido láctico (BAL) geneticamente diversificada, que podem apresentar características promotoras de saúde e tecnológicas relevantes. Desta forma, 114 BAL isoladas de um queijo tradicional Açoriano (queijo do Pico) foram avaliadas pelo seu potencial em produzir compostos bioativos que podem ser benéficos para a saúde e para a segurança do produto final. As características tecnológicas destes isolados foram igualmente estudadas, tendo em mente o desenvolvimento de produtos funcionais com aplicações industriais. Os isolados de BAL foram primeiramente analisados pela sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, bacteriocinas, contra várias bactérias patogénicas. Oito estirpes de BAL, um *Lactococcus lactis* (L3A21M1) e sete *Enterococcus faecalis* (L2B21K3, L3B1K3, L3A21K6, L3A21K7, L3A21M3, L3A21M8, L3A1M6) apresentaram a capacidade de inibir o crescimento da bactéria patogénica *Listeria monocytogenes* e, dentro deste grupo, três estirpes foram ainda capazes de inibir a bactéria *Clostridium perfringens*. Estas estirpes produtoras de bacteriocinas foram também avaliadas tecnologicamente (Capítulo II). A estirpe *E. faecalis* L3A21M3 apresentou boa capacidade acidificante, enquanto que as outras estirpes de *Enterococcus* apresentaram uma capacidade acidificante mais reduzida. Em contraste, a estirpe *Lc. lactis* L3A21M1 foi a que apresentou menor capacidade acidificante. Todas as estirpes apresentaram boa capacidade autolítica, apresentando 38% de autólise ao fim de apenas 4h de incubação. No estudo do crescimento a diferentes condições de temperatura e sal observou-se que as estirpes apresentaram crescimento máximo a 30 °C e 2 % de sal. Uma estirpe, *E. faecalis* L3A1M6, apresentou atividade proteolítica enquanto que duas estirpes de *E. faecalis* L3B1K3 e L3A21M3 foram positivas para atividade lipolítica. A estirpe *Lc. lactis* foi a que apresentou um nível mais elevado de produção de diacetilo. Na avaliação da segurança a estirpe *Lc. lactis* apresentou testes negativos para todos os genes de virulência estudados enquanto que os enterococci revelaram a presença de alguns dos genes de virulência. No entanto, nenhuma estirpe apresentou resistência aos antibióticos mais relevantes testados. Desta forma, algumas das oito estirpes produtoras de bacteriocinas estudadas apresentaram

características tecnológicas interessantes para a sua aplicação como culturas adjuvantes, na indústria de laticínios.

A bacteriocina produzida pela estirpe *Lc. lactis* L3A21M1 foi purificada, identificada e caracterizada (Capítulo III). Esta estirpe produziu um péptido de massa molecular de 2900,23 Da, semelhante à bacteriocina lacticina 481. Esta bacteriocina era termo-estável, ativa num grande intervalo de valores de pH, apresentava um largo espectro de atividade e um modo de ação bacteriostático contra a *L. monocytogenes*, tanto em meio de cultura, como em queijo fresco. A estirpe produtora da bacteriocina apresentou propriedades probióticas relevantes, como boa capacidade de auto-agregação, boa capacidade de co-agregação com a *L. monocytogenes*, uma superfície celular relativamente hidrofóbica, baixa tolerância a condições acídicas, mas boa resistência à pancreatina e ácidos biliares. Esta estirpe foi ainda capaz de reduzir a adesão da *L. monocytogenes* às células intestinais Caco-2 e HT-29 em ensaios de competição, deslocamento, inibição e invasão.

As bacteriocinas produzidas pelas estirpes *E. faecalis* também foram caracterizadas (Capítulo IV). A maioria das enterocinas não foram afetadas pelo pH, temperatura e pelos agentes tensioativos e compostos orgânicos testados. No entanto, as estirpes *E. faecalis* L3A21M3 e L3A21M8 produziram enterocinas termolábeis. A máxima produção de enterocinas foi observada durante a fase estacionária, sendo esta produção estimulada por alguns componentes do meio. Os sobrenadantes livres de células das estirpes de *Enterococcus* apresentaram um modo de ação bacteriostático contra a *L. monocytogenes*. A amplificação por PCR utilizando primers específicos, revelou que a estirpe L3A21M8 apresentava o gene responsável pela citolisina. No estudo das propriedades probióticas, estas estirpes demonstraram uma boa capacidade em formar biofilmes, carácter hidrofóbico elevado, bem como boa capacidade de auto-agregação e co-agregação com a *L. monocytogenes*. Duas estirpes, L3A21M3 e L3B1K3, apresentaram uma elevada taxa de sobrevivência em condições acídicas (pH=2,5), bem como na presença de ácidos biliares (0.3%) e pancreatina (0.1%). Todas as estirpes apresentaram capacidade de aderir as células intestinais (Caco-2 e HT-29), além de apresentarem elevada capacidade para interferir na adesão e invasão da *L. monocytogenes*. A enterocina produzida pela estirpe *E. faecalis* L3B1K3 foi parcialmente purificada e aplicada em queijos modelo contaminados com *L. monocytogenes*. A enterocina purificada reduziu as contagens de *Listeria* em queijo fresco, de uma forma dependente da concentração. Além disso, a concentração mais elevada de enterocina

testada (2048 UA/g queijo) foi capaz de reduzir as contagens de *Listeria* para níveis indetetáveis, durante o tempo de armazenamento (6 a 72h).

A capacidade em converter ácido linoleico livre em ácido linoleico conjugado (CLA) foi também avaliada nos isolados de BAL do queijo do Pico (Capítulo V). Duas estirpes de *Lactobacillus plantarum* (L2C21E8 e L3C1E8) foram identificadas como potenciais produtoras de CLA. A análise por cromatografia gasosa revelou a produção maioritária dos isômeros de CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (8-10 µg/mL), seguida do isômero C18:2 *trans*-9, *trans*-11 (4-6 µg/mL). O estudo de propriedades probióticas destas estirpes produtoras de CLA, demonstrou uma elevada capacidade para formar biofilmes, alta hidrofobicidade da superfície celular, assim como boa capacidade de auto-agregação. Para além disso, estas estirpes foram capazes de sobreviver a 0.3% de ácidos biliares e 0.1% de pancreatina, mas apenas a estirpe L3C1E8 foi capaz de resistir ao baixo pH testado (2,5), após 2h. Estas estirpes apresentaram boa adesão às células intestinais (Caco-2 e HT-29), bem como a capacidade de interferir na adesão da *Escherichia coli* às células HT-29, prevenindo assim a colonização por esta bactéria. Estas estirpes produtoras de CLA demonstraram também a capacidade em produzir elevadas quantidades de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, >400 mg/L), assim como cinco outras estirpes de BAL (*Lactobacillus paracasei* L3B21R2, L3B21K4, L3C21M6, L3C1R1 e *Lb. plantarum* L2A21R1, Capítulo VI).

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou o potencial de algumas estirpes de BAL isoladas do queijo do Pico, em produzir compostos bioactivos com relevância para serem utilizados no desenvolvimento de produtos alimentares funcionais.



## Table of contents

ABSTRACT.....	vii
RESUMO.....	xi

### Chapter I: General Introduction

1.1 Pico cheese.....	1
1.2 General characteristics of lactic acid bacteria.....	2
1.3 Bioactive compounds produce by lactic acid bacteria.....	3
1.3.1 Bacteriocins.....	3
1.3.1.1 Class I.....	3
1.3.1.2 Class II.....	6
1.3.1.3 Class III.....	6
1.3.1.4 Biosynthesis and immunity of lactic acid bacteria bacteriocins.....	7
1.3.1.5 Mode of action.....	7
1.3.1.6 Application of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.....	9
1.3.2 Conjugated linoleic acid (CLA).....	11
1.3.2.1 Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid.....	12
1.3.2.2 Mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers.....	12
1.3.2.3 Application of conjugated linoleic acid producing strains.....	13
1.3.3 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA).....	14
1.3.3.1 Application of GABA-producing strains.....	15
1.3.3.2 Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides.....	15
1.3.4.3 Application of LAB producing ACE inhibitory peptides.....	16
1.4 LAB as probiotics.....	17
1.5 Objectives.....	18
References.....	19

### Chapter II: Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese

Abstract.....	31
2.1 Introduction.....	32
2.2 Materials and Methods.....	33
2.3 Results.....	40
2.4 Discussion.....	46
References.....	52

<b>Chapter III: An anti-listerial <i>Lactococcus lactis</i> strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481</b>	
Abstract.....	57
3.1 Introduction.....	57
3.2 Materials and Methods.....	59
3.3 Results and Discussion.....	68
3.4 Conclusions.....	81
References.....	81
<b>Chapter IV: Characterization of enterocins produced by potential probiotic strains isolated from Pico cheese and application on model fresh cheese</b>	
Abstract.....	89
4.1 Introduction.....	90
4.2 Materials and Methods.....	91
4.3 Results and Discussion.....	99
4.4 Conclusions.....	116
References.....	117
<b>Chapter V: Conjugated Linoleic Acid production and probiotic assessment of <i>Lactobacillus plantarum</i> strains isolated from an artisanal Azorean cheese</b>	
Abstract.....	125
5.1 Introduction.....	126
5.2 Materials and Methods.....	127
5.3 Results.....	132
5.4 Discussion.....	139
5.5 Conclusions.....	142
References.....	143
<b>Chapter VI: Production of <math>\gamma</math>-aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria isolated from traditional Pico cheese</b>	
Abstract.....	149
6.1 Introduction.....	149
6.2 Materials and Methods.....	150
6.3 Results and Discussion.....	151
6.4 Conclusions.....	152
References.....	153
<b>Chapter VII: General Conclusions.....</b>	<b>155</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>158</b>