

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DA BACTERIOCINA CEREÍNA 8A PRODUZIDA PELO

Bacillus cereus 8A

Tese de Doutorado

ROSIELE LAPPE

Porto Alegre, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DA BACTERIOCINA CEREÍNA 8A PRODUZIDA PELO
***Bacillus cereus* 8A**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

ROSIELE LAPPE
Farmacêutica-Bioquímica
Orientador: Dr. Adriano Brandelli

Setembro, 2009

**Este trabalho foi desenvolvido no
Laboratório de Bioquímica e
Microbiologia Aplicada do Instituto de
Ciência e Tecnologia de Alimentos da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por ter me dado força e coragem para persistir em meus objetivos até mesmo diante das maiores dificuldades.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Brandelli, pela paciência, compreensão e dedicada orientação. Obrigada pela oportunidade de aprendizado e pelo exemplo de profissionalismo e dignidade que será levado para a vida toda.

Também agradeço a todos do laboratório 218 do ICTA, por tornarem os momentos de trabalho mais leves e divertidos. Em especial, ao Voltaire pela ajuda fundamental nos meus trabalhos e pela amizade e à Ana Paula Corrêa e a Fernanda Leães, a quem eu tenho muito carinho.

Agradeço especialmente a duas queridas amigas, Amanda e Florencia, pela amizade, carinho e pela ajuda nos meus trabalhos.

Agradeço a todos os professores e funcionários do ICTA-UFRGS que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho.

Agradeço ao PPGBCM e seus professores pela oportunidade concedida.

Agradeço a Sílvia e ao Luciano por estarem sempre dispostos a ajudar.

Quero agradecer de forma muito especial ao meu noivo, Roberto, que entrou na minha vida quando esta caminhada já havia se iniciado e, desde então, esteve sempre ao meu lado, incentivando, dando forças e fazendo tudo parecer mais fácil.

À minha família, deixei os agradecimentos para o final, pois não encontro palavras para expressar o quanto lhes sou grata. Vocês são tudo para mim e nenhuma palavra conseguiria dizer de forma justa tudo o que eu sinto.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivo e Tereza, a quem declaro o meu imenso amor e gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS -----	10
LISTA DE FIGURAS -----	11
LISTA DE TABELAS -----	13
RESUMO -----	14
ABSTRACT -----	16
1. INTRODUÇÃO -----	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	21
2.1 Bacteriocinas -----	21
2.2 Origem e descoberta das bacteriocinas -----	22
2.3 Características e classificação das bacteriocinas -----	23
2.4 Biossíntese das bacteriocinas -----	24
2.5 Uso das bacteriocinas na biopreservação dos alimentos -----	27
2.6 Mecanismo e espectro de ação das bacteriocinas -----	29
2.7 Bacteriocinas produzidas por espécies de Bacillus -----	31
2.8 <i>Bacillus cereus</i> -----	33
2.9 Purificação de bacteriocinas -----	34
2.9.1 Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas -----	36
2.10 Inativação térmica de proteínas -----	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	43
3.1 ARTIGO 1 -----	45

Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A.

3.1.1	Abstract	45
3.1.2	Introduction	47
3.1.3	Theory	48
3.1.4	Materials and methods	51
3.1.4.1	Reagents and media	51
3.1.4.2	Bacterial cultures	51
3.1.4.3	Bacteriocin production	51
3.1.4.4	Bacteriocin activity assay	52
3.1.4.5	Thermal inactivation	52
3.1.4.6	Data analysis	53
3.1.5	Results and discussion	53
3.1.6	Conclusions	56
3.1.7	Resumo	57
3.1.8	References	58
3.2	ARTIGO 2	67
	Inhibition of <i>Salmonella</i> Enteritidis by cerein 8A and chelating agents	
4.2.1	Abstract	67
4.2.2	Introduction	68
4.2.3	Materials and methods	70
4.2.3.1	Bacterials strains	70
4.2.3.2	Bacteriocin preparation and activity	70
4.2.3.3	Chelators	71
4.2.3.4	Growth determination	71

4.2.3.5	Effect of cerein 8A and chelators against the <i>Salmonella</i> Enteritidis-----	71
4.2.3.6	Transmission electron microscopy-----	72
4.2.4	Results-----	72
4.2.5	Discussion-----	74
4.2.6	Resumo-----	78
4.2.7	References-----	79
4.3	ARTIGO 3-----	86
	Extraction of the antimicrobial peptide cerein 8A by aqueous two-phase systems and aqueous two-phase micellar systems	
4.3.1	Abstract-----	86
4.3.2	Introduction-----	87
4.3.3	Materials and methods-----	89
4.3.3.1	Bacteria-----	89
4.3.3.2	Bacteriocin preparation and protein assay-----	89
4.3.3.3	Detection of antimicrobial activity-----	90
4.3.3.4	Purification protocol-----	90
4.3.3.5	Aqueous two-phase system preparation-----	91
4.3.3.6	Partitioning by ATPS-----	91
4.3.3.7	Partitioning of cerein 8A in Triton-X114 aqueous two-phase micellar systems-----	92
4.3.3.8	Determination of Triton-X114 influence in cerein 8A activity-----	92
4.3.4	Results-----	93
4.3.5	Discussion-----	95

4.3.6	Resumo-----	98
4.3.7	References-----	99
4	DISCUSSÃO GERAL-----	109
5	CONCLUSÕES-----	116
6	BIBLIOGRAFIA-----	117
7	ANEXO 1-----	124
8	ANEXO 2-----	125
9	ANEXO 3-----	126

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

AU: Unidades Arbitrárias

ATPS: Sistema aquoso bifásico

BLS: Substância tipo-bacteriocina

μL: Microlitro

mL: Mililitro

μg: Micrograma

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução

rpm: Rotações por minuto

Da: Dalton

kDa: Quilodaltons

M: Molar

min: Minuto

mM: Milimolar

mm: Milímetro

EDTA: Ácido etilenodiamino-tetraacético

FDA: *Food and Drug Administration*

GRAS: *Generally Regarded as Safe*

K: coeficiente de partição

LISTA DE FIGURAS

3.1 Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A.

Figure 1. Thermal inactivation kinetic of cerein 8A at 70°C, 75°C , 77°C ,80°C, 82°C-----62

Figure 2. Variation of the decimal reduction time (*D*) with temperature for cerein 8A-----63

Figure 3. Arrhenius plot of inactivation rates of cerein 8A-----64

3.3 Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A and chelating agents.

Figure 1. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A and chelators-----82

Figure 2. Effect of cerein 8A and chelators on viability of *Salmonella* Enteritidis-----82

Figure 3. Transmission electron microscopy of cells of *Salmonella* Enteritidis after treatments-----82

3.3 Extraction of the antimicrobial peptide cerein 8A by aqueous two-phase systems and aqueous two-phase micellar systems

- Figure 1.** Partition coefficients of cerein 8A in PEG-salt systems and effect of ionic strength on the partitioning of cerein 8A by ATPS by adding NaCl-----**103**
- Figure 2.** Comparison of cerein 8A activity in different concentrations of Triton X-114-----**103**
- Figure 3.** Distribution of cerein 8A activity among micelle-rich phase and micelle-poor phase-----**103**
- Figure 4.** Partition coefficients (K_{cer}) of cerein 8A in aqueous two-phase micellar systems with Triton X-114-----**103**

LISTA DE TABELAS

3.1 Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A.

Table 1. Kinetics parameters of thermal inactivation of cerein 8A-----66

Table 2. Thermodynamic parameter values of thermal inactivation of cerein 8A activity-----66

3.2 Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A and chelating agents.

Table 1. Reduction of viable counts of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A in combination with chelating agents-----85

9.1 Extraction of the antimicrobial peptide cerein 8A by aqueous two-phase systems and aqueous two-phase micellar systems.

Table 1. Summary of purification protocol of cerein 8A-----107

Table 2. Antimicrobial activity and yield recovery in the upper phase in systems PEG-salts-----107

Table 3. Antimicrobial activity and yield recovery in the micellar-rich phase in two-phase micellar systems with Triton X-114-----108

Table 4. Comparison of cerein 8A isolation by conventional purification protocol,
ATPS and micellar system-----**108**

CARACTERIZAÇÃO DA BACTERIOCINA CEREÍNA 8A PRODUZIDA POR UMA LINHAGEM DE *Bacillus cereus*

Autor: Rosiele Lappe

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Bacillus cereus 8A, isolado de solo da região sul do Brasil, produz uma bacteriocina, cereína 8A, que apresenta potencial para utilização como bioconservante no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Neste trabalho foram realizados estudos de caracterização e otimização no processo de obtenção da cereína semi-purificada. Na primeira etapa do trabalho foi estudada a cinética de inativação térmica para a cereína 8A. Amostras da bacteriocina foram tratadas em diferentes combinações de tempo/temperatura no intervalo de 0-30min. e 70-82°C e os parâmetros termodinâmicos e cinéticos para a inativação da cereína 8A foram calculados. Os resultados revelaram que a inativação segue uma reação de primeira ordem com valores de k entre 0.059 e 0.235 min⁻¹. A diminuição e o aumento dos valores de D e k, respectivamente, com o aumento da temperatura, indicaram uma rápida inativação de bacteriocina a temperaturas mais elevadas. Os resultados sugerem que a cereína 8A é uma bacteriocina relativamente termoestável com um valor de z de 21.98°C e energia de ativação de 105.7 kJ mol⁻¹. Em um segundo momento, a capacidade dos quelantes EDTA e lactato de sódio em diferentes concentrações e da cereína 8A (3200 UA/ml⁻¹) em inibir e inativar a *Salmonella* Enteritidis foram analisadas. Os resultados indicaram que todos os tratamentos testados, EDTA, lactato de sódio e cereína 8A, sozinhos e em combinação, causaram uma redução significativa nos valores de OD₆₀₀ em culturas de *S. Enteritidis*. A combinação de cerein 8A acrescido EDTA 100 mol l⁻¹ resultou em um tratamento mais eficaz para reduzir o número de células viáveis de *S. enteritidis*. A microscopia de eletrônica de transmissão revelou paredes de células danificadas e perda de materiais protoplasmáticos nas células tratadas. As células de *S. enteritidis* tratadas com 8A cereína sozinha mostraram pequenos poros e o tratamento não afetou a maioria das células. Quando o agente quelante EDTA foi adicionado, as células mostraram-se mais danificadas. As lesões na parede celular tornaram-se mais intensas com a combinação de cereína 8A acrescida de EDTA, inclusive demonstrando uma notável perda do material intracelular, como observado nos resultados dos tratamentos com EDTA 50 e 100 mmol l⁻¹ mais cereína 8A. A última etapa deste estudo investigou o particionamento da cereína 8A em dois sistemas de extração líquido-líquido, um com Triton X-114 e outro PEG com sais inorgânicos, que são considerados promissores para fins de bioseparação e depuração. Os resultados indicaram que cereína 8A particiona preferencialmente na fase rica em micela no sistema com Triton X-114 na concentração de 4 % e sua atividade antimicrobiana foi preservado. Em ATPS, os melhores resultados foram relativos ao coeficiente de partição obtidos com PEG e sulfato de amônio, quando o

cloreto de sódio foi adicionado, o valor do K_b aumentou significativamente e mostrou o melhor rendimento de recuperação quando comparado com o sistema micelar. A purificação convencional resulta em um fator de purificação superior, mas em uma recuperação menor em comparação com métodos de particionamento. Estes resultados representam um importante passo no sentido de desenvolver um método de separação para cereína 8A e de um modo mais geral, para outras biomoléculas de interesse.

**CHARACTERIZATION OF THE BACTERIOCIN CEREIN 8A PRODUCED
BY A STRAIN OF *Bacillus cereus***

Author: Rosiele Lappe

Advisor: Adriano Brandelli

ABSTRACT

The bacteriocin cerein 8A, produced by a strain of *B. cereus* 8A, isolated from soil of south of Brazil with potential application against food spoilage and pathogenic bacteria. At the first phase of the study, the kinetics of thermal inactivation was studied for the bacteriocin cerein 8A. Samples of cerein 8A were treated at different time-temperature combinations in the range of 0-30 min and 70-82°C and the thermodynamic and kinetic parameters for bacteriocin inactivation were calculated. Results showed that inactivation followed a first-order reaction with k -values between 0.059 and 0.235 min⁻¹. D - and k -values decreased and increased, respectively, with increasing temperature, indicating a faster bacteriocin inactivation at higher temperatures. Results suggest that cerein 8A is a relatively thermostable bacteriocin with a z -value of 21.98 °C and E_a of 105.7 kJ mol⁻¹. In a second time, the ability of chelators EDTA and sodium lactate on different concentrations and cerein 8A (3200 UA/ml⁻¹) to inhibit and inactivate *Salmonella* Enteritidis was investigated. The results indicated that all treatments tested, namely EDTA, sodium lactate and cerein 8A, alone and in combination, caused a significant reduction in the OD₆₀₀ values of *S. Enteritidis* cultures. The addition of bacteriocin plus EDTA resulted in higher inhibition in comparison with the bacteriocin alone; the greater the concentration of EDTA, the greater the inhibitory effect. Transmission electron microscopy showed damaged cell walls and loss of protoplasmic material in treated cells. The cells of *S. Enteritidis* treated with cerein 8A alone showed small pores and the treatment does not affect the majority of cells. When the chelating agent EDTA was added the cells appeared more damaged. The injuries in cell wall become more marked with the combination of EDTA plus cerein 8A, including noticeable discharge of intracellular material, as shown for treatments with 50 and 100 mmol l⁻¹ EDTA plus cerein 8A. The last step of this study investigated the partitioning of cerein 8A in two liquid-liquid extraction systems that are considered promising for bioseparation and purification purposes. In aqueous two phase micellar systems Triton X-114 was chosen as the phase-forming surfactant. Aqueous two-phase systems were prepared of PEG and inorganic salts and the addition of sodium chloride was investigated in this system. Results indicated that cerein 8A partitions preferentially to the micelle rich-phase in the system with 4% Triton X-114 concentration and its antimicrobial activity was preserved. In ATPS, the best results concerning to the partition coefficients (K_b) were obtained with PEG + ammonium sulphate, when sodium chloride was added the value of K_b increase significantly and showed the best recovery yield when compared with micellar systems. The conventional purification results a higher purification fold, but a minor recovery in

comparison with partitioning methods. The successful implementation of this peptide partitioning, from a suspension containing other compounds, represents an important step towards developing a separation method for cerein 8A, and more generally, for other biomolecules of interest.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas têm-se apresentado novos desafios para as indústrias farmacêuticas e de alimentos no que se refere ao combate a microrganismos patogênicos e deteriorantes.

O desenvolvimento e a proliferação de bactérias resistentes a antibióticos, que diminuem as opções terapêuticas, tem se tornado um grave problema de saúde no mundo todo. A rápida escalada da resistência microbiana pode fazer com que algumas infecções bacterianas não possam ser tratadas com os agentes antimicrobianos existentes. Esforços a nível mundial para estudar e contornar este problema vêm sendo realizados há anos. Dentre as soluções, está o uso mais racional dos antibióticos e a descoberta de novos antimicrobianos.

É notório que alimentos industrializados ou não, possam conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos, que podem interferir em sua vida útil ou causarem doenças. Existem inúmeros recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar o seu desenvolvimento nos alimentos, incluindo tratamento térmico, adição de conservantes químicos, uso de baixa temperatura durante o armazenamento, entre outros. No entanto, a cada dia aumenta a procura por alimentos naturais, que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de processamento industrial ou que sejam minimamente processados e que não sejam adicionados de produtos químicos. Portanto, a busca por novos aditivos, que possam controlar estes microrganismos, é de suma importância e, devido ao avanço da biotecnologia, a utilização de bacteriocinas surge como uma nova alternativa na preservação dos alimentos e tem sido um assunto amplamente estudado.

As bacteriocinas apresentam um potencial uso na indústria de alimentos, além de serem apontadas por estudos que indicam seu uso no controle de infecções em humanos, animais e vegetais. Estas substâncias constituem um grupo heterogêneo de proteínas que variam muito quanto ao seu espectro antimicrobiano, propriedades bioquímicas, mecanismo de ação e características genéticas. A atividade antimicrobiana e a estrutura protéica provavelmente sejam as únicas características comuns a todas bacteriocinas.

Além do interesse no estudo das bacteriocinas como potenciais conservadores de alimentos, existe ainda o interesse de pesquisa sobre esses compostos devido a sua potencial aplicação como estratégia como prevenção de certas doenças infecciosas. O desenvolvimento de novos antimicrobianos é assunto de interesse devido ao aumento de prevalência de bactérias resistentes resultantes do extensivo uso de antibióticos.

Portanto, é necessário que os estudos e pesquisas se ampliem nesta área para determinar a eficácia de microrganismos produtores de bacteriocinas e, principalmente, verificar o comportamento dessas substâncias purificadas, sob condições normais de comercialização e em alimentos, além de estudos toxicológicos e avaliação de sua potencialidade farmacológica.

Dentro deste contexto, este trabalho propõe caracterizar uma bacteriocina com grande potencial antimicrobiano e/ou biopreservativo sobre alimentos nos aspectos de resistência térmica, atividade antimicrobiana e mecanismo de ação, bem como seu coeficiente de partição em diferentes sistemas.

Especificamente, os objetivos desse trabalho foram:

1. Determinar a cinética e termodinâmica de inativação térmica da cereína 8A produzida pelo *Bacillus cereus* 8A;
2. Estudar a atividade e o mecanismo de ação da cereína 8A frente a microrganismos Gram-negativos e/ou a adição de quelantes como potencializadores do efeito antimicrobiano;
3. Determinar o coeficiente de partição da bacteriocina em sistema aquoso bifásico e em sistema micelar bifásico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bacteriocinas

As bacteriocinas são definidas como substâncias bactericidas, antibióticos de natureza protéica altamente específicos, não multiplicáveis, sintetizados por algumas linhagens bacterianas com ação contra isolados das mesmas espécies, ou sobre outros organismos estritamente relacionados com a espécie produtora (TAGG *et al.*, 1976; SANTOS *et al.*, 1994; RILEY, 1998; RILEY, GORDON, 1999; MARINGONI, KUROZAWA, 2002).

O termo substância tipo-bacteriocina (*bacteriocin-like*) aplica-se apenas aos compostos antimicrobianos de natureza protéica, que ainda não estão completamente definidos ou não cumprem com todas as características das bacteriocinas. Essas substâncias, geralmente, possuem um maior espectro de ação do que a definição clássica de bacteriocinas, atuando contra uma variedade de bactérias gram-positivas, algumas gram-negativas e até contra alguns fungos (DE VUYST, VANDAMME, 1994).

Dessa forma, toda bacteriocina ou substância tipo-bacteriocina tem uma proteína ou um peptídeo que é essencial para sua função bactericida. A maioria das bacteriocinas descritas até o momento tem um baixo peso molecular e são estáveis ao calor. Estas características, essencialmente, as diferenciam de alguns antibióticos, considerados metabólitos secundários, que são inibidores de crescimento bacteriano, quando presentes em relativamente baixas concentrações (REEVES, 1965).

2.2 Origem e Descoberta das Bacteriocinas

Pasteur e Joubert por volta do ano de 1877 foram os primeiros a reportar uma interação antagonista entre bactérias, ao observar que uma “bactéria comum”, provavelmente *E. coli*, podia interferir no crescimento de *Bacillus anthracis*, quando inoculados conjuntamente. Em decorrência disso, houve uma intensa procura por uma bactéria de baixa patogenicidade que pudesse ser usada na prevenção contra outros patógenos. Vários antagonistas do crescimento de *Bacillus anthracis* foram reportados no início do século (REEVES, 1965).

Também nesta época surgiram várias propostas de terapias de reposição para modificar a microbiota intestinal. Diversas tentativas foram realizadas com o uso de bactérias produtoras de ácido lático e de algumas linhagens de *E. coli* capazes de destruir especialmente *Salmonella typhi*. Em meados do ano de 1916, chegou-se a distribuir comercialmente uma linhagem de *E. coli* (Mutaflor) para o tratamento da disenteria, porém sem apresentar a efetividade esperada e, sobretudo, sem uma identificação da natureza da substância envolvida, esse tratamento foi imediatamente descartado (JACOB *et al.* 1953).

Em 1925, o cientista belga Andrei Gratia observou que algumas linhagens de *Escherichia coli* liberavam uma substância que aparentava um estado de antagonismo sobre outras colônias do mesmo organismo. Estudos posteriores definiram uma série de 20 proteínas com efeito inibidor, que foram denominadas de colicinas. Ele demonstrou que a linhagem V de *E. coli* produzia em meio líquido uma substância dialisável e resistente ao calor capaz de inibir o crescimento de outros coliformes. Esta substância foi posteriormente

denominada de colicina V. Nos anos seguintes, surgiram novas observações de que antimicrobianos do tipo colicina também podiam ser produzidos por outras bactérias, e não exclusivamente pelos coliformes. Assim, em 1953, Jacob *et al.* introduziram o termo mais genérico de bacteriocinas para as proteínas antibióticas do tipo colicina.

Até pouco tempo, a maioria dos progressos nas pesquisas das bacteriocinas limitavam-se às investigações das colicinas (bacteriocinas produzidas por vários membros da família *Enterobacteriaceae*). Mas, atualmente tem havido uma intensa atividade de pesquisa das bacteriocinas e das substâncias *bacteriocin-like* de bactérias gram-positivas, sobretudo das bactérias ácido-láticas (REEVES, 1965, DE VUYST & VANDAMME, 1994 e RILEY & GORDON, 1999).

2.3 Características e Classificação das Bacteriocinas

De acordo com DE VUYST & VANDAMME (1994) e MCAULIFFE *et al.* (2001), são descritas as subseqüentes classes de bacteriocinas sintetizadas por diferentes bactérias e, principalmente, pelas bactérias ácido-láticas, com base na seqüência de peptídeos e pré-peptídeos:

- a) Classe I: composta pelos lantibióticos, como a nisina, são bacteriocinas que contêm o aminoácido modificado lantionina. Possuem um peso molecular menor que 5 kDa.
- b) Classe II: denominada de não-lantibióticos, por não possuírem lantionina na sua molécula, são pequenos, compostos por 10-30 aminoácidos, apresentam um peso molecular até 10 kDa e são resistentes ao calor (leucocina A). Esta

categoria se subdivide em três outras classes, bem distintas, sendo principalmente produzidas por bactérias láticas.

IIa) Bacteriocinas semelhantes à pediocina, com forte atividade contra *Listeria* spp;

IIb) Bacteriocinas constituídas por dois peptídeos que possuem atividades complementares (Ex.: lactococina G e lacticina);

IIc) Bacteriocinas formadas por peptídeos ativadas por grupos tióis que necessitam resíduos de cisteína para apresentarem ação, como a acidocina B.

c) Classe III: proteínas termo-sensíveis e de peso molecular acima de 30 kDa.

d) Classe IV: inclui os compostos indefinidos de bacteriocinas, envolvendo proteínas associadas a lipídeos e/ou carboidratos.

2.4 Biossíntese das Bacteriocinas

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, em geral, são sintetizadas na forma de pró-peptídeos, dos quais o peptídeo líder é posteriormente separado para formar a molécula protéica biologicamente ativa (JACK *et al.*, 1995). HOFLACK *et al.* (1999) evidenciam que, em alguns casos, como nos lantibióticos, modificações pós-transcripcionais são introduzidas no peptídeo antes de ocorrer esta clivagem. A molécula protéica biologicamente ativa é excretada pela célula produtora através de um mecanismo de transporte ativo na membrana ou através de mecanismo *sec-dependente*.

Estes compostos bioativos podem ser um metabólito primário, quando sua síntese ocorre durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, tomando um papel vital no desenvolvimento deste organismo. Já o metabólito secundário pode ser descrito como um composto que é produzido após a fase ativa do crescimento e

tido como um mantenedor do desempenho do microrganismo naquele ecossistema, porém não é vital, segundo DE VUYST *et al.*, (1996).

A biossíntese ocorre tanto na fase logarítmica quanto na fase final do crescimento bacteriano e, no caso, guarda uma relação com a biomassa produzida (DYKES, 1995; BABA & SCHNEEWIND, 1998).

Para a produção de bacteriocinas, são necessários genes estruturais, genes para a secreção/modificação e, ainda, genes para proteínas imunológicas específicas, cuja função é proteger as células produtoras contra o efeito de suas próprias bacteriocinas. Além disso, em muitas bacteriocinas de classe II (não lantibióticos) pode haver um indutor da produção, geralmente também um peptídeo, porém sem nenhuma atividade bactericida (KLAENHAMMER, 1993).

A produção de bacteriocinas é geralmente controlada por um plasmídeo chamado bacteriocinogênico (DE VUYST, 1994). Embora na maioria das vezes o bacteriocinogênico esteja reprimido, em alguns casos o plasmídeo escapa da repressão e induz a síntese de sua bacteriocina, um exemplo é o que ocorre com a coagulina, produzida pelo *Bacillus coagulans* I₄, regulado pelo opéron *pI₄* DNA (MARREC *et al.*, 2000).

JACK *et al.* (1995) afirmam que a maioria das bactérias gram-positivas produtoras de bacteriocinas possuem genes plasmidiais codificadores desta propriedade. Um exemplo típico é a nisina, que é produzida pelo *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*. Assim como para esta expressão, para todas as demais bactérias gram-positivas produtoras, há a necessidade de um gene adicional cuja função vai além da regulação da transcrição, modificações pós-translocacionais, processamento, transporte para o exterior da célula, bem como a produção de compostos para sua própria proteção (imunidade).

De todos os genes codificadores, o *sec-dependente* é o único responsável pela produção e liberação especificamente de uma subclasse de bacteriocina, presente na maioria das bactérias produtoras e principalmente nas ácido-láticas (HOFLACK *et al.*, 1999).

Um forte indutor desses genes produtores são as radiações ultravioletas, que podem induzir a formação e a liberação da bacteriocina (BLACK, 2002).

A produção de bacteriocinas pelas bactérias ácido-láticas está intimamente relacionada com a fase de crescimento das linhagens produtoras. Usualmente, a produção ocorre na fase de crescimento e cessa no final da fase exponencial, onde geralmente encontram-se as maiores concentrações de bacteriocinas no meio de cultura. Após esta fase, acontece, normalmente, uma diminuição na concentração de bacteriocina. Tem sido sugerido que essa diminuição ocorra devido à aderência de bacteriocina às células produtoras ou ainda pela degradação das mesmas por ação de proteases (DE VUYST & VANDAMME, 1994).

Vários outros fatores também podem influenciar profundamente na produção de bacteriocinas, tais como linhagens bacterianas, fatores de estresse, composição do meio de cultura utilizado e as condições de incubação como pH, temperatura, agitação, entre outros (SCOTT & TAYLOR, 1981; MITEVA *et al.*, 1998; MATARAGAS *et al.*, 2003).

2.5 Uso das Bacteriocinas na Bioconservação de Alimentos

Os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores são as bactérias lácticas, devido as suas características antagonistas e sua grande tradição de

uso como bactérias grau-alimento, em alimentos fermentados (SCHILLINGER *et al.*, 1996; SCHILLINGER & HOLZAPFEL, 1996; DE MARTINS & FREITAS, 2003).

Muitas bactérias ácido-láticas têm um importante papel na produção de alimentos fermentados e também na bioconservação de alimentos, particularmente os laticínios (SCHILLINGER & HOLZAPFEL, 1996). Nesse sentido, o exemplo clássico de bacteriocinas com uma aplicação comercial bem sucedida é a nisina.

A nisina, conhecida desde 1928, foi a primeira bacteriocina que se mostrou promissora para o uso prático na preservação de alimentos, principalmente nos subprodutos do leite. Seu uso em escala comercial ocorre há quase 50 anos pela indústria alimentícia e, até hoje, é a única bacteriocina produzida por bactérias ácido-láticas (particularmente por *Lactococcus lactis*) e usada comercialmente com este propósito. Considerada como uma substância *GRAS* (*Generally Regarded as Safe*), sua utilização está aprovada pela *Food and Drugs Administration* (*FDA*) órgão norte-americano (CODEX ALIMENTARIUS, 1995).

Essa bacteriocina é atóxica, destruída por enzimas digestivas e não confere sabores e odores desagradáveis aos alimentos. Uma vantagem das bacteriocinas sobre os antibióticos clássicos é que as enzimas digestivas as destroem (CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

A nisina é caracterizada estruturalmente como um peptídeo contendo 20 aminoácidos, entre eles a lantionina, um aminoácido não muito comum (o que a classifica como a principal bacteriocina da classe I, a classe dos lantibióticos, cujo nome deriva da presença de aminoácidos com anéis de tioéter intramoleculares do tipo *meso*-lantionina e *threo*- β -lantionina) (DE VUYST & VANDAMME, 1994; MCAULIFFE *et al.*, 2001).

No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg e é permitida a utilização desta bacteriocina em produtos cárneos com aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico grau alimentício (DE MARTINIS *et al.*, 2002).

Embora várias bacteriocinas da classe II também tenham se mostrado efetivas na bioconservação de alimentos, nenhuma ainda foi licenciada ou comercializada como aditivo aos alimentos numa forma parcialmente purificada (FIELDS, 1996). Para MURIANA (1996) e SIRAGUSA *et al.* (1999), o uso de outras bacteriocinas, além da nisina, na indústria de alimentos tem despertado o interesse do setor.

A aplicação de bacteriocinas no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos foi demonstrada por DE VUYST & VANDAMME (1994), principalmente sobre *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Para estes autores, a bacteriocina pode inibir patógenos de importância em carnes refrigeradas minimamente processadas, na qual naturalmente a acidez elevada se torna indesejável, restando somente a refrigeração como forma de conservação.

De acordo com MURIANA (1996); EL-ZINEY *et al.* (1999); LÜCKE (2000) e ISLAN *et al.* (2002), o uso das bacteriocinas em carnes frescas ou semiprocessadas, as quais possuem bactérias lácticas como parte da sua microbiota, tem como objetivo prevenir a deterioração assim como evitar o crescimento de microrganismos psicrotrófilos patogênicos.

É de fundamental importância antes que uma bacteriocina seja considerada para utilização em alimentos, informações sobre seu espectro antimicrobiano, bem como

o conhecimento das características bioquímicas, genéticas e sua efetividade nos sistemas alimentares.

2.6 Mecanismo e Espectro de Ação das Bacteriocinas

Apesar das diferenças, os modos de ação dos diversos peptídeos antimicrobianos envolvem, em geral, associação com os lipídios de membrana plasmática microbiana provocando um aumento de sua permeabilidade. Em um primeiro momento, ocorre uma atração eletrostática entre as moléculas de peptídeo (que geralmente possuem carga positiva) e lipídios aniônicos presentes na membrana. Em seguida, a estrutura anfipática dos peptídeos antimicrobianos desempenha o seu papel, promovendo a interação dos peptídeos antimicrobianos com a interface hidrofílica/hidrofóbica presente na superfície das biomembranas (MAGET-DIANA, 1999; NAGHMOUCHI, *et al.*, 2007).

Os diversos mecanismos propostos para o aumento na permeabilidade de biomembranas devido a interação com peptídeos antimicrobianos foram revistos por SCHREIER *et al.*, (2002); LADOKHIN & WHITE, (2001); LOHNER, (2001) e ZASLOFF (2002). Estes mecanismos podem ser resumidos em três modelos:

- 1- Formação de poros organizados compostos por múltiplas unidades de peptídeos organizados na forma de um barril (*barrel stave model*) ou toróide (*wormhole model*) que atravessa a bicamada lipídica.
- 2- Os peptídeos comportam-se como detergentes, provocando alterações estruturais na membrana, deslocando lipídios e causando a formação de poros temporários ou mesmo lisando completamente a membrana (*carpet like model*).

3- A interação dos peptídeos com a superfície das biomembranas provoca distúrbios físico-químicos. O acúmulo de moléculas de peptídeos (muitas vezes envolvendo a formação de agregados) ocasiona flutuações e instabilidades estruturais localizadas na bicamada lipídica que resulta na formação de poros transientes.

Existem duas hipóteses para explicar como a permeabilização da membrana afeta a viabilidade dos microrganismos. Uma se baseia na perda de energia provocada pelo desequilíbrio e conseqüente destruição do potencial eletroquímico devido à formação de poros. A outra hipótese seria que o peptídeo, após danificar a membrana, pode atravessá-la e interferir nas funções intracelulares através de interação com macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos. Em alguns casos, ainda, foi demonstrada a ligação do peptídeo antimicrobiano com receptores de membrana (ANDREU & RIVAS, 1998; WU, *et al.*, 1999; GANZ & LEHNER, 2001). Entretanto, ainda existe muita discussão sobre o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.

Apesar das discordâncias sobre o modo de ação dos peptídeos antimicrobianos, existe um consenso de que, na grande maioria dos casos, a membrana está diretamente envolvida. Os peptídeos antimicrobianos são ativos contra alvos que possuem membrana plasmática, como bactérias, fungos, protozoários, células tumorais e vírus envelopados (gripe e HIV, por exemplo) (HANCOCK & DIAMOND, 2000).

O efeito generalizado destes peptídeos sobre a membrana dificulta o desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos, tendo em vista a improbabilidade da ocorrência de mutações capazes de produzir grandes alterações no componente lipídico da membrana dos microrganismos. Como a

composição lipídica das biomembranas é muito similar entre os seres vivos, os peptídeos antimicrobianos possuem, em geral, amplo espectro de ação (ANDREU & RIVAS, 1999; ZASLOFF, 2002).

2.7 Bacteriocinas Produzidas por Espécies de *Bacillus*

O gênero *Bacillus* constitui um dos grupos mais amplos da microbiologia. Suas características são muito variadas, sendo encontradas espécies com importância industrial e agrícola até espécies patogênicas produtoras de toxinas. As espécies importantes industrialmente têm um histórico de uso seguro na indústria e em alimentos (PAIK *et al.*, 1997).

Segundo o Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática, os *Bacillus* são bactérias em forma de bastonetes, Gram-positivas, esporogênicas e tolerantes ou não ao oxigênio. São agrupadas de acordo com as exigências físicas, químicas nutricionais ou genéticas.

A maioria das espécies deste gênero tem o solo como *habitat* natural. São espécies freqüentemente sujeitas a variações drásticas de parâmetros físico-químicos do meio ambiente, tais como temperatura, osmolaridade ou disponibilidade de fontes de carbono. Muitas vezes estas variações impõem condições de crescimento lento ou de fase estacionária. Durante a transição da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária, as células ensaiam respostas adaptativas que vão desde o desenvolvimento da motilidade ou de competência para a transformação genética por exógeno, até a produção de antibióticos ou de enzimas degradativas extracelulares (HYRONIMUS *et al.*, 1998).

A atividade antimicrobiana que algumas linhagens de *Bacillus* possuem se deve aos peptídeos antimicrobianos, cuja origem pode ser de síntese ou da metabolização. Estes metabólitos, geralmente, podem desenvolver uma função sinérgica e endosimbiontica (GEBHARDT *et al.*, 2002).

São diversas as origens de *Bacillus* produtores de substâncias antimicrobianas. SUGITA *et al.* (1998) relataram a presença de bactérias intestinais isoladas de sete diferentes espécies de peixes da costa japonesa produtoras de substâncias antimicrobianas. Ao *B. amyloliquefaciens* isolado da amoreira é atribuída a produção de um composto que impede a proliferação de bactérias e fungos fitopatogênicos (YOSHIDA *et al.*, 2001).

PATTNAIK *et al.* (2001) identificaram uma substância tipo-bacteriocina (liquenina) produzida sob condições restritas de oxigênio por *B. liqueniformes* de suco ruminal de búfalos. Tanto a produção como a atividade se limita à ausência de oxigênio. Sua melhor atividade ocorre na faixa de pH entre 4 e 9 e é termoestável à 100°C, porém é sensível a proteinase K. Apresenta um peso molecular de 1,5 kDa.

Já HYRONIMUS *et al.* (1998), isolaram uma linhagem de *B. coagulans* L₄ de fezes de bovinos produtora da coagulina, capaz de inibir outras espécies de *Bacillus* e *Listeria* sp, entre outros indicadores.

A produção de bacteriocinas ou de substâncias relacionadas tem sido descrita para várias espécies do gênero *Bacillus*, entre elas *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoleovarans* e *B. thuringiensis* (NOVOTNY & PERRY, 1992; OSCÁRIZ *et al.*, 1999; HYRONIMUS *et al.*, 1998; PATTNAIK *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001).

Segundo TAMEHIRO *et al.* (2002), o *B. subtilis* produz diversos antibióticos que estão classificados de acordo com sua síntese. Sintetizados ribossomalmente estão a subtilisina, subtilina, sublancina e TasA produzidas durante a fase ativa de crescimento. O grupo sintetizado não ribossomalmente é produzido durante a fase estacionária como a surfactina (biosurfactante), bacilisina e as iturinas.

2.8 *Bacillus cereus*

O *B. cereus* é mais conhecido pelas duas formas de doenças capaz de causar (gastrenterite diarréica e gastrenterite emética) do que pelo seu antagonismo às bactérias. São comumente encontrados em solos úmidos, vegetais em decomposição e, ainda, em laticínios e abatedouros de animais como contaminantes de seus subprodutos.

As cereínas, como são normalmente chamadas as bacteriocinas produzidas pelo *B. cereus*, apresentam um amplo e variado espectro de ação. Elas já foram estudadas devido a suas ações bacteriolítica ou bactericida contra *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus* sp., *C. botulinum*, *C. perfringens* e *C. Butyricum*, *B. cereus* e *B. subtilis* entre outras espécies de importância alimentar. A cereína 7 constitui um agregado polipeptídico de peso molecular entre 3 e 10 kDa, termoestável a 100°C por 15 minutos e ativa na faixa de pH entre 2 e 9 (OSCÀRIZ *et al.*, 1999).

Algumas cereínas possuem atividade antimicrobiana contra espécies estritamente relacionadas, é o caso da cereína GN105, produzida pela linhagem

de *B. cereus* GN105 que atua somente contra espécies do mesmo gênero (NACLERIO *et al.*, 1993).

B. cereus 8A, isolado de solos nativos do sul do Brasil, produz a cereína 8A, uma bacteriocina que apresenta amplo espectro de atividade e potencial use como bioconservante em alimentos (Bizani e Brandelli, 2002). A cereína 8A revelou um efeito bactericida sobre *Listeria monocytogenes* e *B. cereus* (BIZANI *et al.*, 2005).

2.9 Purificação de Bacteriocinas

A utilização de proteínas para a aplicação exige a sua purificação, uma vez que qualquer célula contém milhares de proteínas diferentes, que apresentam uma ampla faixa de atividade biológica.

A caracterização de bacteriocinas é dependente da sua purificação e diversas técnicas são combinadas para a obtenção de proteínas puras (CAROLISSEN-MACKAY *et al.*, 1997). Esta variação é atribuída à natureza extremamente heterogênea das bacteriocinas (TAAG *et al.*, 1976, KLAENHAMMER, 1993), que impossibilita a aplicação de um protocolo universal de purificação. Dessa forma, para cada bacteriocina deve ser desenvolvido um protocolo particular, ideal para o isolamento e purificação da mesma (DE VUYST & VANDAMME, 1994).

A produção de muitas bacteriocinas não é induzível e são detectados títulos relativamente baixos nas culturas. Portanto, para que a purificação seja possível é necessário que a bacteriocina seja produzida em uma grande quantidade. As condições da incubação, como tempo, temperatura e pH

influenciam fortemente na produção da bacteriocina (CAROLISSEN-MACKAY *et al.*, 1997).

Os protocolos de recuperação e purificação laboratoriais geralmente são bastante complexos e incluem a precipitação com sulfato de amônio (na concentração variável de 0-80%), seguida por várias combinações de cromatografia líquida de troca iônica, interação hidrofóbica ou cromatografia de fase reversa. Apesar destes procedimentos poderem levar a bons resultados em termos de purificação, tornam-se geralmente inviáveis para serem empregados numa escala maior de recuperação, devido ao alto custo e complexidade envolvidos (YANG *et al.*, 1992; CRUPPER & IANDIOLO, 1996; VENEMA *et al.*, 1997).

A maioria dos pesquisadores inicialmente submete o sobrenadante da cultura produtora a precipitação com sais ou solventes e, após, a uma pré-purificação. Segundo YANG *et al.* (1992), algumas bacteriocinas como a lactocina 481 e lactocina B podem aumentar até 450 vezes sua atividade biológica após o tratamento de seus sobrenadantes livres de células com altas concentrações de sulfato de amônio. De acordo com estes pesquisadores, os sais atuam tanto dissociando a bacteriocina nativa em monômeros mais ativos, como alterando a sua conformação.

A purificação do precipitado ativo dos sobrenadantes por cromatografia de troca iônica tem permitido uma boa recuperação da nisina, diplocina e lactocina A. Entretanto, este método não é eficiente para todas as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas, pois afeta sensivelmente a recuperação da atividade biológica (NETLES & BAREFOOT, 1993).

A cromatografia de interação hidrofóbica pode ser utilizada com grande êxito na purificação de alguns lantibióticos (nisina, lactocina A e lactocina S). Não obstante, esta técnica não serve para a purificação de bacteriocinas de grande hidrofobicidade (plantaricina, lactocina 481), que na ausência de sal reagem espontaneamente com a matriz do gel (UTENG *et al.*, 2002).

A purificação de bacteriocinas por cromatografia de fase reversa pode ser utilizada em casos específicos, porém a cromatografia de troca iônica é uma técnica mais adaptada às moléculas hidrofóbicas. ABRIOUEL *et al.* (2003) utilizaram este método associado à adsorção da bacteriocina em Carboxymethyl Sephadex CM-25 para enterocina AS-48 (bacteriocina produzida pelo *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* AS-48). Baseado em propriedades comuns em muitas bacteriocinas como carga positiva, resistência aos solventes orgânicos e pH ácido, estes pesquisadores conseguiram através desta técnica uma recuperação em grande escala da bacteriocina purificada em apenas dois passos de purificação.

2.9.1 Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas

Sistemas contendo duas ou mais fases líquidas em equilíbrio termodinâmico são muito úteis para aplicações em extração e/ou purificação de compostos presentes em inúmeros processos tecnológicos (SILVA & FRANCO, 2000; PESSOA & KOLIKIAN, 2005). Porém, para aplicação desta técnica de extração líquido-líquido para a obtenção de compostos com importância biotecnológica (proteínas, enzimas, células, vírus, organelas, etc.), faz-se necessária a utilização de sistemas em que as duas fases guardem semelhanças,

em termos das propriedades físico-químicas, com o meio aquoso presente nos seres vivos (SELBER *et al.*, 2004). Assim, a aplicação dos clássicos sistemas bifásicos solvente orgânico/água para extração de uma proteína seria inviável, na maioria dos casos, pois, com uma eventual concentração da proteína na fase orgânica, ocorreria um processo de desnaturação, com a conseqüente perda de atividade da biomolécula. Neste sentido, os sistemas denominados aquosos bifásicos (SABs ou, em inglês, ATPS) desempenham um papel estratégico pois, as duas fases são formadas predominantemente (60-95%) por água (SILVA & LOH, 2006).

A formação dos ATPS é conhecida desde o final do século 19. Em 1896, Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina e agar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, formavam misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em agar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases.

Posteriormente, Ostwald e Hertel (1929) continuaram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas (arroz, milho, etc.), isto é, possuindo diferentes frações de amilose e amilopectina, produziam diferentes diagramas de fase. Esses resultados mostravam a grande influência que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio.

Com objetivo de verificar uma possível generalidade do fenômeno de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, Dobry e Boyer-

Kawenoki (1947), no final da década de 40, estudaram a miscibilidade de um grande número de diferentes pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Estes autores constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e puderam concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral.

Somente com os trabalhos de Per-Åke Albertsson (TISELIUS *et al.*, 1963), em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas à partição/purificação de materiais biológicos, desde proteínas até células. Como o solvente é a água em ambas as fases e geralmente se encontra presente em grande quantidade, estes sistemas fornecem um ambiente ameno para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perda das atividades biológicas.

Outra propriedade termodinâmica importante associada aos SABs, e que lhes dá uma vantagem significativa quando comparados aos clássicos sistemas água-óleo, é possuírem regiões interfaciais com baixo valor de tensão interfacial, γ (KAUL *et al.*, 1995; KIM & RHA, 2000). Para aplicação em processos de separação de biomoléculas, este pequeno valor de excesso de energia livre de Gibbs por unidade de área possibilita a transferência das biopartículas pela interface com um risco mínimo de ocorrerem alterações estruturais nas proteínas, células e membranas particionadas (VENÂNCIO *et al.*, 1996).

Em geral, a distribuição de proteínas entre as duas fases aquosas dos SABs é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição, K_p , definido como (WAZIRI *et al.*, 2004):

$$K_p = \frac{a_{p,S}}{a_{p,I}} \cong \frac{c_{p,S}}{c_{p,I}} \quad \text{Equação 1}$$

onde $a_{p,i}$ e $c_{p,i}$ são, respectivamente, a atividade e a concentração da proteína nas diferentes fases (S= superior ou I= inferior). A Equação 1 enfatiza o ponto de vista termodinâmico, em que os parâmetros "concentração" presentes nesta equação, deveriam ser substituídos pela "atividade" da proteína nas duas fases. É importante destacar que muitas vezes, as medidas experimentais do coeficiente de partição das proteínas têm revelado uma dependência de K_p em relação à concentração da mesma indicando tratar-se de um coeficiente aparente, não constituindo, desta forma, um parâmetro que caracterize um sistema em equilíbrio termodinâmico. Além disto, a dependência de K_p em relação à concentração pode também indicar que está ocorrendo a partição de diferentes espécies químicas formadas, por exemplo, pela agregação das proteínas. Entretanto, para experimentos em que a concentração da proteína é muito baixa (regime de diluição infinita), os valores da concentração e da atividade tornam-se muito próximos (PRAUSNITZ *et al.*, 1986).

Esta distribuição desigual da biopartícula entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies (polímeros, H₂O e/ou sais inorgânicos) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (FARRUGGIA *et al.*, 2003).

Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e do biopolímero determinam o valor de K_p . Exemplos de fatores associados à proteína que influenciam sua distribuição entre as fases são o tamanho, a conformação (estruturas secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura

primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade (JONSSON & JOHANSSON, 2003). Além disto, propriedades importantes das fases também contribuem nesta distribuição, como por exemplo, a natureza química dos componentes formadores dos SABs, a massa molar e a concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína, pH e temperatura (WAZIRI & ABU-SHARKH, 2004). Além do mais, a adição de diferentes sais inorgânicos a estes sistemas bifásicos produz uma diferença de potencial elétrico na interface, que influencia marcadamente a partição de proteínas carregadas eletricamente. Este potencial eletrostático ocorre devido à distribuição desigual dos cátions e dos ânions entre as fases enriquecidas pelos diferentes polímeros (FARRUGGIA *et al.*, 2004).

Atualmente é alta a demanda por métodos de extração e purificação de biopartículas (proteínas, enzimas, células, etc.) que sejam eficientes e economicamente viáveis. Nessa linha, os sistemas aquosos bifásicos constituem um potencial. Entretanto, é notório que os SABs apesar da intensa aplicação em escala laboratorial para purificação de enzimas e proteínas, não alcançaram ampla aplicação comercial, tendo talvez como possíveis causas o custo dos polímeros formadores das fases e/ou o comportamento complexo (inúmeras variáveis interferindo de forma cinética ou antagônica) de partição apresentados nestes sistemas bifásicos. Além disso, para sua aplicação sistemática, é necessária maior compreensão dos fatores que determinam sua formação e a partição de solutos específicos. Contudo, a urgente demanda por parte da indústria biotecnológica, com objetivo de trazer para o mercado consumidor produtos que possuam alto valor agregado, com ampla aplicação

médica, certamente motivará a aplicação em escala industrial dos SABs (SILVA & LOH, 2006).

2.10 Inativação Térmica de proteínas

O tratamento térmico persiste como o método mais amplamente utilizado para preservar e aumentar a vida útil dos alimentos (AWUAH *et al.*, 2007). No entanto, o aquecimento excessivo produz perdas consideráveis em termos de qualidade e, sobretudo, nas propriedades sensoriais dos alimentos. Técnicas de processamento térmico buscam a realização da esterilidade comercial e, ao mesmo tempo, minimização das alterações no valor nutricional e qualidade dos alimentos (POLYDERA *et al.*, 2003). A perda da qualidade envolve tanto fatores subjetivos, como o sabor, que não podem ser facilmente quantificados e fatores quantificáveis como a degradação dos nutrientes (AWUAH *et al.*, 2007). A este respeito, técnicas combinadas para reduzir a aplicação de calor nos alimentos têm ganhado maior atenção. Bacteriocinas têm sido utilizadas na tecnologia de barreira, que combina métodos diferentes para inibir o crescimento microbiano (CLEVELAND *et al.* 2001).

Em geral, a inativação térmica de microrganismos ou enzimas pode ser descrita como uma reação de primeira ordem. No processamento de alimentos, é comum caracterizar as reações de primeira ordem em termos de valores de D e z (conceitos de tempo de inativação térmica). O tempo de redução decimal (valor D) é o tempo necessário para reduzir a atividade da bacteriocina a um décimo do valor inicial a uma determinada temperatura. O valor z é a temperatura necessárias para reduzir o valor D em dez vezes, e é obtido pela plotagem dos valores D em uma escala logarítmica *versus* as temperaturas correspondentes (STUMBO, 1973).

Diferenças entre os valores de D e z de microrganismos e nutrientes são exploradas para otimizar processos térmicos. Os valores z para cozimento e degradação dos nutrientes (25-45°C) são geralmente superiores a inativação microbiana (7-12°C) (AWUAH *et al.*, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos publicados, aceitos para publicação ou enviados para publicação em revistas científicas. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos.

3.1 Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A

- Publicado no *Journal of Food Engineering* em 05 de setembro de 2009.
(J Food Eng, 2009, **91**, 223-227)

3.2 Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A , EDTA and sodium lactate

- Publicado no *International Journal of Food Microbiology* em 15 de novembro de 2009.
(International Journal of Food Microbiology, 2009, **135**, 312-316)

3.3 Extraction of the antimicrobial peptide cerein 8A by aqueous two-phase systems and aqueous two-phase micellar systems

- Será submetido ao *Process Biochemistry*.

De um modo geral, todos os trabalhos visam a caracterização da Cereína 8A. Num primeiro momento, a bacteriocina foi caracterizada quanto a sua cinética de inativação térmica e parâmetros termodinâmicos.

Posteriormente, foi avaliada a atividade antimicrobiana da Cereína 8A em um microrganismo Gram-negativo, *Salmonella* Enteritidis, onde foi verificado, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, o seu modo de ação. Também foi verificado o efeito da adição de quelantes como potencializadores do efeito antimicrobiano.

Finalmente, o último objetivo do trabalho foi desenvolver uma forma mais rápida de obter a bacteriocina na sua forma semi purificada, através da utilização de sistemas aquosos bifásicos.

3.1 Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A

3.1.1 Abstract

Optimization of thermal processes relies on adequate degradation kinetic models to warrant food safety and quality. The knowledge on thermal inactivation kinetics of bacteriocins is necessary to allow their adequate use as natural biopreservatives in the

food industry. In this work, the kinetics of thermal inactivation was studied for the previously characterized bacteriocin cerein 8A. Samples of cerein 8A were treated at different time-temperature combinations in the range of 0-30 min and 70-82°C and the thermodynamic and kinetic parameters for bacteriocin inactivation were calculated. Results showed that inactivation followed a first-order reaction with k -values between 0.059 and 0.235 min⁻¹. D - and k -values decreased and increased, respectively, with increasing temperature, indicating a faster bacteriocin inactivation at higher temperatures. Results suggest that cerein 8A is a relatively thermostable bacteriocin with a z -value of 21.98 °C and E_a of 105.7 kJ mol⁻¹.

Keywords: *Bacillus cereus*; bacteriocin; cerein; antibacterial peptide; inactivation kinetics; thermal processing; thermodynamic activation parameters.

Nomenclature

C_t Bacteriocin activity at time t (UA)

C_0 Initial Bacteriocin activity (UA)

D Decimal reduction time (min)

E_a Activation energy (kJ mol^{-1})

ΔG^* Free energy inactivation (kJ mol^{-1})

H Planck constant (J min)

ΔH^* Activation enthalpy (kJ mol^{-1})

K Inactivation rate constant (min^{-1})

K_B Boltzmann constant (J K^{-1})

R Universal gas constant

R^2 Determination coefficient

ΔS^* Activation entropy ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

T Time (min)

$T_{1/2}$ Half-time (min)

T Temperature ($^{\circ}\text{C}$, K)

Z z-value ($^{\circ}\text{C}$)

3.1.2 Introduction

Bacteriocins are antimicrobial peptides widespread produced by bacteria. Bacteriocin production is common among bacteria isolated from diverse environments (Riley and Wertz 2002). Those produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of intensive investigation because of their potential use as biopreservatives in the food industry (O'Sullivan et al., 2002; Degan et al., 2006). Several bacteriocins from LAB have been effectively characterized and tested in food systems to combat pathogenic and spoilage microorganisms. Nisin is the most well characterized bacteriocin and its use in food is permitted in more than 40 countries (Cleveland et al., 2001).

Despite the intensive work on LAB, *Bacillus* is another interesting genus to investigate for antimicrobial peptides since this genus includes a variety of industrially important species and has a history of safe use in food and industry (Pedersen et al., 2002). The production of bacteriocins or bacteriocin-like substances has been already described for many *Bacillus* species such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus*, among other (von Dörhen 1995; Stein 2005).

Bacillus cereus 8A is a previously characterized bacterium isolated from native woodlands of southern Brazil. This strain produces cerein 8A, a bacteriocin presenting broad spectrum of activity and potential use as biopreservative in food (Bizani and Brandelli 2002). Cerein 8A showed a bactericidal effect on *Listeria monocytogenes* and *B. cereus* (Bizani et al., 2005a). High yields of this substance were obtained by cultivation in BHI broth (Bizani and Brandelli, 2004) and production was optimized in soybean protein reaching similar yields allowing a cost effective production (Dominguez et al., 2007).

Thermal processing persists as the most widely used method of preserving and extending the useful shelf-life of food (Awuah et al., 2007). However, excessive heating produces considerable losses in the quality and particularly in the sensory properties of foods. Thermal processing techniques emphasize the achievement of commercial sterility while minimizing changes in nutritional value and eating quality (Polydera et al., 2003). Quality loss involves both subjective factors like taste that cannot be readily quantified and quantifiable factors such as nutrient degradation (Awuah et al., 2007). In this regard, combined techniques to reduce heat application in foods have gaining increased attention. Bacteriocins have been used in hurdle technology, which combines different methods to inhibit microbial growth (Cleveland et al. 2001). Nisin has been used with moderate heat to inactivate important food pathogens (Boziaris et al. 1998; Gao and Ju 2008).

The knowledge on kinetics of thermal inactivation of bacteriocins is important to allow their adequate use as biopreservatives in the food industry. Moreover, there is scarce information about this subject in the literature. The aim of the present work was to investigate the thermal stability of cerein 8A. On this basis, an Arrhenius plot was derived and the thermodynamic parameters for thermal inactivation were determined.

3.1.3 Theory

In general, thermal inactivation of microorganisms or enzymes can be described by a first-order reaction (in this work thermal inactivation of cerein 8A):

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -k.t$$

(1)

where C_t is the protein concentration (or bacteriocin activity in UA) at treatment time t , C_0 is the initial protein concentration (or initial bacteriocin activity in UA), and k is the inactivation rate constant at the temperature studied. The inactivation rate constant k can be estimated by linear regression analysis of the natural logarithm of residual activity versus treatment time.

Inactivation rate constants for bacteriocin gave values for bacteriocin half-life ($t_{1/2}$):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

(2)

In food processing, it is common to characterize first-order reactions in terms of D and z values (thermal death time concepts). The decimal reduction time (D value) is the time needed for a 10-fold reduction of the initial activity at a given temperature. The relation between the D value and the inactivation rate constant is given by (Espachs-Barroso et al., 2006):

$$D = \frac{\ln(10)}{k}$$

(3)

The z value is the temperature needed to reduce the D value one log-unit, and it is obtained by plotting the D values on a log scale against the corresponding temperatures (Stumbo, 1973).

Differences between the D and z -values of microorganisms and nutrients are exploited to optimize thermal processes. The z -values for cooking and nutrient degradation (25-45 °C) are generally greater than microbial inactivation (7-12 °C) (Awuah et al., 2007).

The Arrhenius equation is the most common mathematical expression to describe the temperature effect on the inactivation rate constants and the dependence is given by the activation energy (E_a):

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R.T}$$

(4)

where A is the Arrhenius constant, E_a the activation energy, R the universal gas constant and T is the absolute temperature. The activation energy can be estimated by linear regression analysis of the natural logarithm of rate constant versus the reciprocal of the absolute temperature.

Activation enthalpy (ΔH^*), free energy of inactivation (ΔG^*) and activation entropy (ΔS^*) can be calculated according to the expressions:

$$\Delta H^* = E_a - R.T$$

(5)

$$\Delta G^* = -R.T \cdot \ln\left(\frac{k.h}{K_B T}\right)$$

(6)

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T}$$

(7)

were h and K_B are the Planck's and the Boltzmann's constants, respectively and T the average temperature (350 K in this work).

3.1.4 Materials and methods

3.1.4.1 Reagents and media

Brain heart infusion (BHI) was from Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA). Agar and other reagents were from Merck (Darmstadt, Germany).

3.1.4.2 Bacterial cultures

The producer strain was *Bacillus cereus* 8A, isolated and characterized as described elsewhere (Bizani and Brandelli 2002). The indicator strain was *Bacillus cereus* ATCC 14579 stored in 20% (v/v) glycerol at -20°C . Cells were propagated in BHI broth before use. The cultivation of the strains was performed aerobically

3.1.4.3 Bacteriocin production

For bacteriocin production, *B. cereus* 8A was grown in 200 ml of BHI broth at 30°C in a rotatory shaker at $125 \text{ cycles min}^{-1}$ for 24h. The cells were removed by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min. Bacteriocin activity was concentrated by precipitation with ammonium sulfate at 70% (w/v) saturation. The pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and extracted with 1-butanol (0.7 vol). After the butanol was

evaporated under reduced pressure, partially-purified bacteriocin was stored at 4°C until used for antimicrobial assay (Bizani et al., 2005b).

3.1.4.4 Bacteriocin activity assay

The antimicrobial activity was detected by agar disc diffusion assay (Motta and Brandelli 2002). Aliquots of 20µl bacteriocin preparation were applied on agar plates previously inoculated with a swab submerged in indicator strain suspension (*B. cereus* ATCC 14579) that corresponded to a 0.5 McFarland turbidity standard solution (10^8 CFU ml⁻¹). Plates were incubated at 37°C. The bacteriocin titre was determined by the serial two-fold dilution method. The reciprocal value of the highest dilution where an inhibition zone was observed was taken as activity units ml⁻¹ (AU ml⁻¹).

3.1.4.5 Thermal inactivation

Thermal inactivation of cerein 8A was determined by incubating the bacteriocin at 70, 75, 77, 80 e 82°C. Bacteriocin solutions (1.0 ml) were heated in sealed tubes, which were incubated in a thermostatically controlled water bath (B. Braun Biotech, Melsungen, Germany). Tubes were withdrawn at each time intervals, immediately immersed in an ice bath and bacteriocin activity was determined as describe earlier. The activity after 1 min of heating-up time ($t = 0$) was considered to be the initial activity, thereby eliminating the effects of heating-up. Assays were done in duplicate.

3.1.4.6 Data analysis

Statistical analysis of the data was performed using the Statistica 7.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) and plots using Microsoft Excel 2000 (MapInfo Corporation, Troy, NY, USA).

3.1.5 Results and discussion

We have earlier reported that cerein 8A was inhibitory to a broad range of indicator strains, including pathogenic and spoilage organisms such as *L. monocytogenes*, *B. cereus* and clinical isolates of *Streptococcus* spp. and was stable for up to 70°C and within a wide range of pH (Bizani and Brandelli 2002). In this study, the kinetics of thermal inactivation of cerein 8A was evaluated and thermodynamic properties were calculated. Bacteriocin was thermally treated for 30 min at temperature ranging from 70 to 82°C and the residual activity was determined. As expected, bacteriocin activity decreased as the heating time increased. Loss of activity was found to follow an apparent first order kinetic (Eq. (1)) during thermal treatment as depicted in Fig. 1. In this figure, symbols refer to the average of experimental values, while lines correspond to the fitted values of Eq. (1) to experimental data. The inactivation rate constants (k) were determined from the slope of such semi-log-plots and are giving in Table 1 (together with the r^2 of the correlation). The rate constant increased with the higher heating temperatures.

The logarithm representation of bacteriocin activity against time allows us to calculate D -values (Table 1), which decreased with increasing temperature, indicating a more rapid bacteriocin inactivation at higher temperatures. It can be observed that D -values are between 35 and 39 at temperatures between 70 and 75°C and fall to values lower than 23 at 77 °C or more. The effect of temperature on D -values is also shown in

Fig. 2, and the calculated z -value for the range of temperatures studied (70-82°C) was approximately 22°C (Table 1). The z -values for cooking and nutrient degradation (25-45°C) are generally greater than microbial inactivation (7-12°C) (Awuah et al., 2007). In fact, differences between the D and z -values of microorganisms and nutrients are exploited to optimize thermal processes and can be exploited also to maintain bacteriocin activity after treatment. D and z -values obtained for cerein 8A indicates that it can be utilized in conditions of HTST (high temperatures short times) pasteurization, where values of 72°C and 15 s are generally considered. It is necessary to point out that thermal inactivation was studied for cerein 8A in buffer solution, and in a food system the bacteriocin could be more stable due to the protective effect of food proteins. It was recently demonstrated that cerein 8A inhibits *L. monocytogenes* in dairy products, remaining stable for at least 4 weeks in soft cheese (Bizani et al., 2008). The bacteriocins nisin and sakacin P quickly adsorb to proteins in the food matrix and their activity was stable for more than 4 weeks in heat-treated foods (Aasen et al., 2003). Higher bacteriocin stability in heat processed food was credited in part by inactivation of endogenous proteases, which may be harmful to antimicrobial peptides. The nature of food matrix influences the bacteriocin effectiveness. Nisin inactivation by some meat components, such as phospholipids and glutathione S-transferase have been reported (Cleveland et al., 2001).

The dependence of the inactivation rate constants with temperature fitted adequately the Arrhenius equation (Fig. 3). Activation energy obtained (105.7 kJ mol⁻¹) was similar to that obtained for heat inactivation of soybean trypsin inhibitors, from 103 to 195 kJ mol⁻¹ depending on the product moisture (van den Hout et al., 1999). Comparable values, 102.3 kJ mol⁻¹ and 146 kJ mol⁻¹, were observed for adenosine

deaminase (Alrokayan, 2002) and pectinmethylesterase (Vivar-Ver et al., 2007) from skeletal muscle and hawthorn, respectively.

Table 2 also shows thermodynamic values (ΔH^* , ΔG^* and ΔS^*) obtained from Eq. (5)-(7). Similar data is poorly available for other antimicrobial peptides. The unfolding thermodynamics of the circular bacteriocin AS-48 was investigated by differential scanning calorimetry (Cobos et al., 2001). Those authors found that the specific enthalpy change upon unfolding is unusually small ($\Delta H_m = 230 \text{ kJ mol}^{-1}$), whereas the Gibbs energy change at 25°C is relatively high ($\Delta G_{298} = 32.8 \text{ kJ mol}^{-1}$). This was attributed in part by asymmetry of charge distribution in protein surface, one of the sides display a cluster of positive charges and the opposite side is mostly hydrophobic. Cerein 8A was shown to have similar structural features, presenting amphipathic properties (Bizani et al., 2005b). In agreement, pediocin PA-1 is a heat-stable bacteriocin that exhibit both cationic and hydrophobic properties. This peptide undergoes conformational changes during heating from 20 to 80°C, and irreversible aggregation is observed at pD 7 and 8, but not at pD 6 (Gaussier et al., 2003). Studies on the thermal denaturation of lysozyme showed the standard free energy change (ΔG^o) was 83.7 kJ mol^{-1} at pH 7, decreasing to 32.2 kJ mol^{-1} at pH 2 (Timasheff and Xie, 2003). In addition, the values of standard enthalpy change (ΔH^o) at unfolding temperature (T_m), as determined by the van't Hoff equation, were lower at pH 2 than at pH 7.

Bacteriocins may be used in combination with heat to obtain safe food with minimal destruction of food components such as flavor, color or nutrients during processing. However, adequate kinetic models of thermal destruction are essential to design new processes assuming a safe food product and giving a maximum retention of quality factors (Lenz and Lund, 1980; van Boekel, 1996). In this concern, the

knowledge about kinetics and thermodynamics of heat inactivation of bacteriocins is an essential step to achieve this purpose.

3.1.6. Conclusions

Based on an isothermal experiment in the temperature range of 70 to 82°C, and by using Arrhenius and thermal death time models, thermal inactivation of cerein 8A could be described by a first-order kinetic model. D -, z - and k -values calculated by linear regression suggest that cerein 8A is a relatively thermostable bacteriocin with a z -value of 22°C and E_a of 105.7 kJ mol⁻¹. More studies about kinetics of thermal inactivation of bacteriocins are necessary to allow their proper utilization as natural biopreservatives in the food industry.

3.1.7 RESUMO

A otimização de processos térmicos baseia-se em modelos cinéticos de degradação adequados para garantir a segurança alimentar e a qualidade. O conhecimento sobre cinética de inativação térmica de bacteriocinas é necessário para permitir a sua utilização adequada como bioconservante natural na indústria de alimentos. Neste trabalho, foi estudada a cinética de inativação térmica para cereína 8A, uma bacteriocina previamente caracterizada. Amostras de cereína 8A foram tratadas em combinações de tempo-temperatura diferentes no intervalo de 0–30min e 70–82°C e os parâmetros termodinâmicos e cinéticos para inativação da bacteriocina foram calculados. Os resultados revelaram que a inativação seguiu uma reação de primeira ordem com valores de k entre 0.059min^{-1} e 0.235min^{-1} . Os valores de D e k diminuíram e aumentaram, respectivamente, com aumento da temperatura, indicando uma rápida inativação da bacteriocina a temperaturas mais elevadas. Os resultados sugerem que a cereína 8A é uma bacteriocina relativamente termoestável com um valor de z de 21.98°C e E_a de 105.7 kJ mol^{-1} .

3.1.8 References

- Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 35-43.
- Alrokayan, S. (2002). Purification and characterization of adenosine deaminase from camel skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 1608-1618.
- Awuah, G.B., Ramaswamy, H.S., & Economides, A. (2007). Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 584-602.
- Bizani, D., & Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 512-519.
- Bizani, D., & Brandelli, A. (2004). Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 158-162.
- Bizani, D., Motta, A.S., Morrissy, J.A.C., Terra, R.M., Souto, A.A., & Brandelli, A. (2005a). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, 8, 125-131.
- Bizani, D., Dominguez, A.P.M., & Brandelli, A. (2005b) Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 269-273.
- Bizani, D., Morrissy, J.A.C., Dominguez, A.P.M., & Brandelli, A. (2008) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 229-233.

- Boziaris, I.S., Humpheson, L., & Adams, M.R. (1998). Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 7-13.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., & Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Cobos, E.S., Filimonov, V.V., Galvez, A., Maqueda, M., Valdívía, E., Martínez, J.C., & Mateo, P.L. (2001). AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. *FEBS Letters*, 505, 379-382.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- Dominguez, A.P.M., Bizani, D., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2007). Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 238-243.
- Espachs-Barroso, A., Loey, A.V., Hendrickx, M., & Martín-Belloso, O. (2006). Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7, 40-48.
- Gao, Y.L., & Ju, X.R. (2008). Exploiting the combined effects of high pressure and moderate heat with nisin on inactivation of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Microbiological Methods*, 72, 20-28.
- Gaussier, H., Lavoie, M., & Subirade, M. (2003). Conformational changes of pediocin in an aqueous medium monitored by Fourier transform infrared spectroscopy: a biological implication. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32, 1-9.

- Lenz, M.K., & Lund, D.B. (1980). Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components. *Food Technology*, 34, 51-55.
- Motta, A.S., & Brandelli, A. (2002). Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63-70.
- 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.
- Pedersem, P.B., Bjornvad, M.V., Rasmussen, M.D., & Petersen, J.N. (2002). Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 36, 155-161.
- Polydera, A.C., Stoforos, N.G., & Taoukis, P.S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60, 21-29.
- Riley, M.A., & Wertz, J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Annual Review of Microbiology*, 357–364.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 845–857.
- Stumbo, C.R. (1973). *Thermobacteriology in Food Processing*, 2nd edn. Academic Press, New York.
- Timasheff, S.N., & Xie, G. (2003). Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. *Biophysical Chemistry*, 105, 421-448.
- Van Boekel, M.A.J.S. (1996). Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. *Journal of Food Science*, 61, 477-485.
- Van den Hout, R., Meerdink, G., & van't Riet, K. (1999). Modeling of the inactivation kinetics of the trypsin inhibitors in soy flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 63-70.

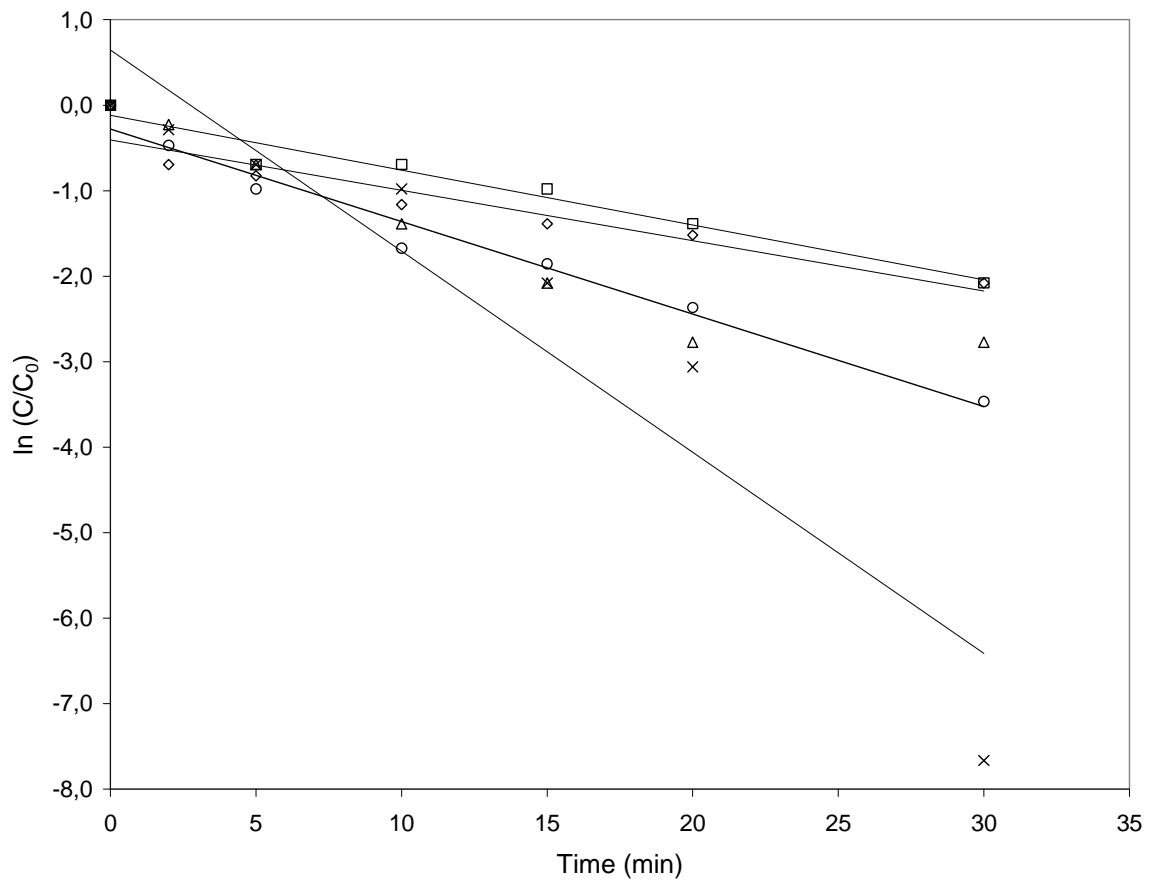
- Vivar-Vera, M.A., Salazar-Montoya, J.A., Calva-Calva, G., & Ramos-Ramírez, E.G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT Food Science and Technology*, 40, 278-284.
- Von Döhren, H. (1995). Peptides. *Biotechnology*, 28, 129–171.

Legends to Figures

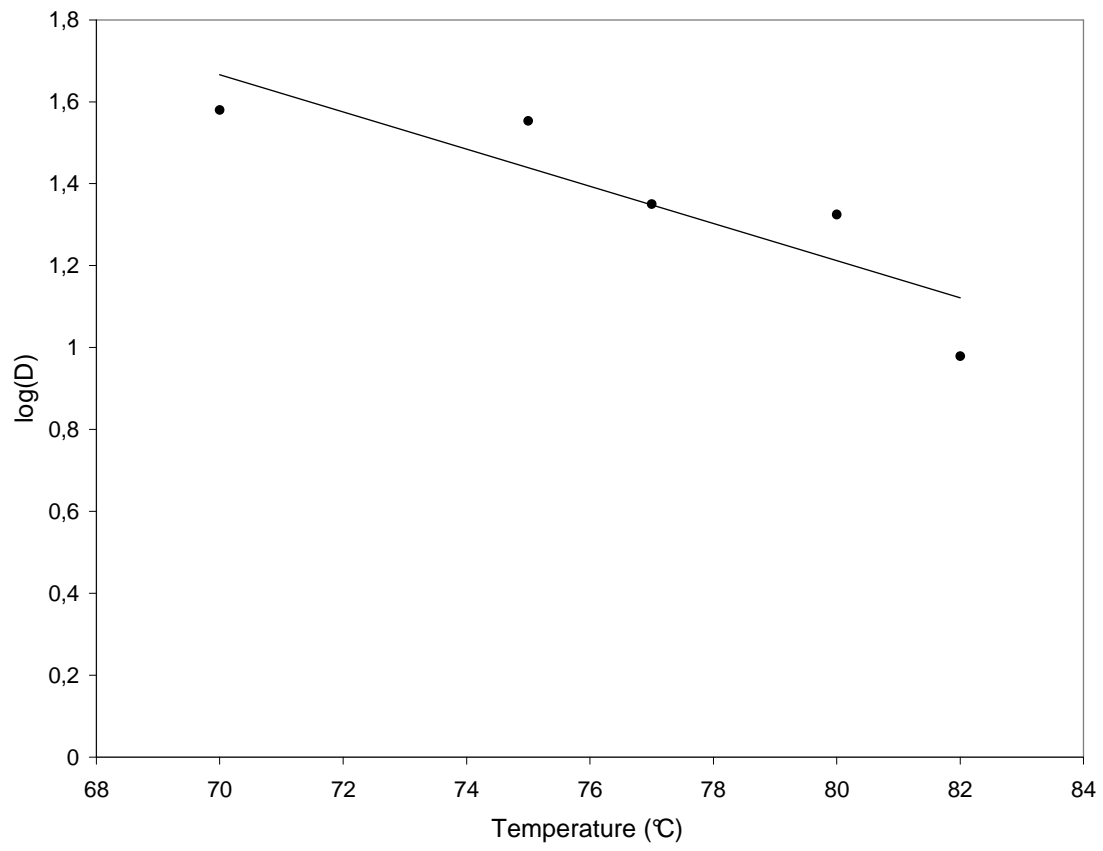
Fig. 1. Thermal inactivation kinetic of cerein 8A at 70 (\diamond), 75 (\square), 77 (Δ), 80 (o), 82 (x) °C. Values are the means of three independent experiments. The standard deviations were always lower than 5%.

Fig. 2. Variation of the decimal reduction time (D) with temperature for cerein 8A. The regression equation was determined as $y = -0.0454x + 4.842$ ($r^2 = 0.7698$).

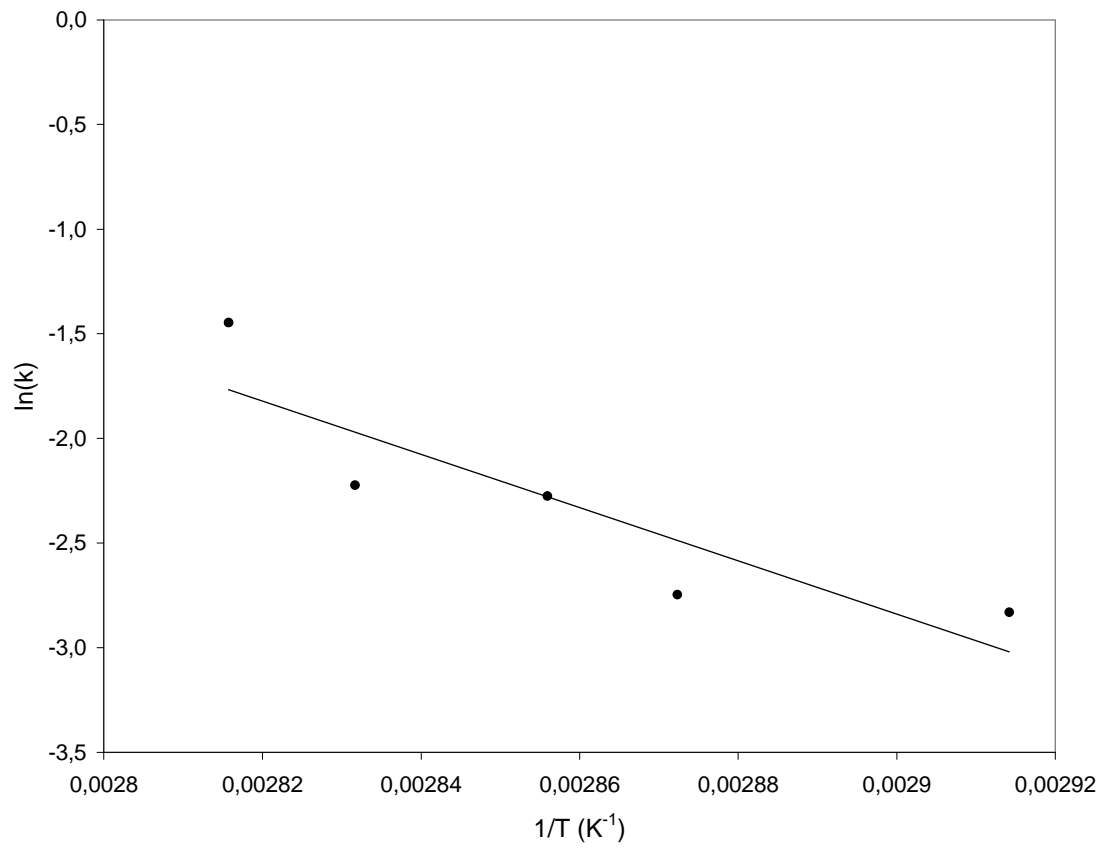
Fig. 3. Arrhenius plot of inactivation rates of cerein 8A. The regression equation was determined as $y = -12717x + 34.04$ ($r^2 = 0.7782$).



Lappe et al., Fig. 1.



Lappe et al., Fig. 2



Lappe et al., Fig. 3

Table 1. Kinetics parameters of thermal inactivation of cerein 8A.

Temperature (°C)	k (min ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	z (°C)
70	0.059 ± 0.009^a	0.9027	11.75	39.04	
75	0.064 ± 0.006	0.9622	10.80	35.87	
77	0.103 ± 0.015	0.9084	6.74	22.40	21.98
80	0.108 ± 0.008	0.9744	6.40	21.27	
82	0.235 ± 0.036	0.8973	2.94	9.78	

^a Standard error of regression (95% confidence interval)

Table 2. Thermodynamic parameter values of thermal inactivation of cerein 8A activity.

ΔE (kJ mol ⁻¹)	ΔH^* (kJ mol ⁻¹)	ΔG^* (kJ mol ⁻¹)	ΔS^* (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
105.7	102.8	104.7	-5.39

3.2 Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A and chelating agents

3.2.1 ABSTRACT

The ability of the bacteriocin cerein 8A to inhibit *Salmonella* Enteritidis in combination with EDTA and sodium lactate was investigated. *Salm.* Enteritidis was incubated with combinations of cerein 8A (3200 AU/mL) and EDTA (20, 50, 100 mmol/L) or sodium lactate (200 mmol/L). All treatments caused a significant reduction in the OD600 values of *Salm.* Enteritidis cultures. The addition of cerein 8A plus EDTA resulted in higher inhibition in comparison with the bacteriocin alone; the greater the concentration of EDTA, the greater the inhibitory effect. The combination of cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA results a more efficient treatment to reduce the number of viable cells of *Salm.* Enteritidis. The combination of cerein 8A plus sodium lactate also showed significant inhibition of the indicator organism. Transmission electron microscopy showed damaged cell walls and loss of protoplasmic material in treated cells. The cells of *Salm.* Enteritidis treated with cerein 8A plus EDTA appeared more injured. The bacteriocin cerein 8A may be useful to inhibit Gram-negative bacteria, with enhanced effect in combination with chelating agents. Control of *Salm.* Enteritidis, a Gram-negative bacterium constantly linked to food outbreaks, addresses an important aspect of food safety.

Key words: antimicrobial peptide; bacteriocin; *Bacillus cereus*; *Salmonella* Enteritidis; transmission electron microscopy.

3.2.2 INTRODUCTION

Bacteriocins are antimicrobial peptides widespread produced by bacteria. Those produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of intensive investigation because of their potential use as biopreservatives in the food industry (O'Sullivan et al., 2002). These compounds have been effectively characterized and tested in food systems to combat pathogenic and spoilage microorganisms. Several bacteriocins from LAB have been studied as natural additives in the food industry and as antimicrobials in pharmaceutical purposes (Bower et al., 2001; Papagianni and Anastasiadou, 2009). Nisin is the most well characterized bacteriocin and its use in food is permitted in more than 40 countries (Cleveland et al., 2001; Galv ez et al., 2007). Many studies have demonstrated that the bacteriocins pediocin and nisin can reduce or inhibit *Listeria monocytogenes* in dairy products, particularly in pasteurized cheeses (Deegan et al., 2006; Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008).

Despite the intensive work on LAB, *Bacillus* is another interesting genus to investigate for antimicrobial peptides since this genus includes a variety of industrially important species and has a history of safe use in food and industry (Pedersem et al., 2002). The production of bacteriocins or bacteriocin-like substances (BLS) has been already described for many *Bacillus* species such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus*, among other (von Döhren, 1995; Stein, 2005).

B. cereus 8A was isolated from soils of native woodlands of Southern Brazil. This strain produces a bacteriocin, cerein 8A, which inhibits several pathogenic and foodspoilage microorganisms (Bizani and Brandelli, 2002). This substance has a bactericidal effect on *Listeria monocytogenes* and *B. cereus*, apparently by disturbing the membrane function of target organisms (Bizani et al., 2005). Preliminary studies suggested that cerein 8A could inhibit *Salmonella* as well (Bizani et al., 2005).

The efficacy of many antimicrobial peptides to inactivate Gram-positive pathogens and spoilage organisms such as *L. monocytogenes* and *Clostridia* is well established (Cleveland et al., 2001; O'Sullivan et al., 2002). However, Gram-negative spoilage and pathogenic bacteria are especially problematic in food protection due to their inherent resistance to some antimicrobials that are applicable or present in foods (Helander et al., 1997). The architecture of the outer membrane (OM) of Gram-negative microorganisms prevents the penetration of many bacteriocins to their target, the cytoplasmic membrane, and therefore confers a high degree of resistance (Stevens et al., 1991; Schved et al., 1994). Chelating agents such as EDTA as well as the application of sublethal stress such as heating or freezing were shown to disrupt the permeability barrier of the OM leading to an increased sensitivity of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* towards nisin (Stevens et al., 1991; Kalchayanand et al., 1992).

Human salmonellosis occurs mainly due to consumption of food and water contaminated with *Salmonella* spp. Several foods have been associated with this infection. However, in recent years an increase of human salmonellosis due to the serotype Enteritidis was observed throughout the world, mainly related to chicken eggs and derivatives (Geimba et al., 2004). Although the combination of nisin with chelating agents to combat *Salmonella* has been investigated, studies with other antimicrobial peptides are scarce (Galv ez et al., 2007). The aim of this work was to investigate the effect of the bacteriocin cerein 8A in combination with EDTA and sodium lactate against *Salm. enterica* serotype Enteritidis, a Gram-negative bacterium constantly linked to food outbreaks.

3.2.3 MATERIALS AND METHODS

3.2.3.1 Bacterial strains

The producer strain was *B. cereus* 8A, isolated and characterized as described by Bizani and Brandelli (2002). The indicator strains *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 were stored in 20% glycerol at -21°C , and propagated twice in BHI broth (Becton & Dickinson, Cockeysville, MD, USA) before use.

3.2.3.2 Bacteriocin preparation and activity

B. cereus 8A was grown in BHI broth at 30°C in a shaker at $125\text{ cycles min}^{-1}$ for 32 h. The culture was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min. The bacteriocin was purified from crude supernatant as described previously (Bizani et al. 2005). Briefly, ammonium sulfate was added to reach 70% saturation. The resulting pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS; 5 mmol l^{-1} sodium phosphate, 150 mmol l^{-1} NaCl, pH 7.4) and extracted with 1-butanol (0.7 vol.). After butanol evaporation, the bacteriocin was stored at 4°C until its use for antimicrobial assays. The antimicrobial activity of the bacteriocin was assessed by agar disc diffusion assay. Aliquots ($20\text{ }\mu\text{l}$) of the bacteriocin preparation were applied onto 6-mm cellulose discs on agar plates previously inoculated with a 0.5 McFarland suspension of the indicator strain. Inhibition zones were measured after incubation at 37°C for 24h. The bacteriocin titer was calculated by the serial dilution method (Motta and Brandelli, 2002).

3.2.3.3 Chelators

The chelators used were disodium EDTA (Riedel, Hannover, Germany) and sodium lactate (Sigma, St. Louis, MO, USA). Stock solutions (1 mol l^{-1}) were prepared by dissolving the chelator in deionized water and were sterilized by autoclaving.

3.2.3.4 Growth determination

Viable cell counts, expressed as colony-forming units (cfu ml^{-1}), were determined as described previously (Motta and Brandelli, 2002). Bacterial suspensions were diluted to 10^{-6} in $8.75 \text{ g NaCl l}^{-1}$; the samples were homogenized and then loaded ($20 \mu\text{l}$) in triplicate onto nutrient agar (Becton Dickinson) plates. The plates were incubated at 37°C for 24 h, and 30–100 colonies were counted. In parallel, the optical density of the cultures at 600nm (OD_{600}) was measured.

3.2.3.5 Effect of cerein 8A and chelators against the *Salmonella* Enteritidis

An overnight culture of *S. Enteritidis* was obtained by growing the respective bacteria in BHI medium at 37°C . Then, 1.0 ml was transferred to 250 ml Erlenmeyer flask containing 99 ml of medium and incubated in a shaker at $125 \text{ cycles min}^{-1}$ for 24 h at 37°C . Growth was monitored by viable cell counts (cfu ml^{-1}) to 10^6 CFU ml^{-1} . Aliquots of 1ml were centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min. Then the pellet obtained before used in antimicrobial assay. The pellets obtained were treated with bacteriocin alone in concentration of 3200 activity units (AU ml^{-1}), with EDTA alone in concentrations of 20, 50 and 100 mmol l^{-1} and with sodium lactate 200 mmol l^{-1} . To evaluate the synergistic effect of chelating in the action of bacteriocin, was added bacteriocin in combination with the three concentrations of EDTA (20, 50 and 100

mmol l⁻¹) and with sodium lactate 200 mmol l⁻¹. Cells treated with peptone medium served as controls. All treatments were incubated for 90 min at 37°C and were carried out in triplicate. Effects of cerein 8A on *Salmonella* Enteritidis were evaluated by turbidity (OD₆₀₀), the number of viable cells after the incubation period. Synergic effect (SE) was defined by the following equation:

$$SE = (\log \text{reduction activity of mixture}) / (\sum \text{individual activities})$$

3.2.3.6 Transmission electron microscopy

Samples were taken from all treatments and control after the incubation period. Cells were harvested by centrifugation and washed twice with 0.1 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 7.3). The cells were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 2.0% (v/v) formaldehyde in 0.12 mol l⁻¹ phosphate buffer for 10 days and then postfixed in 2% (w/v) osmium tetroxide in the same buffer for 45 min. The samples were dehydrated in a graded acetone series (30–100%) and embedding in Araldite-Durcupan for 72 h at 60°C. Thin sections (microtome UPC-20, Leica) were mounted on grids, covered with collodion film, and poststained with 2% uranyl acetate in Reynold's lead citrate. All preparations were observed with a JEOL JEM 1200ExII electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 120 kV.

3.2.4 RESULTS

Cerein 8A preparation showed inhibitory zones as predicted against the indicator strain *B. cereus* ATCC 14579, with an activity of 6400 AU/mL. The inhibition of *Salm.* Enteritidis by the action of cerein 8A, EDTA and sodium lactate was first monitored by measurement of the optical density at 600 nm after the incubation period of 90 min (Fig.

1). The results indicated that all treatments tested, namely EDTA, sodium lactate and cerein 8A, alone and in combination, caused a significant reduction in the OD₆₀₀ values of *Salm. Enteritidis* cultures. When a cell suspension of *Salm. Enteritidis* was treated with 3200 AU/mL cerein 8A the OD₆₀₀ values were much lower than those of the controls without bacteriocin. The addition of bacteriocin plus all concentrations tested of EDTA or sodium lactate resulted in greater inhibition than obtained with the bacteriocin alone. The efficiency in reducing OD₆₀₀ of cell suspensions of *Salm. Enteritidis* by the action of bacteriocin has increased as the concentration of EDTA increased. The treatment with cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA proved to be more effective. The combination of cerein 8A plus sodium lactate also showed significant inhibition of the indicator organism (Fig. 1).

The effect of cerein 8A and combinations with EDTA and lactate on the survival of *Salm. Enteritidis* was also observed by measurement of viable cell counts. All treatments caused a decrease in the number of viable cells (Fig. 2). When a cell suspension of *Salm. Enteritidis* was treated with cerein 8A the viable counts were lower than those of the controls without bacteriocin. The addition of bacteriocin plus EDTA resulted in higher inhibition in comparison with the bacteriocin alone; the greater the concentration of EDTA, the greater the inhibitory effect. Although a similar trend was observed, these reductions were not always correlated with those observed for OD measurements, indicating that different inhibitory mechanisms or different proportions of injured cells might be involved among the treatments. The log reductions in viable cells and the synergistic effect (SE) of cerein 8A plus chemicals were calculated (Table 1). The combination of cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA results a more efficient treatment to reduce the number of viable cells of *Salm. Enteritidis* (Table 1). Reductions of more than 2 log cycles in viable counts were observed in all treatments consisting of

bacteriocin plus chemical. Higher SE was observed for cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA (Table 1).

Salmonella Enteritidis harvested from a 10^6 CFU/mL culture were incubated for 90 min with cerein 8A and chemicals. After incubation, the microorganisms were separated and prepared for transmission electron microscopy. The results can be visualized in Fig. 3. Control cells showed integrity and absence of detectable injury. The treated cells showed vesiculization of the protoplasm, pore formation, and in some cases, complete disintegration of the cells. The cells of *Salm.* Enteritidis treated with cerein 8A alone showed small pores and the treatment does not affect the majority of cells. When the chelating agent EDTA was added the cells appeared more damaged. The injuries in cell wall become more marked with the combination of EDTA plus cerein 8A, including noticeable discharge of intracellular material, as shown for treatments with 50 and 100 mmol l/L EDTA plus cerein 8A. Combination of cerein 8A with sodium lactate caused similar injury in *Salm.* Enteritidis cells (Fig. 3).

3.2.5 DISCUSSION

Cerein 8A, an antimicrobial peptide produced by *B. cereus* 8A showed inhibitory activity against pathogenic and spoilage Gram-positive bacteria (Bizani and Brandelli, 2002). The results of this work indicate that this substance is also inhibitory against *Salm.* Enteritidis. This effect was clearly improved with the addition of EDTA and sodium lactate. EDTA alone, in all concentrations, reduced the number of viable cells of *Salm.* Enteritidis and their effect on increased permeability of the cells could be observed, where the increased concentration of EDTA reflected in increased damage to the cells. Chelating agents are compounds capable to destabilize the structure and alter the permeability of the OM (Vaara, 1992). Substances like EDTA, which bind

magnesium ions in the lipopolysaccharides (LPS) layer, and membrane-disrupting agents such as trisodium phosphate, have been shown to be effective against *Salmonella* spp. (Shefet et al., 1995) and *Campylobacter* spp. (Slavik et al., 1994) in both poultry products and pure culture (Somers et al., 1994).

The transmission electronic microscopy showed pores on the cell envelope of *Salm.* Enteritidis caused by cerein 8A, which justified the reduction in the number of viable cells. The improved effect of EDTA on the activity of cerein 8A could be verified by the noticeable reduction in the number of viable cells and supported by transmission electron microscopy, where the effects of this synergism resulted in remarkable pore formation, loss of intracellular contents and in some cases, destruction of the cells. In this case, extensive cell damage is most likely due to weakening of the OM following sequestration of magnesium ions by the chelating agents (Montville and Bruno, 1994). Electron microscopy studies on *E. coli* O157:H7 and *Salm. typhimurium* treated with the bacteriocins nisin and pediocin AcH following pressurization showed extensive changes on the cell surface topography and morphology, indicating damage to the cell envelope (outer- and innermembranes). Similar changes were observed for both bacteriocins (Kalchayanand et al., 2004).

The combined effect of bacteriocins with chelating agents has been investigated on basis of the hurdle concept (Cleveland et al., 2001). Combinations of nisin with chelators or physical disruption of the cells have been successfully applied to kill *E. coli* (Kalchayanand et al., 1992; Shefet et al., 1995). The bacteriocins nisin and lactocin 705/AL705 inhibited *E. coli* in combination with 500 and 1000 mmol l⁻¹ EDTA and 800 mmol l⁻¹ sodium lactate (Belfiore et al., 2007). These elevated concentrations may be necessary if the bacteriocin source contains high levels of Ca²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺ ions coming from the culture medium (e.g. supernatant concentrates). High concentrations of

chelators may be also necessary to remove exogenous divalent cations associated with food systems and still be effective enough to destabilize the OM of Gram-negative bacteria present.

The combined effect of chelators on Gram-negative bacteria is mostly associated with LAB bacteriocins, and reports on other antimicrobial peptides are scarce (Motta et al., 2008). Cerein 8A was effective with relatively lower dose of EDTA or sodium lactate, possibly because it had an inhibitory effect on *Salmonella* by itself, contrarily to that observed with nisin and other LAB bacteriocins (Belfiore et al., 2007; Galv ez et al., 2007).

The mechanisms of action of peptide antibiotics are diverse, but the bacterial membrane is the target for most bacteriocins (Cleveland et al., 2001). Cerein 8A caused a significant growth inhibition of *Salm. Enteritidis*, suggesting a bactericidal mode of action. The simultaneous decrease in the OD also indicates the cells were lysed. Similarly, the bacteriolytic effect of the bacteriocin linenscin OC2 on *Listeria innocua* was observed by noteworthy decrease in OD readings (Boucabeille et al., 1997). Transmission electron microscopy showed damaged cell walls and loss of protoplasmic material. These results suggest that the mode of action of cerein 8A is to interfere with cell membranes. The mechanism of interaction of antimicrobial peptides with Gram negative bacteria has been proposed. The initial association with the bacterial membrane occurs through electrostatic interaction with the LPS in the outer membrane leading to membrane perturbation. The cationic peptides displace Mg^{2+} and Ca^{2+} cations from the negatively charged LPS leading to a local disturbance in the outer membrane. This facilitates the formation of destabilized areas through which the peptide translocates the outer membrane in a process termed self-promoted uptake (Powers and Hancock, 2003).

Our results corroborate that the inhibitory activity of cerein 8A on Gram-negative bacteria can be enhanced when the OM is altered by chemical treatment with chelating agents. The treatment with EDTA in combination with cerein 8A result the most effective strategy against *Salm. Enteritidis* and may be valuable in controlling this bacterium in food.

3.2.6 RESUMO

A capacidade dos quelantes EDTA e lactato de sódio em diferentes concentrações e da cereína 8A (3200 UA/ml⁻¹) produzido por uma linhagem de *B. cereus* 8A isolado de solo em inibir e inativar a *Salmonella* Enteritidis foram analisadas neste trabalho. Os resultados indicaram que todos os tratamentos testados, EDTA, lactato de sódio e cereína 8A, sozinhos e em combinação, causaram uma redução significativa nos valores de OD₆₀₀ em culturas de *S. Enteritidis*. Quando uma suspensão de células de *S. Enteritidis* foi tratada com cereína 8A 3200 AU ml⁻¹ a contagem de células viáveis e os valores OD₆₀₀ foram inferiores aos do controle sem bacteriocina. A adição de bacteriocina acrescida de EDTA resultou em inibição mais elevada em comparação com o bacteriocina sozinha; a maior concentração de EDTA resultou no maior efeito inibitório. A combinação de cerein 8A acrescido EDTA 100 mol l⁻¹ resultou em um tratamento mais eficaz para reduzir o número de células viáveis de *S. enteritidis*. A microscopia de eletrônica de transmissão revelou paredes de células danificadas e perda de materiais protoplasmáticos nas células tratadas. As células de *S. enteritidis* tratadas com 8A cereína sozinha mostraram pequenos poros e o tratamento não afetou a maioria das células. Quando o agente quelante EDTA foi adicionado, as células mostraram-se mais danificadas. As lesões na parede celular tornaram-se mais intensas com a combinação de cereína 8A acrescida de EDTA, inclusive demonstrando uma notável perda do material intracelular, como observado nos resultados dos tratamentos com EDTA 50 e 100 mmol l⁻¹ mais cereína 8A. Estes resultados sugerem que o modo de ação da cereína 8A é a interferência com membranas celulares e a parede celular.

3.2.7 REFERENCES

- Bizani D., Brandelli A. (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *Journal Applied Microbiology* 93, 512–519.
- Bizani D., Motta A. S., Morrissy J.A.C., Terra R.M., Souto A.A., Brandelli A. (2005) Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology* 8, 125–131.
- Brigmon, R.L.; Zam, S.G.; Wilson, H.R. (1995) Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs and chicken with enzyme-linked immunosorbent assay. *Poultry Science* 74, 1232-1236.
- Cladera-Olivera F., Caron G.R., Brandelli A. (2004) Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 21, 53–58.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1–20.
- De Vuyst L., Callewaert R., Crabbé K. (1996) Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142, 817–827.
- Hammes, W.P., Hertel, C. (1998) New developments in meat starter cultures. *Meat Science* 149, 125–138.
- Helander, I.M., von Wright, A., Mattila-Sandholm, T.-M. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Science Technology* 8, 146–150.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B. (1992) Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Letters Applied Microbiology* 15, 239–243.
- Klaenhammer T. (1993) Genetics of bacteriocins produce by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12, 39-85.
- Kolter R., Moreno F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annual Review Microbiology* 46, 141-163.
- Milles H., Lesser W., Sears P. (1992) The economic implication of bioengineering mastitis control. *Journal Dairy Science* 75, 596-605.

- Montville T.J., Bruno M.E.C. (1994) Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *International Journal Food Microbiology* 24, 53-74.
- Motta A.S., Brandelli A. (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal Applied Microbiology* 92, 63-70.
- Muriana, P.M. (1996) Bacteriocins for control o *Listeria* spp. in food. *Journal Food Protection* (Suppl), 54-63.
- O'Sullivan, Ross, R.P., Hill, C. (2002) Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593–604.
- Pedersem, P.B., Bjornvad, M.V., Rasmussen, M.D., Petersen, J.N. (2002) Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36, 155–161.
- Schved, F., Henis, Y., Juven, B.J. (1994) Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *International Journal Food Microbiology* 21, 305–314.
- Shefet, S.M., Sheldon, B.W., Klaenhammer, T.R. (1995) Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit *Salmonella typhimurium* and extend shelf life of broiler carcasses. *Journal Food Protection* 58, 1077–1082.
- Slavik, M. F., Kim, J., Pharr, M. D., Raben, D. P., Tsai, S. and Lobsinger, C.M. (1994) Effect of trisodium phosphate on *Campylobacter* attached to post-chill chicken carcasses. *Journal Food Protection* 57, 324-326.
- Somers, E. B., Schoeni, J. L. and Wong, A. C. L. (1994) Effects of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *International Journal Food Microbiology* 22, 269-276.
- Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845–857.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. (1991) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 57, 3612–3615.
- Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331–345.

Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane.

Microbiology Review 56, 395–411.

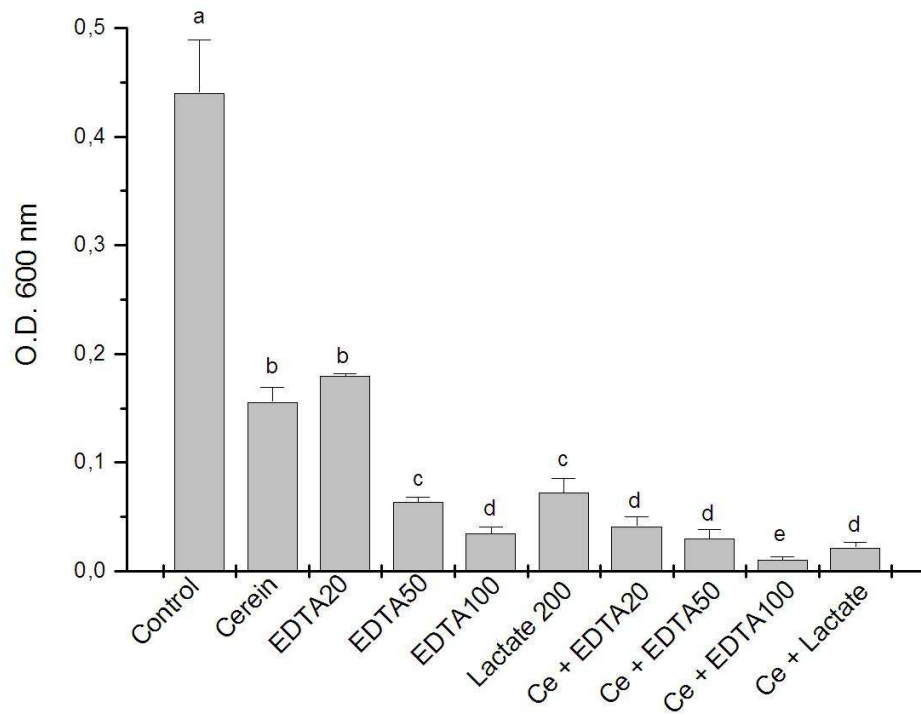
Von Döhren, H. (1995) Peptides. *Biotechnology* 28, 129–171.

FIGURE LEGENDS

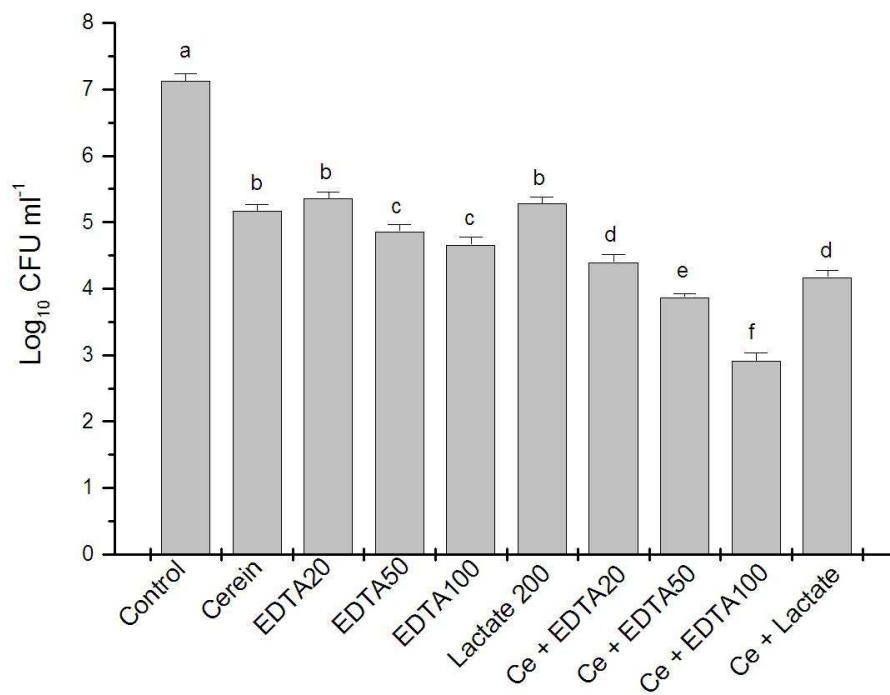
Fig. 1. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A and chelators. Cells were incubated with 3200 AU ml⁻¹ cerein 8A (Ce), EDTA (20, 50 and 100 mmol l⁻¹), and sodium lactate (200 mmol l⁻¹) alone or in combination. Optical density was monitored in control and treated cells was monitored after 90 min. Bars are the mean \pm SEM of three independent experiments.

Fig. 2. Effect of cerein 8A and chelators on viability of *Salmonella* Enteritidis. Cells were incubated with 3200 AU ml⁻¹ cerein 8A (Ce), EDTA (20, 50 and 100 mmol l⁻¹), and sodium lactate (200 mmol l⁻¹) alone or in combination. Viable cell counts were determined after incubation. Bars are the mean \pm SEM of three independent experiments.

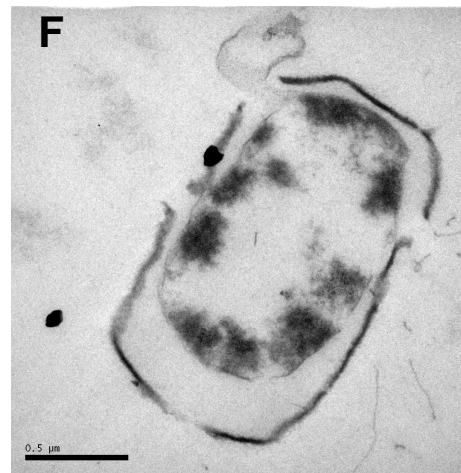
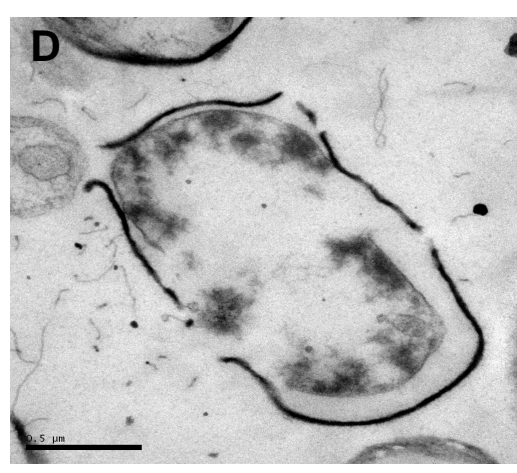
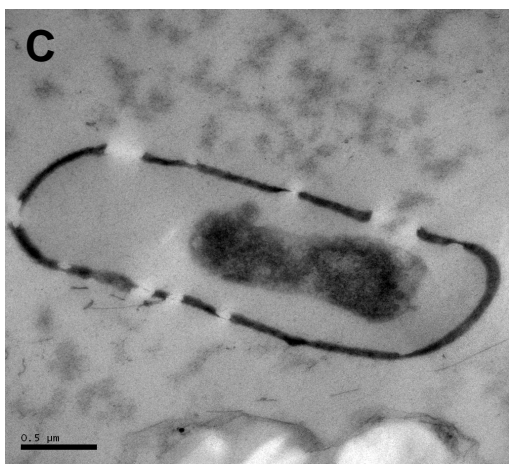
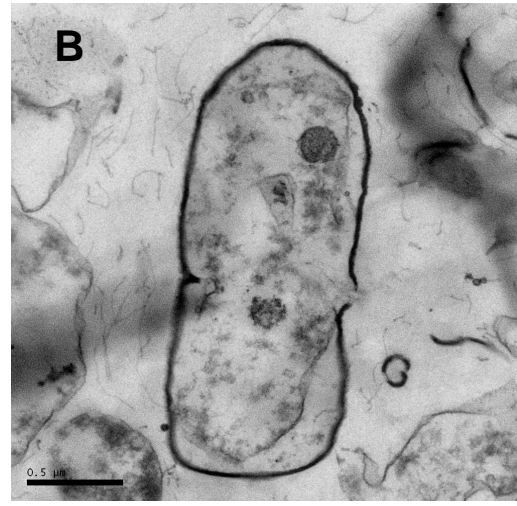
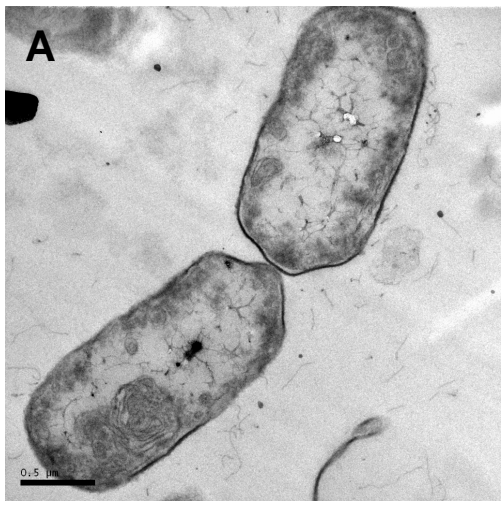
Fig. 3. Transmission electron microscopy of cells of *Salmonella* Enteritidis after treatments: (A) Control, (B) cerein 8A, (C) 50 mmol l⁻¹ EDTA, (D) 100 mol l⁻¹ EDTA, (E) cerein 8A plus 20 mmol l⁻¹ EDTA, (F) cerein 8A plus 50 mol l⁻¹ EDTA, (G) cerein 8A plus EDTA 100mM, (H) cerein 8A plus 200 mmol l⁻¹ sodium lactate.

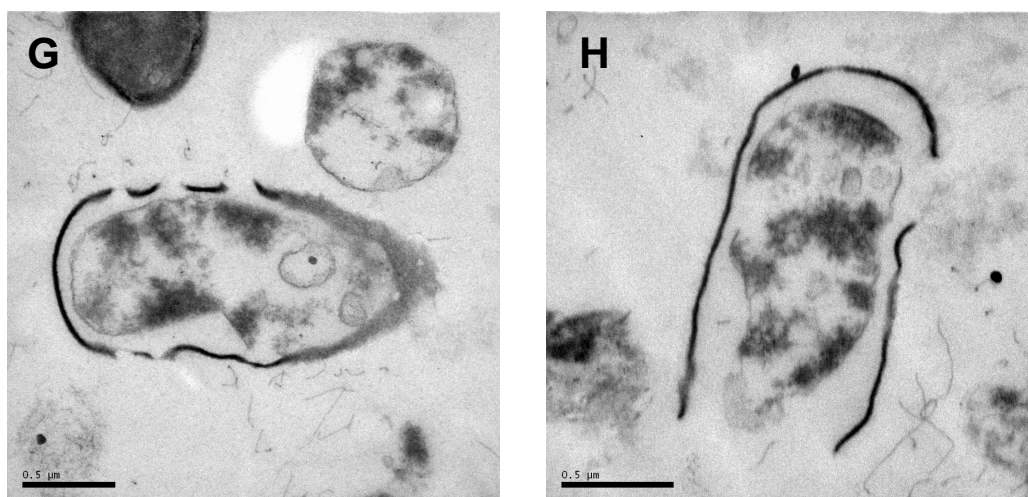


Lappe et al., Fig. 1



Lappe et al., Fig. 2





Lappe et al., Fig. 3

Table 1. Reduction of viable counts of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A in combination with EDTA and sodium lactate.

Chelating agent	Log ₁₀ reduction		
	Alone	Plus cerein 8A	Synergic effect
None	0	1.38	-
EDTA (20) ^a	1.77	2.69	0.85
EDTA (50)	2.27	3.26	0.89
EDTA (100)	2.47	4.22	1.10
Lactate (200)	1.85	2.96	0.92

^a concentration expressed as mmol l⁻¹; cerein 8A was used at 3200 AU ml⁻¹.

3.3 Extraction of the antimicrobial peptide cerein 8A by aqueous two-phase systems and aqueous two-phase micellar systems

3.3.1 Abstract

Cerein 8A is an antimicrobial peptide with potential application against food spoilage and pathogenic bacteria. A cost-effective protocol to purify this bacteriocin, resulting in the removal of impurities and contaminants is necessary. This work investigated the partitioning of cerein 8A in two liquid–liquid extraction systems that are considered promising for bioseparation and purification purposes. In aqueous two phase micellar systems Triton X-114 was chosen as the phase-forming surfactant. Aqueous two-phase systems (ATPS) were prepared with PEG and inorganic salts and the addition of sodium chloride was investigated in this system. Results indicated that cerein 8A partitions preferentially to the micelle rich-phase in a 4% Triton X-114 medium and its antimicrobial activity was preserved. In aqueous two-phase systems, the best results concerning to the partition coefficients (K_b) were obtained with PEG + ammonium sulphate. The value of K_b increase significantly to this system when sodium chloride was added and the best recovery yield was obtained when compared with micellar systems. The conventional purification resulted a higher purification fold, but with decreased recovery. The successful implementation of this peptide partitioning, from a suspension containing other compounds, represents an important step towards developing a separation method for cerein 8A, and more generally, for other biomolecules of interest.

Keywords: Cerein 8A; aqueous two-phase micellar system; aqueous two-phase system; protein purification; antimicrobial activity

3.3.2 Introduction

Bacteriocins are antibacterial proteins or peptides that inhibit bacterial growth. Many bacterial species produce peptide antibiotics, called bacteriocins, which often have an antimicrobial effect on closely related organisms [1-3]. These compounds have been extensively studied because of their potential applications in the food industry as natural biopreservatives and in pharmaceuticals as antimicrobials [4,5]. Bacteriocins produced by lactic-acid bacteria have been the focus of many investigations because of their particular importance in the dairy industry [6].

Several bacteriocins or bacteriocin-like molecules have been described for *Bacillus* spp., including coagulins [7], cerein 7 [8], subtilosin [9], and thuricin 7 [10], and some of them have a broad spectrum of antibacterial activity. *Bacillus cereus* 8A, isolated from soils of native woodlands of southern Brazil, has antagonistic action against several pathogenic and food-spoilage microorganisms, such as *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, pathogenic bacterium involved in bovine mastitis [11], and against *Salmonella* Enteritidis.

Different strategies for bacteriocins purification from complex broths have been investigated, exploiting specific characteristics of the target biomolecule. Laboratory scale purification for cerein 8A includes a sequential precipitation, extraction and ion-exchange chromatography [12].

These conventional multi-step methods requires expensive equipments at each step, making them laborious, time consuming, with low reproducibility and may result in significant loss of the desired product [13, 14].

In the search for alternative methods, liquid-liquid extraction applications have been used in different areas such as target protein extraction from unclarified microorganism culture [15, 16], large scale separation of proteins [17], among other

[18-23]. Further more, a large number of articles have been published covering a wide range of applications of aqueous liquid/liquid two-phase extraction, including the separation of macromolecules, cell organelles and viruses [24, 25].

Various liquid–liquid extraction methods that use different types of aqueous two-phase complex-fluid systems have been proposed to address a wide variety of separation needs in the chemical, biotechnological, and environmental fields. In general, these methods offer versatility, scalability, cost effectiveness, and environmental friendliness as compared to the conventional methods. In the biotechnology field, it has been suggested that extractions in two-phase aqueous complex-fluid systems can be used instead of, or complementary to more typical chromatographic operations, to reduce the cost of the downstream processing of many biological products [18, 26].

Aqueous liquid/liquid two-phase extraction has been developed since the mid 1950s as a mild separation method of wide applicability within biochemistry, cell biology and biotechnology. Aqueous two-phase systems (ATPS) are formed when two incompatible polymers or one polymer and an inorganic salt are mixed in water above certain critical concentrations. The most common systems are poly (ethylene glycol) (PEG)/dextran and PEG/salt systems. The phases are characterized by high water content (80/90%) and low interfacial tension. Compared with other commonly used separation and purification techniques, partitioning in aqueous two-phase systems have a number of advantages, such as an easy scale-up and the ability to handle particulate materials and process streams continuously [24, 27].

In particular, aqueous two-phase micellar systems, formed by some surfactants at certain conditions, have been proposed as an attractive option, to be used in bioseparations [28]. The difference between the physicochemical environments in the micelle-rich phase and in the micelle-poor phase forms the basis of an effective

separation and makes aqueous two-phase micellar systems a convenient and potentially useful method for the separation, purification, and concentration of biomaterials [29]. An aqueous solution of the nonionic surfactant octylphenol ethoxylate (Triton X-114), for example, undergoes macroscopic phase separation in temperature above its “cloud-point”, resulting in a bottom, micelle-rich phase and a top, micelle-poor phase.

In the present work, we report the partitioning of cerein 8A in ATPS composed by PEG and different salts and the influence of the addition of sodium chloride. It was also investigated the partitioning behavior of the biomolecule cerein 8A in simple aqueous two-phase micellar system formed only by the nonionic surfactant, Triton X-114.

3.3.3 Materials and methods

3.3.3.1 Bacteria

The producer strain *B. cereus* 8A, isolated from soil of native woodlands of south of Brazil, was characterized elsewhere [11]. Indicator strain was *B. cereus* ATCC 14579. The bacteria were kept frozen at -21°C in BHI broth (Merck, Darmstadt, Germany) containing 20% (v/v) glycerol and propagated twice in BHI broth before using.

3.3.3.2 Bacteriocin preparation and protein assay

B. cereus 8A was grown in 150 mL BHI broth at 30°C in a shaker at 125 cycles/min for 28 h. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 ×g for 15 min. and the culture supernatant was filtered through a 0.22-μm membrane (Millipore, Bedford, MA). The supernatant containing cerein 8A was used in the experiments of partition. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) [30].

3.3.3.3 Detection of antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the supernatant was assessed by agar disc diffusion assay. Aliquots (20 μ l) of the bacteriocin preparation were applied onto 6-mm cellulose discs on agar plates previously inoculated with a 0.5 McFarland suspension of the indicator strain. Inhibition zones were measured after incubation at 37°C for 24h. The bacteriocin titer was calculated by the serial dilution method [31].

3.3.3.4 Purification protocol

Bacillus cereus 8A was cultivated aerobically in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 150 ml of BHI broth at 30°C, 125 cycles min^{-1} for 28 h. Cells were harvested by centrifugation at 10 000 g for 15 min at 4°C, and the resulting supernatant was filtered through 0.22 μ m membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). The filtrate was submitted to precipitation with ammonium sulfate to 65% saturation. The resulting pellet was resuspended in 10 ml phosphate buffered saline (PBS) and then extracted twice with 6 ml of 1-butanol. The organic phases were combined and evaporated under reduced pressure. The resulting powder was resuspended in 10 mmol l^{-1} phosphate pH 7.2 and applied to a Q-Sepharose column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), eluted with a gradient from 0 to 1.5 mol l^{-1} NaCl in same buffer. Fractions were monitored at 280 nm using an EM-1 EconoUV monitor (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and antimicrobial activity was determined as described above. The fractions with greater activity were pooled freeze dried, resuspended in 1 ml phosphate buffered saline (PBS) and applied to a Bio-Gel P6-DG column, equilibrated with PBS. Fractions were collected and evaluated for protein concentration (A280) and antimicrobial activity.

3.3.3.5 Aqueous two-phase system preparation

Aqueous two-phase systems were prepared from stock solutions of PEG (50% w/v) and potassium phosphate, sodium sulfate, ammonium sulfate and sodium citrate solutions (50% w/v). The compounds were mixed to form 8 ml of a system having a final concentration of 25%, pH 7,0.

3.3.3.6 Partitioning by ATPS

Two ml of *B. cereus* 8A culture supernatant was mixed into the ATPS, using a Vortex for 30s to form a system having a final concentration of 20% of PEG and salts and total system volume at 10 ml. All systems were prepared in graduated centrifuges tubes. Phase separation was achieved by centrifugation for 10 min at 3,000 g and maintenance of systems in the refrigerator at 4°C for 3 h. After this, the two phases become clear and transparent and the interface was well defined. A known volume of each phase was carefully collected and the activity was determined. The partition coefficient of the cerein 8A was defined as the protein concentration (K_p) or bacteriocin activity (K_b) in the upper phase divided by the correspondent value in the bottom phase, as shown in Eqs. (1) and (2):

$$K_p = C_T/C_B \quad (1)$$

$$K_b = A_T/A_B \quad (2)$$

where C_T and C_B are the total protein concentration in mg/ml of the upper and bottom phases, respectively, and A_T and A_B are the bacteriocin activity in the upper and bottom phases, respectively.

3.3.3.7 Partitioning of cerein 8A in Triton X-114 aqueous two phase micellar systems

Triton X-114 surfactant at a final concentration of 2%, 4% and 6% was mixed with supernatant to a total system volume at 10 ml. The resulting solutions were well mixed for manual inversion. Subsequently, the solutions were placed in a thermo-regulated device, previously set at a temperature of 28°C. Solutions were maintained at that temperature for at least 2 h to attain partitioning equilibrium. After partitioning equilibrium was attained, the two coexisting micellar phases formed were collected separately with great care and bacteriocin activity in each micellar phase was determined as described above. The partitioning behavior was quantified in terms of partition coefficient, defined as:

$$K_{\text{cer}} = C_{\alpha}/C_{\beta} \quad (3)$$

where C_{α} and C_{β} are the bacteriocin activity in the micelle-rich (α) and in the micelle poor (β) phases, respectively (Jozala et al., 2008).

3.3.3.8 Determination of Triton X-114 influence in cerein 8A activity

Different Triton X-114 concentrations (2, 4 and 6%), with and without cerein 8A (3200 AU ml⁻¹), were tested against *B. cereus* in the agar diffusion assay, aiming to evaluate surfactant influence in cerein activity.

3.3.4 Results

3.3.4.1 Purification of cerein 8A

The antimicrobial substance produced by *B. cereus* 8A was purified from the culture supernatant. The purification steps and the recovery values of the peptide are given in Table 1. The final specific activity of the purified cerein 8A was increased approximately 13-fold compared with that in the culture supernatant and the recovery was 1.1%.

3.3.4.2 Partitioning by ATPS

The influence of different salts in combination with PEG was initially tested to evaluate the recovery of cerein 8A. Maximum yield values were obtained with the system containing ammonium sulfate (Table 2). The other salts showed very low recovery of this antimicrobial activity. The values of the partition coefficients as a function of the salts and the effect of ionic strength on the partitioning of cerein 8A by ATPS was tested by adding NaCl at 0.1 and 1 mol l⁻¹ are shown in Fig. 1. The highest value for cerein 8A partition coefficient was obtained in system containing ammonium sulfate at pH 7, the proteins partitioning preferentially to the top phase ($K > 1$). Sodium citrate showed partitioning coefficient larger than 1, but much lower when compared to the system with ammonium sulfate. The other salts showed values of K_p very close to 1 and K_b values equal to zero according to the loss of activity of bacteriocin in one of the phases (data not show). To obtain a more complete characterization of protein partition, the effect of the addition of sodium chloride to the system at two concentrations (0.1 and 1 mol l⁻¹) has been measured. Sodium chloride addition in the system containing (NH₄)₂SO₄ increased the partition coefficient (K_b) and the highest value of K_b was

obtained with 1 mol l^{-1} NaCl. The addition of 0.1 mol l^{-1} NaCl decreases the bacteriocin partition coefficients.

3.3.4.3 Partitioning by two-phase micellar system

Partitioning experiments with cerein 8A were also carried out using an aqueous two-phase micellar system with Triton X-114. Before partitioning experiments, the influence of the surfactant Triton X-114 on the indicator organism (*B. cereus* ATCC 14579) and on cerein 8A activity was determined. The presence of Triton X-114 increased up to 2-fold the cerein 8A activity (Fig. 2), while no growth inhibition of bacillus was observed with any of surfactant concentration. The partitioning of cerein 8A was carried out in three different Triton X-114 concentrations, 2, 4 and 6%. The target biomolecule was successfully extracted into the micelle-rich phase (top phase, in this particular system) (Fig. 3), probably because of its tendency to show a more hydrophobic characteristic [12]. The cerein 8A antimicrobial activity and yield recovery in the micellar-rich phase for two-phase micellar systems with Triton X-114 are described in Table 3. The results showed a decrease in antimicrobial activity and low yield recovery with 2 and 6% Triton X-114. The system containing 4% Triton X-114 maintained the initial activity of crude supernatant (3200 AU ml^{-1}), resulting in maximum recovery of cerein 8A activity, indicating the affinity of bacteriocin by the phase containing the surfactant at this concentration. Cerein 8A activity was determined and its partitioning behavior was quantified. The assays where the concentration of Triton X-114 was 2 and 6% the partitioning coefficients (K_{Cer}) were lower than 1.5, but when it was used at the concentration of 4%, the partitioning coefficient had values greater than 2.5 (Fig.4). The precision of the assays was confirmed by measuring the protein concentrations in both phases.

3.3.5 Discussion

Cerein 8A was purified by a sequential precipitation, extraction and ion-exchange chromatography protocol [12], with an additional gel filtration chromatography step, resulting in purification fold of approximately 13. In contrast, the values for ATPS and micellar systems resulted in lower purification with low yield (1-2%) (Table 4), but significantly higher yields and may be very useful to obtain a partially purified substance. Lima et al. (2002) [32] studied the purification of pectinolytic enzymes using only one liquid-liquid extraction step using the PEG/phosphate system. They obtained purification factor of 14.27 and a yield recovery of 42.3%.

The partitioning behavior of the biomolecule cerein 8A in aqueous two-phase micellar systems was investigated experimentally, showing that the target biomolecule can be extracted from its media. The greater than unity K_{Cer} values demonstrate the effectiveness of the concept of partitioning in this simple aqueous two-phase micellar system, using 4% Triton X-114 concentration. The target biomolecule was successfully extracted into the micelle-rich phase, its activity was maintained after the partitioning and showed a high yield recovery, probably because of cerein 8A is small (about 26 kDa) and show hydrophobic characteristics [33]. The excluded-volume effects, which serve to drive most biomolecules into the micelle-poor phase based on its size did not remarkably influence partition based on physico-chemical behavior of cerein 8A. From a practical point of view, this also implies that the separation method was indeed capable of extracting cerein 8A into the micelle-rich phase, while removing the majority of the impurities to the micelle-poor phase. Jozala *et al.* (2008) [34] reported the successful preferential extraction/pre-purification of nisin (the target protein), with the simultaneous removal of the impurities present either in the commercial product and in

the nisin produced in the laboratory-scale bioreactor, using 2% Triton X-114 concentration in aqueous two-phase micellar system.

In aqueous two-phase systems (ATPS) formed by one polymer and an inorganic salt, the best results for partition coefficients (K_p and K_b) were found in the system formed by ammonium sulphate as inorganic salt. The results indicate that the ATPS system is influenced by the type of inorganic salt. In all cases tested, the cerein partition coefficient was greater than 1, indicating the affinity of the cerein to upper phase of system. In ATPS with sodium citrate, the values of partition coefficient stood very close to 1, indicating to be inefficient in the process of separation, which can be confirmed through the low value recovery obtained in the system with this salt. Other salts were used but they result very low recoveries of antimicrobial activity. It is known that salt concentration alters protein partition in ATPS [35]. Ferreira et al. (2007) [36], studied proteins partition from maize malt and the maximum partition coefficient by PEG/CaCl₂ ATPS was about 4.2 and was achieved in ATPS in a single purification step. The theoretical maximum partition coefficient was between 4.1-4.3.

To obtain a more complete characterization of protein partition, the effect of the addition of sodium chloride at two concentrations (0.1 and 1 M) to the system with ammonium sulfate has been measured. Sodium chloride addition increased the partition coefficient (K_b). The highest value for K was obtained with 1 M NaCl. This means that by choosing the proper conditions, the protein partition can be manipulated. Previous publications have shown that partition coefficients can be increased quite dramatically when high concentrations of NaCl are added to ATPS, whereas other are not much affected. Lahore et al. (1995) [37] also observed the same behaviour for the partition of acid protease from *M. bacilliformis* in systems PEG-potassium phosphate with sodium chloride. This effect has been attributed to possible hydrophobic interactions [38].

Unfortunately, there is poor information about bacteriocin properties in such separation systems. The addition of NaCl also contributed to increase the protein yield recovery in the upper phase. Gunduz (2001) [39] investigated the partition behavior of pure bovine serum albumin in PEG/dextran ATPS. The concentration of NaCl and pH were considered as factors influencing K .

In conclusion, the successful implementation of protein partitioning, directly from a suspension containing the bioactive molecule, in aqueous two-phase micellar system and ATPS, presented in this paper, represents an important step towards developing a cost-effective separation method for cerein 8A or other biomolecules of interest.

3.3.6 RESUMO

Cereína 8A é um peptídeo antimicrobiano com potencial aplicação contra a deterioração de alimentos e bactérias patogênicas. Um protocolo rentável para purificar esta bacteriocina, resultando na remoção de impurezas e contaminantes é necessário. Este trabalho investigou o particionamento da cereína 8A em dois sistemas de extração líquido-líquido que são considerados promissores para fins de bioseparação e purificação. No sistema aquoso micelar bifásico, Triton X-114 foi escolhido como o tensoativo formador de duas fases. O sistema aquoso bifásico (ATPS) foi preparado com PEG e sais inorgânicos e a adição de cloreto de sódio foi analisada neste sistema. Os resultados indicaram que a cereína 8A particionou preferencialmente na fase rica em micelas no sistema com Triton X-114 na concentração de 4 % e sua atividade antimicrobiana foi preservada. Em ATPS, os melhores resultados relativos ao coeficiente de partição (K_b) foram obtidos com PEG e sulfato de amônio, quando o cloreto de sódio foi adicionado, o valor do K_b aumentou significativamente e apresentou o melhor rendimento na recuperação da atividade da bacteriocina quando comparado com os sistemas micelares. A purificação convencional resulta em um fator de purificação superior, mas tem uma recuperação menor em comparação com métodos de particionamento. A execução bem sucedida do particionamento deste peptídeo, de uma suspensão contendo outros compostos, representa um importante passo no sentido de desenvolver um método de separação para cereína 8A e de um modo mais geral, para outros biomoléculas de interesse.

3.3.7 References

- Benavides J, Mena JA, Cisneros-Ruiz M, Ramirez OT, Palomares LA, Rito-Palomares M. Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* 2006; 842:48–57.
- Bizani D, Brandelli A, Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J Appl Microbiol* 2002; 93:512-519.
- Bizani, D., Dominguez, A.P.M., Brandelli, A., Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology* 2005; 41, 269–273.
- Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein_/dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-51.
- Carlson A. Factors influencing the use of aqueous two-phase partition for protein purification. *Separ Sci Technol* 1988; 23:785-817.
- Cheigh C, Kook M, Kim S, Hong Y, Pyun Y. Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography. *Biotechnol Lett* 2004; 26:1341–5.
- Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S, Boudabous A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett Appl Microbiol* 2001; 32:243-247
- Collen A, Selber K, Hyytiä T, Persson J, Nakari-Setälä T, Bailey M, et al. Primary recovery of genetically engineered *Trichoderma reesei* endoglucanase (Cel 7B) fusion protein in cloud point extraction systems. *Biotechnol Bioeng* 2002; 78:385–394.

- Everberg H, Leiding T, Schioth A, Tjerneld F, Gustavsson N. Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis. *J Chromatogr* 2006; 1122:35–46.
- Fexby S, Nilsson A, Hambræus G, Tjerneld F, Bülöw L. Partitioning and characterization of tyrosine-tagged green fluorescent proteins in aqueous two-phase systems. *Biotechnol Prog* 2004; 20:793–8.
- Frerix A, Geilenkirchen P, Müller M, Kula MR, Hubbuch J. Separation of genomic DNA, RNA and open circular plasmid DNA from supercoiled plasmid DNA by combining denaturation, selective renaturation and aqueous two phase extraction. *Biotechnol Bioeng* 2006; 96:57–66.
- Gunduz, U. (2001), Optimization of bovine serum albumin partition coefficient in aqueous two-phase systems. *Bioseparation* 9: 277-281.
- Hurst A. Biosynthesis of the antibiotic nisin by whole *Streptococcus lactis* organisms. *J Gen Microbiol* 1966; 44:209–20.
- Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. Coagulin, a bacteriocinlike inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *J Appl Microbiol* 1998; 85:42-50
- Jozala, A. F.; Lopes, A. M.; Mazzola, P. O.; Magalhães, T. C.; Vessoni, A. P. Liquid–liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. *Enzyme and Microbial Technology* 2008; 42:107–112.
- Klaenhammer T. Genetics of bacteriocins produce by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12:39-85.
- Kolter R, Moreno F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46:141-163.

- Kula MR. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation* 1990; 1:181–9.
- Lam H, Kavooosi M, Haynes CA, Wang DIC, Blankschtein D. Affinity-enhanced protein partitioning in decyl beta-d-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnol Bioeng* 2004; 89:381–92.
- Liu CL, Kamei DT, King JA, Wang DIC, Blankschtein D. Separation of proteins and viruses using two-aqueous micellar systems. *J Chromatogr B* 1998; 711:127–38.
- Liu CL, Nikas YJ, Blankschtein D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnol Bioeng* 1996; 52:185–92.
- Mazzola PG, Lam H, Kavooosi M, Haynes CA, Pessoa Junior A, Vessoni Penna TC, et al. Affinity-tagged green fluorescent protein (GFP) extraction from a clarified *E. coli* cell lysate using a two-phase aqueous micellar system. *Biotechnol Bioeng* 2006; 93:998–1004.
- Milles H, Lesser W, Sears P. The economic implication of bioengineering mastitis control. *J Dairy Sci* 1992; 75:596–605.
- Minuth T, Hommes J, Kula MR. A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction. *Organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography. Biotechnol Appl Biochem* 1996; 23:107–13.
- Motta, A.S., Brandelli, A. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* 2002; 92, 63–70.
- Naclerio G, Ricca E, Sacco M, De Felice M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:4313–4316.

- Nikas YJ, Liu CL, Srivastava T, Abbott NL, Blankschtein D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. *Macromolecules* 1992; 25:4794–806.
- Oscáriz JC, Lasa I, Pisabarro AG. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 178:337-341.
- Rito-Palomares M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *J Chromatogr A* 2004; 807:3-11.
- Schmidt AS, Ventom AM, Asenjo JA. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb Technol* 1994;16:131-142.
- Selber K, Tjerneld F, Collen A, Hyytia T, Nakari-Setälä T, Bailey M, et al. Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem* 2004; 39:889–896.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LK. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 1976; 40:722-756.
- Tjerneld F. In: Harris JM, editor. *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*. New York: Plenum Press, 1992:85-102.
- Walter H, Brooks DE, Fisher D. *Partitioning in aqueous two phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology*. London: Academic Press, 1985.

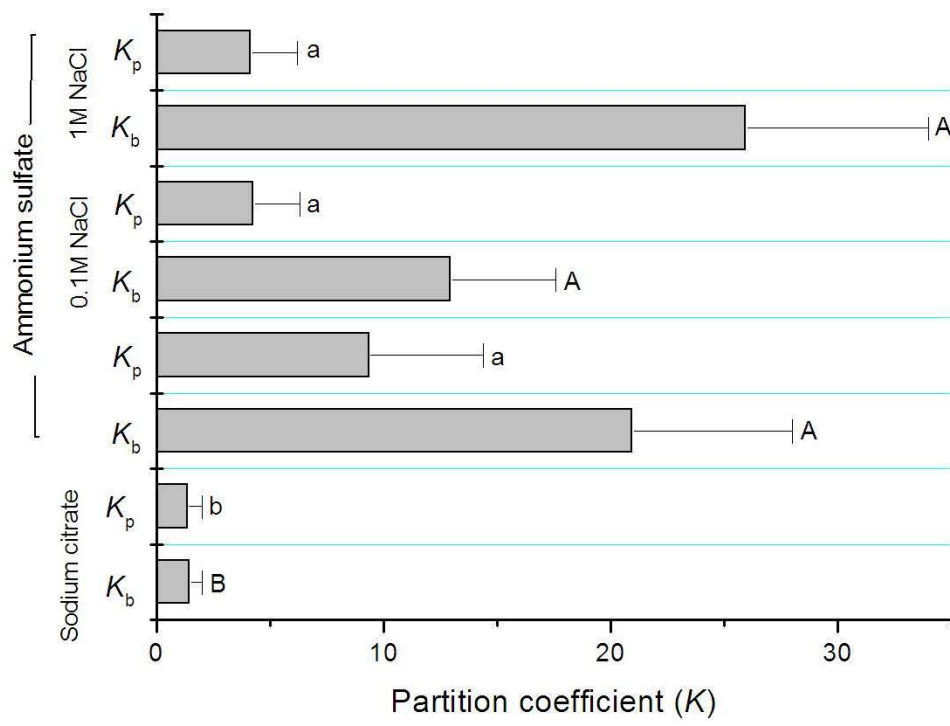
FIGURE LEGENDS

Figure 1. Partition coefficients of cerein 8A in PEG-salt systems and effect of ionic strength on the partitioning of cerein 8A by ATPS by adding NaCl at 0.1 and 1 mol l⁻¹ at 4°C and pH 7.0. Means followed by the same letter do not differ statistically by t test.

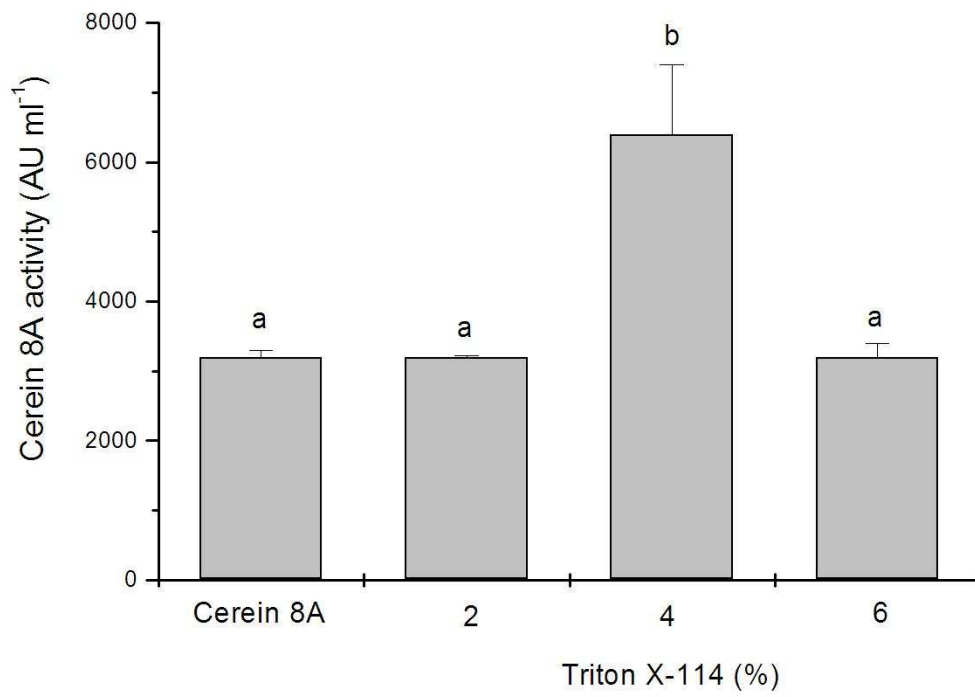
Figure 2. Comparison of cerein 8A activity in different concentrations of Triton X-114. Assays were carried out using crude cerein 8A in each surfactant concentration, before partitioning to evaluate the influence of Triton X-114 in bacteriocin activity. The first column represents cerein 8A activity in the absence of the surfactant. Means followed by the same letter do not differ statistically by t test.

Figure 3. Distribution of cerein 8A activity among micelle-rich phase (white bars) and micelle-poor phase (gray bars).

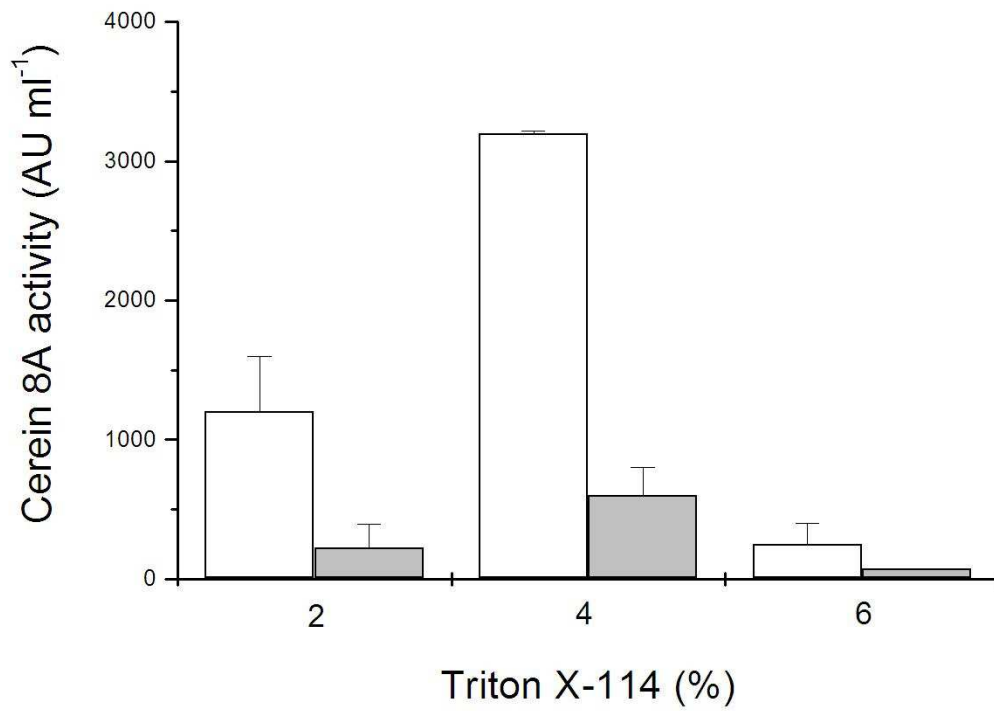
Figure 4. Partition coefficients (K_{cer}) of cerein 8A in aqueous two-phase micellar systems with Triton X-114. Means followed by the same letter do not differ statistically by t test.



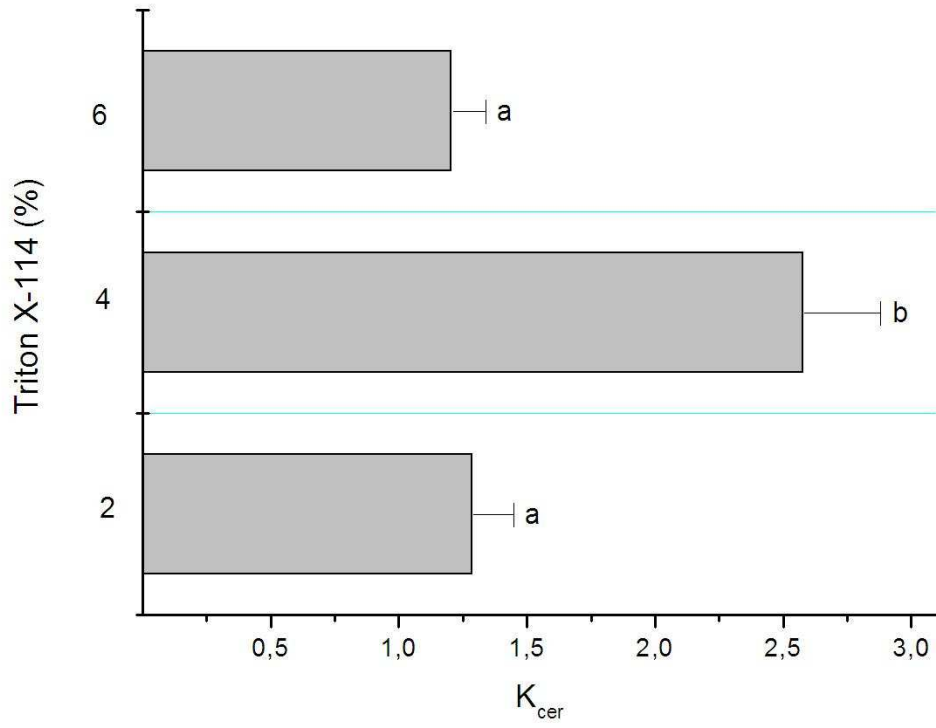
Lappe et al., Fig. 1



Lappe et al., Fig. 2



Lappe et al., Fig. 3



Lappe et al., Fig. 4

Table 1. Summary of purification protocol of cerein 8A.

Step	Protein (mg)	Activity (AU)	Specific activity (AU mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Supernatant	1126	320000	284	1	100
Precipitation	37.36	25600	685	2.4	8
Extraction (1-butanol)	2.56	6400	2500	8.8	2
Q-Sepharose	2.3	8000	3478	12.24	2.5
Biogel P6DG	0.99	3600	3636	12.8	1.125

Table 2. Antimicrobial activity and yield recovery in the upper phase in systems PEG-salts at 4°C and pH 7.0.

Salt	Cerein 8A (AU ml ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Supernatant	2666.6±923.7	1	100
Na citrate	66.7 ± 28.8	0.1	5.25 ± 1.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	1066 ± 461	0.96	81.7 ± 27.5
(NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1M NaCl	933±611	0.81	65.3±38.5
(NH ₄) ₂ SO ₄ + 1M NaCl	1333±1575	1.04	87.7±1

Table 3. Antimicrobial activity and yield recovery in the micellar-rich phase in two-phase micellar systems with Triton X-114.

Triton X114 (%)	Cerein 8A (AU ml ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Supernatant	3200	1	100
2	1200 ± 400	0.7	15.5 ± 4.3
4	3200 ± 20	1.7	46.3 ± 6.2
6	250 ± 150	0.2	2.4 ± 0.7

Table 4. Comparison of cerein 8A isolation by conventional purification protocol, ATPS and micellar system.

Method	N° Steps/time (h)	Specific activity (AU g ⁻¹)		Purification fold	Yield (%)
		Crude	Purified		
Conventional	4/168	284	3636	12.8	1.125
ATPS	1/36	279	230	0.96	87.7±1
Micellar	1/36	325	555	1.71	46.3 ± 6.2

4 DISCUSSÃO GERAL

Uma variedade de fatores antagonistas, incluindo metabólitos finais, compostos tipo antibióticos e as bacteriocinas, a maior parte destas produzidas por bactérias ácido-láticas, tem atraído atenção pelo potencial uso como conservante na indústria de alimentos. A maioria das bacteriocinas, devido à sua seletividade, interferência do ambiente em sua atividade e atividade inibitória geralmente superior contra linhagens estritamente relacionadas ao organismo produtor, possuem um espectro de ação reduzido, sendo que somente poucas bacteriocinas inibem diversos grupos de microrganismos.

Os conhecimentos sobre a cinética de inativação térmica de bacteriocinas são importantes para permitir a sua utilização adequada como biopreservativo na indústria de alimentos. Além disso, há poucas informações sobre este assunto na literatura.

A estabilidade térmica é uma propriedade importante a ser avaliada em uma substância que se pretende usar como biopreservativo alimentar. Neste estudo, a cereína 8A foi termicamente tratada por até 30 minutos à temperatura variando entre 70 e 82 ° C e a sua atividade residual foi determinada. Conforme era esperado, a atividade da bacteriocina diminuiu com o aumento do tempo de aquecimento. A perda de atividade encontrada segue, aparentemente, uma cinética de primeira ordem.

Os valores de D e z obtidos para a cereína 8A indicam que ela pode ser utilizada em condições de pasteurização HTST (altas temperaturas por curtos tempos), onde valores de 72°C e 15 segundos são geralmente utilizados. É necessário salientar que a inativação térmica da cereína 8A foi estudada em solução tampão e, em um sistema alimentar, a bacteriocina poderia ser mais estável devido ao efeito protetor das proteínas dos alimentos. Recentemente, foi demonstrado que a cereína 8A inibiu *L. monocytogenes* nos produtos lácteos, e esta permaneceu estável por no mínimo quatro semanas em queijo macio (Bizani *et al.*, 2008). As bacteriocinas nisina e sakacina P se ligaram rapidamente às proteínas na matriz alimentar e sua atividade foi estável durante mais de 4 semanas em alimentos tratados termicamente (Aasen *et al.*, 2003). O aumento da estabilidade das bacteriocinas em alimentos termicamente processados se deve, em parte, pela inativação de proteases endógenas, que podem ser prejudiciais para peptídeos antimicrobianos. A natureza da matriz alimentar influencia a eficácia da bacteriocina. A inativação da nisina por alguns componentes da carne, tais como fosfolipídios e glutatona S-acetiltransferase têm sido relatados (Cleveland *et al.*, 2001).

Com base em um experimento isotérmico no intervalo de temperatura de 70 a 82°C e usando modelos de tempo de inativação térmica e Arrhenius, a inativação térmica da cereína 8A pode ser descrita por um modelo de cinética de primeira ordem. Os valores de D,z e k calculados pela regressão linear sugerem que a cereína 8A é uma bacteriocina relativamente termoestável com um valor z de 22 ° C e energia de ativação de 105.7 kJ mol⁻¹. Mais estudos sobre a cinética de inativação térmica de bacteriocinas são necessários para permitir a sua utilização correta como biopreservativos naturais na indústria alimentar.

Outra característica importante a ser observada em uma substância com atividade antimicrobiana é o seu espectro e mecanismo de ação. A eficiência de muitos peptídeos antimicrobianos em inativar microrganismos Gram-positivos patogênicos e deteriorantes como *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* é bem estabelecida (Stiles, 1996; Hammes e Hertel, 1998). No entanto, na conservação de alimentos e na segurança alimentar, bactérias Gram-negativas patogênicas e deteriorantes são especialmente problemáticas devido à sua resistência inerente a alguns agentes antimicrobianos que são aplicáveis ou estão presentes em alimentos (Helander *et al.*, 1997). A estrutura da membrana exterior (OM) de organismos Gram-negativos impede que a penetração de bacteriocinas para seu destino principal, a membrana citoplasmática e, por conseguinte, confere um elevado grau de resistência (Stevens *et al.*, de 1991; Schved *et al.*, 1994). Agentes quelantes como o EDTA, bem como a aplicação de stress sub-letal como aquecimento ou congelamento demonstraram ser capazes de perturbar a barreira de permeabilidade de lipopolissacarídeos (LPS) conduzindo a uma maior sensibilidade da *Salmonella typhi* e *Escherichia coli* a nisina (Stevens *et al.*, de 1991; Kalchayanand *et al.*, 1992).

Bacillus cereus 8A, produtor da cereína 8A, inibiu vários microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos (Bizani e Brandelli, 2002). Esta substância demonstrou ter um efeito bactericida em *L. monocytogenes* e *B. cereus*, aparentemente por perturbar a estrutura da membrana destes microrganismos (Bizani *et al.*, 2005).

A salmonelose humana ocorre principalmente devido ao consumo de alimentos e água contaminada com *Salmonella* spp. Vários alimentos foram associados a esta infecção. No entanto, nos últimos anos foi observado em todo o mundo, um

aumento de salmoneloses humanas devido ao soro-tipo Enteritidis, relacionado a ovos de galinha e derivados (Geimba *et al.* 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho, onde foi avaliado o efeito da cereína 8A e quelantes como EDTA e lactato de sódio, sozinhos e em combinação, contra *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis indicaram que todos os tratamentos testados causaram uma redução significativa nos valores da OD₆₀₀ das culturas de *S. Enteritidis*. Quando a suspensão de células de *S. Enteritidis* foi tratada com cereína 8A 3200 AU ml⁻¹ os valores da OD₆₀₀ foram muito inferiores quando comparados aos controles sem a bacteriocina. A adição da bacteriocina acrescido de todas as concentrações de EDTA testadas ou lactato de sódio resultou em uma inibição maior do que a obtida com a bacteriocina sozinha. A eficiência na redução da OD₆₀₀ da suspensão de células de *S. Enteritidis* pela ação da bacteriocina aumentou com o aumento da concentração de EDTA, onde o tratamento com cereína 8A juntamente com EDTA 100 mmol l⁻¹ mostrou para ser mais eficaz. A combinação de lactato de sódio acrescido de cereína 8A revelou igualmente significativa inibição do micro-organismo indicador.

O quelante EDTA por si só, em todas as concentrações utilizadas, reduziu o número de células viáveis de *S. Enteritidis* e seu efeito sobre aumento na permeabilidade das células pode ser observado, onde a maior concentração de EDTA refletiu em maiores danos para as células. Agentes quelantes são compostos capazes de desestabilizar a estrutura e alterar a permeabilidade da OM, removendo os íons Mg⁺² e Ca⁺² da membrana externa de bactérias Gram-negativas, resultando em perdas de fosfolipídios e lipoproteínas.

Os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos são diversos, mas a membrana bacteriana é o destino para a maioria das bacteriocinas (Klaenhammer,

1993). Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão revelaram poros proeminentes na parede da célula de *S. Enteritidis* causada pela cereína 8A, que justifica a redução do número de células viáveis. O efeito potencializador do EDTA sobre a atividade da cereína 8A pode ser verificado através da redução do número de células viáveis *S. Enteritidis* e comprovado pela microscopia eletrônica de transmissão, onde os efeitos do sinergismo resultaram na formação acentuada de poros, perda de conteúdo intracelular e, em alguns casos, destruição das células. Neste caso, o dano na célula é muito provável devido ao enfraquecimento da membrana plasmática exterior causado pelo seqüestro de íons magnésio pelos agentes quelantes, permitindo a ação da bacteriocina em nível de membrana e parede celular.

Tendo em vista o amplo espectro de ação desta bacteriocina e a sua satisfatória termoestabilidade, torna-se imprescindível buscar formas de obtenção menos onerosas e mais rápidas já que a purificação da cereína 8A, assim como para a maioria das bacteriocinas, envolve além da precipitação com sais, várias combinações de cromatografias, como gel-filtração, troca iônica, interação hidrofóbica, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência. Em geral, estes métodos produzem resultados satisfatórios apenas em pequena escala, pois além da recuperação ser baixa, são métodos caros, de difícil manuseio e requerem pessoas capacitadas, tornando inviável para serem usados em grandes proporções.

A cereína 8A foi purificada através de um protocolo sequencial de precipitação, extração e cromatografia de troca iônica (Bizani *et al.*, 2005), com um passo adicional de cromatografia de gel filtração. Em paralelo, foi desenvolvido um protocolo de purificação utilizando sistema aquoso bifásico e sistema micelar bifásico. O protocolo para purificação convencional da cereína 8A, envolvendo

precipitação, extração e etapas de cromatografia, resultou em um fator de purificação de aproximadamente 12, enquanto os valores para ATPS e sistema micelar foram inferiores. No entanto, estas metodologias de partição resultaram em rendimentos significativamente mais elevados e podem ser muito úteis para obtenção de uma substância parcialmente purificada.

O comportamento de particionamento da biomolécula cereína 8A em sistema aquoso micelar bifásico mostrou que a biomolécula pode ser extraída desta forma. Os valores elevados do coeficiente de partição da cereína 8A (K_{cer}) demonstraram a eficácia do conceito de partição no sistema aquoso micelar bifásico simples, usando Triton X-114 na concentração de 4%. A biomolécula foi extraída com êxito na fase rica em micelas, sua atividade foi mantida após o particionamento e revelou uma recuperação de alto rendimento, provavelmente devido à cereína 8A ser pequena (cerca de 26 kDa) e mostrar características hidrofóbicas (Nikas *et al.*, 1992). Do ponto de vista prático, isso implica que o método de separação foi efetivamente capaz de extrair a cereína 8A na fase micelar, ao remover as impurezas para a fase pobre em micelas. Jozala *et al.* (2007) relataram a bem-sucedida extração/pré-purificação da nisina, com a remoção simultânea das impurezas presentes no produto comercial e em nisina produzida em processos de escala de laboratório, usando Triton X-114 na concentração de 2 % em sistema aquoso micelar bifásico.

No sistema aquoso bifásico (ATPS) formado por um polímero e um sal inorgânico, os melhores resultados para os coeficientes de partição (K_p e K_b) foram encontrados no sistema formado por sulfato de amônia como sal inorgânico. Os resultados indicaram que o sistema ATPS é influenciado pelo tipo de sal inorgânico. Em todos os casos testados, o coeficiente de partição da cereína foi superior a 1,

indicando a afinidade da cereína pela fase superior do sistema. Em ATPS com citrato de sódio, os valores dos coeficientes de partição ficaram muito próximo a 1, indicando ser ineficiente no processo de separação, que pode ser confirmada através do baixo valor de recuperação obtido no sistema com este sal. Outros sais foram utilizados, mas eles resultaram em recuperações da atividade antimicrobiana muito baixas. É conhecido que a concentração de sal altera a partição de proteínas em ATPS (Rito-Palomares, 2004). Para obter uma caracterização mais completa da partição da proteína, foi avaliado o efeito da adição de cloreto de sódio em duas concentrações (0,1 e 1M) no sistema com sulfato de amônio. A adição de NaCl aumentou o coeficiente de partição (K_b). O valor mais elevado para K foi obtido com NaCl 1M. Isso significa que, escolhendo as condições adequadas, a partição da proteína pode ser manipulada. Estudos anteriores mostraram que coeficientes de partição podem ser bastante aumentados quando elevadas concentrações de NaCl são adicionadas ao ATPS. Este efeito tem sido atribuído a possíveis interações hidrofóbicas (Schimidt *et al.*, 1994). Infelizmente, há poucas informações sobre propriedades de bacteriocinas em tais sistemas de separação. A adição de NaCl também contribuiu para aumentar o rendimento da recuperação de proteínas na fase superior.

A obtenção bem sucedida do particionamento da proteína, diretamente de uma suspensão contendo a molécula bioativa, no sistema aquoso micelar bifásico e em ATPS representa um passo importante no sentido de desenvolver um método de separação rentável para a cereína 8A ou outras biomoléculas de interesse.

5. CONCLUSÕES

A inativação térmica da cereína 8A pode ser descrita por um modelo de cinética de primeira ordem e os resultados sugerem se tratar de uma bacteriocina relativamente termoestável. Esta propriedade indica que ela pode ser utilizada em condições de pasteurização rápida, onde valores de 72°C e 15 segundos são geralmente utilizados.

A estabilidade térmica da cereína 8A pode ser ampliada em sistemas alimentares devido ao efeito protetor das proteínas que compõem os alimentos.

A cereína 8A apresentou efeito inibitório frente ao microrganismo Gram-negativo *Salmonella* Enteritidis e sua ação foi potencializada quando utilizada em sinergismo com o quelante EDTA. Essa propriedade é muito importante por se tratar de uma substância com potencial para ser utilizada como bioconservante.

A cereína 8A em combinação com EDTA agiram desestabilizando a estrutura e alterando a permeabilidade da membrana externa da *Salmonella* Enteritidis, causando visíveis danos a esse microrganismo indicador.

As metodologias de partição mostraram-se eficazes para a obtenção da cereína 8A na forma parcialmente purificada quando comparadas ao protocolo convencional de purificação. Isso representa um passo importante no sentido de desenvolver um método de obtenção rentável para esta bacteriocina.

7 BIBLIOGRAFIA

- ABRIOUEL, H., MAQUEDA, M., GÁLVEZ, A., MARTINEZ-BUENO, M. AND VALDIVIA, E. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Applied Environmental Microbiology* 68, 1473–1477, 2002.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*, 47, 415-433, 1998.
- BABA, T.; SCHNEEWIND, O. Instruments of microbial warfare: bacteriocina synthesis, toxicity and immunity. *Trends in Microbiology*, Cambridge, 6, 66-71, 1998.
- BIZANI, D. & BRANDELLI A. (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J Appl Microbiol* 93:512-519.
- BIZANI, D., MOTTA, A.S., MORRISSY, J.A.C., TERRA, R.M., SOUTO, A.A., BRANDELLI, A. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology* 8, 125–131, 2005.
- BLACK, J. G. Características das células procarióticas e eucarióticas. Por Black, J. G. *Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4ª ed., p. 71-77, 2002.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 50, 131-149, 1999.
- CAROLISSEN-MACKAY, V. *et al.* Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 34, p. 1-16, 1997.

- CODEX ALIMENTARIUS. Princípio de Transferência dos Aditivos Alimentares. Seção 5.3, Vol. 1A 1995.
- CRUPER, S. S.; IANDIOLO, J. J. Purification and partial characterization of a novel antilisterial agents (Bac 1829) produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 62, 3171-3175. 1996.
- DE MARTINS, E. C. P.; FREITAS, F. Z. Screening of latic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocina formation. Food Control, Surrey, 197-200, 2003.
- DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, London, 1994.
- DE VUYST, L.; CALLEWAERT, R.; CRABBÉ, K. (1996) Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142, 817–827.
- DYKES G. A. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. Tree, Washington 10, 186-189, 1995.
- EL-ZINEY, M. G.; TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat descontamination and preservation. Journal of Food Protection, Ames, 62, 257-261, 1999.
- FIELDS, F. O. Use of bacteriocins in food: Regulatory considerations. Journal of Food Protection, Ames, Supplement, 72-77, 1996.
- GANZ, T.; LEHNER, R. I. Antimicrobial peptides in innate immunity. In: Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., 2001.

- HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiology*, 8, 402-410, 2000.
- HOFACK, L.; WILCKES, A.; ANDRUP, L.; MAHILLON, J. Functional insights into pG12, a cryptic rolling-circulereplicating plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, London, 145, 1519-1530, 1999.
- HYRONIMUS, B., LE MARREC, C. AND URDACI, M.C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *Journal Applied Microbiology* 85, 42–50, 1998.
- ISLAN, M.; CHEN, J.; DOYLE, M.; CHINNAN, M. Control of *Listeria monocytogenes* on turkey frankfurters by generally-recognized-as-safe preservatives. *Journal of Food Protection*, Ames, 65, 1411-1416, 2002.
- JACK, R., TAGG, J. R. AND RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, 59, 171-200, 1995.
- JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH, A.; WOLLMAN, E. Définition de quelques termes relatifs à la lysogenie. *Annales de l' Institute Pasteur*, Paris, 84, 222-224, 1953.
- JOZALA, A. F.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. O.; MAGALHÃES, T. C.; VESSONI, A. P. Liquid–liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. *Enzyme and Microbial Technology* 42 (2008) 107–112.
- KLAENHAMMER, T. Genetics of bacteriocins produce by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12, 39-85, 1993.
- LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melitin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1514, 253-260, 2001.

- LOHNER, K. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In: Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., 2001.
- LÜCKE, F. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, Barking, 56, 105-115, 2000.
- MAGET-DIANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 109-140, 1999.
- MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 37, 1339-1345, 2002.
- MARREC, C.; VERNEUIL, B.; URDACI, M. Biochemical and genetic characterization of Coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I₄. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 66, 5213-5220, 2000.
- MATARAGAS, M.; GALIOTOU, M.; DRISINOS E. H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L 124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, Barking, 64, 265-271, 2003.
- McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, 25, 285-308, 2001.
- MITEVA, V.; IVANOVA, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocina produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 42, 147-158, 1998.

- MURIANA, P.M. Bacteriocins for control o *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection.*, (Suppl): 54-63, 1996.
- NACLERIO, G., RICCA, E., SACCO, M. AND DE FELICE, M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology* 59, 4313–4316, 1993.
- NAGHMOUCHIA, K.; DRIDER, D.; FLISS, I. Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocina, on liposomes and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1508-1517, 2007.
- NETTLES, C. G.; BAREFOOT, S. F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated latic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, Ames, 56, 338-356, 1993.
- OSCÁRIZ, J.C., LASA, I. AND PISABARRO, A.G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol Lett* 178, 337–341, 1999.
- PAIK, H. D. et al. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocina produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Hampshire, 19, 294-298, 1997.
- PATTNAIK, P.; KAUSHIK, J.; GROVER, S.; BATISH, V. Purification and characterization of a bacteriocina-like compound (lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformes* isolated from water buffalo. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, 91, 636-645, 2001.
- REEVES, P. The bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, Baltimore, 29, 25-45, 1965.
- RILEY, M. Molecular mechanisms of bacteriocins evolution. *Annual Reviews of Genetics*, Palo Alto, 32, 255-278, 1998.

- RILEY, M.; GORDON, D. M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, Cambridge, 7, 129-133, 1999.
- SANTOS, W. L. M.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P. Bacteriocinas: definição e características. *Higiene Alimentar*, São Paulo, 8, 21-25, 1994.
- SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, 7, 158-164, 1996.
- SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 33, iii-v, 1996.
- SCHREIR, S.; MALHEIROS, S. V. P.; DE PAULA, E. Surface active drugs: self-association and interactions with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508, 210-234, 2002.
- SCOTT, V. N.; TAYLOR, S.L. Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Food Science*, Chicago, 46, 121-126, 1981.
- SIRAGUSA, G. R.; CUTTER, C. N.; WILLET, J. L. Incorporation of bacteriocina in plastic retains activity and inhibits surface of bacteria on meat. *Food Microbiology*, London, 16, 229-235, 1999.
- SUGITA, H.; HIROSE, Y.; MATSUO, N.; DEGUSHI, Y. Production of the antimicrobial substance by *Bacillus* strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Acquaculture*, Amsterdam, 165, 269-280, 1998.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L.K. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40:722-756

- TAMEHIRO, N.; OKAMOTO-HOSOYA, Y.; OKAMOTO, S.; UBUKATA, M.; OCHI, K. Bacilysocina, a novel phospholipidic antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, 46, 315-320, 2002.
- UTENG, M.; HAUGE, H.; FIMLAND, G. Rapid two-step for large-scale for purification of Pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 68, 952-956, 2002.
- VENEMA, K.; CHIKINDAS, M.; VENEMA, G.; KOK, J. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic cationic bacteriocins: purification of lactococin B and pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 63, 305-309, 1997.
- YANG, R.; JOHNSON, M.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 58, 3355-3359, 1992.
- YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, Saint Paul, 91, 181-187, 2001.
- WU, M.; MAIER, E.; BENZ, R.; HANCOCK, R. E. W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38, 7235-7242, 1999.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395, 2002.

ANEXO 1

Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A.

- *Journal of Food Engineering* (2009), 91, 512-519

ANEXO 2

Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate

- *International Journal of Food Microbiology* (2009), 135, 312-316.

ANEXO 3

Currículo lattes Rosiele Lappe.

Rosiele Lappe

Possui graduação em Farmácia & Bioquímica - Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela mesma Universidade e Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi professora da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul no Pólo de São Luiz Gonzaga no Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agroindústria e no Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Sistemas de Produção e professora substituta da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, atuando nos cursos de Nutrição e Biomedicina. Atualmente, é professora assistente titular da área de Ciência dos Alimentos da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul no Curso Superior de Tecnologia em Agroindústria.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 23/10/2009



Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/5573723899636148>

Dados pessoais

Nome	Rosiele Lappe
Nome em citações bibliográficas	LAPPE, R.
Sexo	Feminino
Endereço profissional	Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Pólo de Encantado. Rua Alegrete, 821 95960-000 - Encantado, RS - Brasil Telefone: (51) 37513376 Ramal: 5785 URL da Homepage: http://www.uergs.edu.br

Formação acadêmica/Titulação

- 2005 - 2009** Doutorado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6) .
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Caracterização do peptídeo antimicrobiano cereína 8A produzida pelo *Bacillus cereus* 8A, *Ano de Obtenção:* 2009.
Orientador:  Adriano Brandelli.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos /
Subárea: Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Microbiologia de Alimentos.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Biologia Geral / *Subárea:* Biologia Celular e Molecular.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia.
- 2003 - 2004** Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (Conceito CAPES 4) .
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.
Título: Influência da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo Italiano, *Ano de Obtenção:* 2004.
Orientador:  Ernesto Hashime Kubota.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 1998 - 2003** Graduação em Farmácia & Bioquímica - Tecnologia de Alimentos .
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

Formação complementar

- 2002 - 2002** Estágio. (Carga horária: 157h).
Cooperativa Regional Triticola Serrana Ltda.
- 2001 - 2001** Plasticidade Neuronal: Aspectos funcionais e molec. (Carga horária: 16h).
Federação das Sociedades de Biologia Experimental.
- 2001 - 2001** 1º Curso de Técnicas Avançadas Aplicadas a Microbi. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.
- 2001 - 2001** Estágio. (Carga horária: 100h).
Farmácia Bela Vita.
- 2000 - 2000** Estágio. (Carga horária: 50h).
Usina - Escola de Laticínios - CCR/UFSM.

Atuação profissional

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, UERGS, Brasil.

Vínculo institucional

- 2009 - Atual** Vínculo: Professor Titular, Enquadramento Funcional: Coordenadora do Curso de Tecnologia em Agroin, Carga horária: 40

Vínculo institucional

- 2008 - Atual** Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professor Titular, Carga horária: 40

- Outras informações** Disciplinas Ministradas: Análise de Alimentos (2008/01, 2008/02 e 2009/01) Tecnologia de Produtos de Origem Animal I (2008/02 e 2009/01) Tecnologia de Produtos de Origem Animal II (2008/02 e 2009/01) Segurança, Qualidade e Legislação na Indústria de Alimentos (2008/01) Processamento de Derivados Lácteos (2008/02 e 2009/01) Introdução à Ciência dos Alimentos (2009/01, 2009/02) Princípios de Conservação dos Alimentos (2009/01, 2009/02) Processos Fermentativos Industriais I (2008/01) Higiene e Conservação dos Alimentos (2008/01) Fundamentos do Processamento de Alimentos(2009/02) Bioquímica II (2009/01) Bioquímica I (2009/02)

Vínculo institucional

- 2006 - 2007** Vínculo: Professor Temporário, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 20

Atividades

- 03/2008 - Atual** Ensino, Curso Superior de Tecnologia em Agroindústria, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas
Análise de Alimentos
Fermentações Industriais I
Higiene e Conservação dos Alimentos
Higiene, Segurança e Legislação na Indústria de Alimentos
Introdução à Ciência dos Alimentos
Processamento de Derivados Lácteos
Tecnologia de Produtos de Origem Animal I
Tecnologia de Produtos de Origem Animal II

- 2009 - 2010** Atividades de Participação em Projeto, Pólo de Encantado, .

Projetos de pesquisa
[Verificação da qualidade dos queijos produzidos em agroindústrias no município de encantado e utilização de própolis como adjuvante na conservação de queijos](#)

04/2006 - 04/2007 Ensino, Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas
Higiene e Conservação dos Alimentos
Introdução à Ciência dos Alimentos
Introdução à Informática
Processos Bioquímicos Industriais
Processos Fermentativos Industriais
Química de Alimentos

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2009 Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Professor Substituto, Carga horária: 20

Atividades

05/2007 - 02/2009 Ensino, Nutrição, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas
Bromatologia e Análise Sensorial dos Alimentos (2007/02 e 2008/02)
Química Aplicada à Nutrição (2008/01)
Tecnologia dos Alimentos (2007/02 e 2008/02)

05/2007 - 02/2009 Ensino, Biomedicina, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas
Bromatologia e Análise Sensorial dos Alimentos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2005 - 2009 Vínculo: Doutoranda, Enquadramento Funcional: Doutoranda

Atividades

2005 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, .

Projetos de pesquisa
[Caracterização da bacteriocina cereína 8A produzida pelo Bacillus cereus 8A](#)

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

Vínculo institucional

2003 - 2004 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna de mestrado, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

2003 - 2004 Atividades de Participação em Projeto, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão,

Projetos de pesquisa

[Efeito do tratamento superficial de salame tipo italiano com própolis sobre os parâmetros físico-químicos e sensoriais](#) .

2001 - 2002 Atividades de Participação em Projeto, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão,

Projetos de pesquisa

[Efeito de diferentes regimes de temperatura nos parâmetros metabólicos e sanguíneos em jundiás Rhamdia quelen](#)

Projetos de Pesquisa

2009 - Atual Verificação da qualidade dos queijos produzidos em agroindústrias no município de encantado e utilização de própolis como adjuvante na conservação de queijos

Situação: Em andamento; *Natureza:* Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação (1) .

Integrantes: Adriano da Silva Guahyba - Integrante / Elaine Biondo - Integrante / Rosiele Lappe - Coordenador.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Auxílio financeiro..

2005 - 2009 Caracterização da bacteriocina cereína 8A produzida pelo Bacillus cereus 8A

Situação: Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação (1) / Doutorado (1) .

Integrantes: Adriano Brandelli - Integrante / SANT'ANA,V. (Voltaire Sant'Ana) - Integrante / Rosiele Lappe - Coordenador.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Número de produções C, T & A: 2.

2003 - 2004 Efeito do tratamento superficial de salame tipo italiano com própolis sobre os parâmetros físico-químicos e sensoriais .

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação (1) / Mestrado acadêmico (1) .

Integrantes: CAMPAGNOL, Paulo Cesar; - Integrante / KUBOTA, Ernesto H; - Integrante / TERRA, Nelcindo N. - Integrante / Rosiele Lappe - Coordenador.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Bolsa..

2001 - 2002 Efeito de diferentes regimes de temperatura nos parâmetros metabólicos e sanguíneos em jundiás Rhamdia quelen

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Integrantes: LERMEN, Carine Luísa - Coordenador / CRESTANI, Márcia - Integrante / VIEIRA, Vânia Pimentel; - Integrante / BALDESSEROTTO, Bernardo; - Integrante / MORSCH, Vera Maria. - Integrante / Rosiele Lappe - Integrante.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Número de produções C, T & A: 1.

Áreas de atuação

- 1.** Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos.
- 2.** Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos.
- 3.** Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Bromatologia.
- 4.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Bioquímica dos

Microorganismos.

5. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

Idiomas

- Inglês** Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
- Espanhol** Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- 2009** Professora homenageada dos formandos de Tecnologia em Agroindústria da UERGS, .
- 2008** Professora homenageada da segunda turma de formandos do Curso Superior de Tecnologia em Agroindústria., UERGS.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. [doi>](#) LAPPE, R ; CLADERAOLIVERA, F ; DOMINGUEZ, A ; [BRANDELLI, A](#) ; LAPPE, R. . Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A. Journal of Food Engineering ^{JCR}, v. 91, p. 223-227, 2009.
2. [doi>](#) LAPPE, R. ; Motta, A. S. ; SANT'ANA,V. (Voltaire Sant'Ana) ; Brandelli A. . Inhibition of Salmonella Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. International Journal of Food Microbiology ^{JCR}, v. 135, p. 312-316, 2009.
3. ★ [doi>](#) LERMEN, Carine Luísa ; VIEIRA, Vânia Pimentel ; SCHETINGER, Maria Rosa Chitolina ; LAPPE, R. ; GIODA, Carolina ; CRESTANI, Márcia ; BALDESSEROTTO, Bernardo ; MORSCH, Vera Maria . ATP, ADP and AMP dephosphorylation in membrane fractions of Rhamdia quelen exposed to different temperatures.. Fish Physiology and Biochemistry ^{JCR}, v. 31, p. 295-301, 2006.
4. ★ LAPPE, R. ; CAMPAGNOL, Paulo Cesar ; KUBOTA, Ernesto H ; TERRA, Nelcindo N. . Effect of the propolis hydro alcoholic extract in the developmen of moulds in salami.. RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas ^{JCR}, v. 41, p. 157, 2005.
5. ★ LERMEN, Carine Luísa ; LAPPE, R. ; CRESTANI, Márcia ; VIEIRA, Vânia Pimentel ; GIODA, Carolina ; SCHETINGER, Maria Rosa Chitolina ; MORSCH, Vera Maria ; BALDESSEROTTO, Bernardo . Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of Silver Catfish Rhamdia quelen.. Aquaculture (Amsterdam) ^{JCR}, v. 239, p. 497-507, 2004.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. CRESTANI, Márcia ; LAPPE, R. ; VIEIRA, Vânia Pimentel ; MORAES, Gilberto . Influência de diferentes níveis protéicos sobre parâmetros metabólicos de Matrinxã (Brycon cephalus) alimentados em viveiros.. In: VII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2001, Curitiba. Anais da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Regional Paraná, 2001.

Resumos publicados em anais de congressos

1. LAPPE, R. ; SANT'ANA, V. ; Brandelli A. . Potencialização da atividade antimicrobiana da cereína 8^a frente a Salmonella enteritidis em combinação com agentes quelantes. In: Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos da IX Reunião Anual do PPGBCM (2007), 2007.
2. ★ LERMEN, Carine Luísa ; LAPPE, R. ; SCHETINGER, Maria Rosa Chitolina ; VIEIRA, Vânia Pimentel ; BALDESSEROTTO, Bernardo ; MORSCH, Vera Maria . Efeito da aclimação térmica sobre a atividade da enzima ATP difosfohidrolase (ecto-cd39) de cérebro, rim e fígado de peixe.. In: XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2002, Caxambu. FeSBE 2002 - Metabolismo, 2002.
3. ★ Balz, D. ; SCHETINGER, Maria Rosa Chitolina ; LAPPE, R. ; MORSCH, Vera Maria . Efeitos do citrato de sódio sobre a degradação da acetilcolina em diferentes estruturas do cérebro de camundongos.. In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2001, Caxambu. Fesbe 2001, 2001.

Apresentações de Trabalho

1. Priscila Rossato Fracari ; LAPPE, R. ; KUBOTA, Ernesto H ; TERRA, Nelcindo N. . Influência do extrato hidroalcoólico de própolis nas características físico-químicas do salame tipo italiano.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. CAMPAGNOL, Paulo Cesar ; LAPPE, R. ; KUBOTA, Ernesto H ; TERRA, Nelcindo N. ; Priscila Rossato Fracari . Influência da utilização de extrato hidroalcoólico de própolis na formação de mofo e nas características sensoriais do salame tipo italiano.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Bancas

Participação em bancas examinadoras

Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação

1. Adriano da Silva Guahyba; LAPPE, R.. Participação em banca de Ricardo Rosolen. Produção leiteira: qualidade, sanidade, manejo e nutrição.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
2. Adriano da Silva Guahyba; LAPPE, R.. Participação em banca de Bruna Dartora. Bem estar animal e a indústria de carne de aves.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
3. LAPPE, R.. Participação em banca de Ricardo Salvagni. Aspectos relacionados à alimentação, produção de leite e higiene na ordenha de gado leiteiro. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agroindústria) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
4. Fabrizio da Fonseca Barbosa; JANTZEN, M. M.; LAPPE, R.. Participação em banca de Arturo Rizzo Ocanha. Estudo sobre a viabilidade de implementação do sistema APPCC nas usinas beneficiadoras de leite de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
5. Fabrizio da Fonseca Barbosa; Tatiana Valesca Rodriguez Alicieo; LAPPE, R.. Participação em banca de Carolina Rodrigues da Silva. Planejamento para produção de graspa em cantina de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
6. Fabrizio da Fonseca Barbosa; Tatiana Valesca Rodriguez Alicieo; LAPPE, R.. Participação em banca de Daiane Muriel Castro Velasques. Produção de vinho artesanal em Sant'Ana do Livramento. 2008.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

7. JANTZEN, M. M.; Tatiana Valesca Rodriguez Alicieo; LAPPE, R.. Participação em banca de Fernando Henrique Munhoz Souza. Verificação de boas práticas de fabricação em um abatedouro frigorífico de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
8. Fabrizio da Fonseca Barbosa; JANTZEN, M. M.; LAPPE, R.. Participação em banca de Veruschka Calafi Pouey de Souza. Controle de qualidade na produção de leite em pequena propriedade rural. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
9. JANTZEN, M. M.; Tatiana Valesca Rodriguez Alicieo; LAPPE, R.. Participação em banca de Junior Ferreira Munoz. Manejo pré-abate: influência do manejo pré abate em contusões avaliadas em carcaças de bovinos em um matadouro frigorífico de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
10. JANTZEN, M. M.; Tatiana Valesca Rodriguez Alicieo; LAPPE, R.. Participação em banca de Rafael Caggiani Luizelli. Apontamentos sobre boas práticas de fabricação em um abatedouro frigorífico de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
11. Fabrizio da Fonseca Barbosa; Samar Velho da Silveira; LAPPE, R.. Participação em banca de Ângela Giovana Fernandez Rocha. Estudo da cadeia produtiva da pêra asiática no município de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
12. Fabrizio da Fonseca Barbosa; Samar Velho da Silveira; LAPPE, R.. Participação em banca de Cláudio Vieira de Moura. Gerenciamento e logística em matadouro frigorífico de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
13. Ana Maria Azevedo; Samar Velho da Silveira; LAPPE, R.. Participação em banca de Alessandro Severo Lima. Processo de abate de anomais bovinos. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
14. Adriano da Silva Guahyba; BARBIERI, D. L.; LAPPE, R.. Participação em banca de Andréia Agostini. Sistema de produção de embutidos em uma agroindústria familiar inspecionada pela CISPOA. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agroindústria) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
15. Ana Maria Azevedo; Catarina Gottschall; LAPPE, R.. Participação em banca de Paula Piccoli. Análise do perfil de óleos e azeites em processo de refogamento. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
16. FERREIRA, Ana Margarete Rodrigues Martins; LUZ, Arisa Araujo da; LAPPE, R.. Participação em banca de Ivan Jacson Preuss. A extensão universitária no processo de desenvolvimento local - sujeitos aprendentes e ensinantes. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Desenvolvimento Rural e Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
17. LEÃES, Fernanda Leal; BESCOW, Wagner.; LAPPE, R.. Participação em banca de Rodrigo Machado. A importância da gestão da qualidade no frigorífico Cotrijuí. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração - Gestão Rural) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
18. BESCOW, Wagner.; GONÇALVES, Fábio.; LAPPE, R.. Participação em banca de Dione Quevedo Vieira. A importância do capital humano na contribuição do desenvolvimento organizacional: um estudo de caso. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração - Gestão Rural) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
19. GONÇALVES, Fábio.; BESCOW, Wagner.; LAPPE, R.. Participação em banca de Sílvia Letícia Soares Goltz. A satisfação dos consumidores frente à qualidade dos produtos ofertados pela feira do produtor rural no município de São Luiz Gonzaga. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
20. LEÃES, Fernanda Leal; BESCOW, Wagner.; LAPPE, R.. Participação em banca de Marisa de Jesus Garay. Análise econômica e financeira da Cooperativa Triticola Regional Sãoluizense. 2006. Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Administração Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

21. BESCOW, Wagner.; FERREIRA, Ana Margarete Rodrigues Martins; LAPPE, R.. Participação em banca de Thaís Trindade de Ávila. Fatores limitantes da produção de leite no município de Vitória das Missões - RS. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Desenvolvimento Rural e Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
22. FERREIRA, Ana Margarete Rodrigues Martins; BESCOW, Wagner.; LAPPE, R.. Participação em banca de Viviane do Nascimento Bueno. Fatores que levam os agricultores familiares da comunidade Rolim de Moura (município de Vitória das Missões-RS) ao cultivo da soja. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Desenvolvimento Rural e Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
23. LEÃES, Fernanda Leal; BESCOW, Wagner.; LAPPE, R.. Participação em banca de Simone Parisi Biasi. Fumicultura como alternativa de renda na pequena propriedade no interior de Jaguari-RS.. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
24. FERREIRA, Ana Margarete Rodrigues Martins; SARTORI, Ivar.; LAPPE, R.. Participação em banca de James Diego Roth. Impactos sócio-ambientais da monocultura da soja na região missioneira. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Desenvolvimento Rural e Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
25. LEÃES, Fernanda Leal; GONÇALVES, Fábio.; LAPPE, R.. Participação em banca de Elói Jamito Goulart Garay. Logística, um estudo de caso da soja recebida na área de abrangência da Coopatrigo - Cooperativa Triticola Sãoluizense.. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração Gestão Agroindustrial) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Eventos

Participação em eventos

1. Fórum Regional de Agricultura Sustentável e Seminário Regional de Meio Ambiente. 2009. (Seminário).
2. IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Potencialização da atividade antimicrobiana da cereína 8A frente a Salmonella enteritidis em combinação com agentes quelantes. 2007. (Encontro).
3. Curso de extensão para a formação de professores da zona rural de São Luiz Gonzaga. Ervas Medicinais. 2006. (Outra).
4. XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Efeito da aclimatação térmica sobre a atividade da enzima ATP difosfohidrolase (ecto-cd39) de cérebro, rim e fígado de peixe.. 2002. (Outra).
5. VII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Influência de diferentes níveis protéicos sobre parâmetros metabólicos de Matrinxã (Brycon cephalus) alimentados em viveiros.. 2001. (Encontro).
6. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Efeitos do citrato de sódio sobre a degradação da acetilcolina em diferentes estruturas do cérebro de camundongos.. 2001. (Outra).
7. XVII Congresso Pan-Americano de Farmácia e V Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa.. 2000. (Congresso).
8. Jornada de atualização em análises clínicas e tecnologia dos alimentos.. 1998. (Outra).

Orientações

Orientações em andamento

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Diego Pellegrini. A importância das análises físico-químicas na indústria cárnea. Início: 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. (Orientador).

Supervisões e orientações concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Patrícia Sartori. Importância do manejo adequado para maximizar a produção leiteira em uma unidade de produção animal.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
2. Cauê de Lima. Abate de suínos com ênfase nas boas práticas de fabricação.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
3. Camila Fabris. Caracterização do perfil dos produtores de leite no município de Encantado.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
4. Karina Caparroz Alves. Sistema de produção de embutidos com ênfase nas boas práticas de fabricação.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
5. Vivian Cristiane Neddef. Processo de elaboração de adubos orgânicos através de compostagem.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
6. Júlia Cerveira dos Santos. Acompanhamento de determinadas etapas do controle de qualidade de derivados da carne de frango.. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
7. Leonardo Andrei Hunsche. Influência do manejo pré-abate na transformação do músculo em carne de suínos. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
8. Fernanda Trasel. Avaliação da eficiência da higienização pré e pós operacional no processo de evisceração de suínos. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
9. Alessandro Severo Lima. Processo de abate de animais bovinos. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
10. Junior Ferreira Munoz. Manejo pré-abate: influência do manejo pré-abate em contusões avaliadas em carcaças de bovinos em um matadouro frigorífico de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.
11. Cláudio Vieira de Moura. Gerenciamento e logística em matadouro frigorífico de Sant'Ana do Livramento. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Curso Superior de Tecnologia em Agropecuária: Agro) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Orientador: Rosiele Lappe.

Iniciação Científica

1. Voltaire Sant'Ana. Caracterização da bacteriocina cereína 8A produzida pelo *Bacillus cereus* 8A. 2008. Iniciação Científica. (Graduando em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Rosiele Lappe.



Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A

Rosiele Lappe, Florencia Cladera-Olivera, Ana Paula Melo Dominguez, Adriano Brandelli *

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenue Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2008

Received in revised form 25 August 2008

Accepted 27 August 2008

Available online 5 September 2008

Keywords:

Bacillus cereus

Bacteriocin

Cerein

Antibacterial peptide

Inactivation kinetics

Thermal processing

Thermodynamic activation parameters

ABSTRACT

Optimization of thermal processes relies on adequate degradation kinetic models to warrant food safety and quality. The knowledge on thermal inactivation kinetics of bacteriocins is necessary to allow their adequate use as natural biopreservatives in the food industry. In this work, the kinetics of thermal inactivation was studied for the previously characterized bacteriocin cerein 8A. Samples of cerein 8A were treated at different time–temperature combinations in the range of 0–30 min and 70–82 °C and the thermodynamic and kinetic parameters for bacteriocin inactivation were calculated. Results showed that inactivation followed a first-order reaction with k -values between 0.059 min⁻¹ and 0.235 min⁻¹. D - and k -values decreased and increased, respectively, with increasing temperature, indicating a faster bacteriocin inactivation at higher temperatures. Results suggest that cerein 8A is a relatively thermostable bacteriocin with a z -value of 21.98 °C and E_a of 105.7 kJ mol⁻¹.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacteriocins are antimicrobial peptides widespread produced by bacteria. Bacteriocin production is common among bacteria isolated from diverse environments (Riley and Wertz, 2002). Those produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of intensive investigation because of their potential use as biopreservatives in the food industry (O'Sullivan et al., 2002; Deegan et al., 2006). Several bacteriocins from LAB have been effectively characterized and tested in food systems to combat pathogenic and spoilage microorganisms. Nisin is the most well characterized bacteriocin and its use in food is permitted in more than 40 countries (Cleveland et al., 2001).

Despite the intensive work on LAB, *Bacillus* is another interesting genus to investigate for antimicrobial peptides since this genus includes a variety of industrially important species and has a history of safe use in food and industry (Pedersem et al., 2002). The production of bacteriocins or bacteriocin-like substances has been already described for many *Bacillus* species such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus*, among other (Von Döhren, 1995; Stein, 2005).

B. cereus 8A is a previously characterized bacterium isolated from native woodlands of southern Brazil. This strain produces cer-

ein 8A, a bacteriocin presenting broad spectrum of activity and potential use as biopreservative in food (Bizani and Brandelli, 2002). Cerein 8A showed a bactericidal effect on *Listeria monocytogenes* and *B. cereus* (Bizani et al., 2005a). High yields of this substance were obtained by cultivation in BHI broth (Bizani and Brandelli, 2004) and production was optimized in soybean protein reaching similar yields allowing a cost effective production (Dominguez et al., 2007).

Thermal processing persists as the most widely used method of preserving and extending the useful shelf-life of food (Awuah et al., 2007). However, excessive heating produces considerable losses in the quality and particularly in the sensory properties of foods. Thermal processing techniques emphasize the achievement of commercial sterility while minimizing changes in nutritional value and eating quality (Polydera et al., 2003). Quality loss involves both subjective factors like taste that cannot be readily quantified and quantifiable factors such as nutrient degradation (Awuah et al., 2007). In this regard, combined techniques to reduce heat application in foods have gaining increased attention. Bacteriocins have been used in hurdle technology, which combines different methods to inhibit microbial growth (Cleveland et al., 2001). Nisin has been used with moderate heat to inactivate important food pathogens (Boziaris et al., 1998; Gao and Ju, 2008).

The knowledge on kinetics of thermal inactivation of bacteriocins is important to allow their adequate use as biopreservatives in the food industry. Moreover, there is scarce information about

* Corresponding author. Tel.: +5551 3316 6249; fax: +5551 3308 7048.
E-mail address: abrand@ufrgs.br (A. Brandelli).

Nomenclature

C_t	bacteriocin activity at time t (UA)	R	Universal gas constant
C_0	initial bacteriocin activity (UA)	r^2	determination coefficient
D	decimal reduction time (min)	ΔS^*	activation entropy ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
E_a	activation energy (kJ mol^{-1})	t	time (min)
ΔG^*	free energy inactivation (kJ mol^{-1})	$t_{1/2}$	half-time (min)
h	Planck constant (J min)	T	temperature ($^{\circ}\text{C}$, K)
ΔH^*	activation enthalpy (kJ mol^{-1})	z	z -value ($^{\circ}\text{C}$)
k	inactivation rate constant (min^{-1})		
K_B	Boltzmann constant (J K^{-1})		

this subject in the literature. The aim of the present work was to investigate the thermal stability of cerein 8A. On this basis, an Arrhenius plot was derived and the thermodynamic parameters for thermal inactivation were determined.

2. Theory

In general, thermal inactivation of microorganisms or enzymes can be described by a first-order reaction (in this work thermal inactivation of cerein 8A)

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -kt \quad (1)$$

where C_t is the protein concentration (or bacteriocin activity in UA) at treatment time t , C_0 is the initial protein concentration (or initial bacteriocin activity in UA), and k is the inactivation rate constant at the temperature studied. The inactivation rate constant k can be estimated by linear regression analysis of the natural logarithm of residual activity versus treatment time.

Inactivation rate constants for bacteriocin gave values for bacteriocin half-life ($t_{1/2}$)

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (2)$$

In food processing, it is common to characterize first-order reactions in terms of D - and z - values (thermal death time concepts). The decimal reduction time (D - value) is the time needed for a 10-fold reduction of the initial activity at a given temperature. The relation between the D - value and the inactivation rate constant is given by (Espachs-Barroso et al., 2006)

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad (3)$$

The z -value is the temperature needed to reduce de D -value one log-unit, and it is obtained by plotting the D -values on a log scale against the corresponding temperatures (Stumbo, 1973).

Differences between the D - and z -values of microorganisms and nutrients are exploited to optimize thermal processes. The z -values for cooking and nutrient degradation (25 – 45 $^{\circ}\text{C}$) are generally greater than microbial inactivation (7 – 12 $^{\circ}\text{C}$) (Auwah et al., 2007).

The Arrhenius equation is the most common mathematical expression to describe the temperature effect on the inactivation rate constants and the dependence is given by the activation energy (E_a)

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad (4)$$

where A is the Arrhenius constant, E_a the activation energy, R the universal gas constant and T is the absolute temperature. The activation energy can be estimated by linear regression analysis of the natural logarithm of rate constant versus the reciprocal of the absolute temperature.

Activation enthalpy (ΔH^*), free energy of inactivation (ΔG^*) and activation entropy (ΔS^*) can be calculated according to the expressions

$$\Delta H^* = E_a - R \cdot T \quad (5)$$

$$\Delta G^* = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{k \cdot h}{K_B T}\right) \quad (6)$$

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T} \quad (7)$$

where h and K_B are the Planck's and the Boltzmann's constants, respectively and T the average temperature (350 K in this work).

3. Materials and methods

3.1. Reagents and media

Brain heart infusion (BHI) was from Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA). Agar and other reagents were from Merck (Darmstadt, Germany).

3.2. Bacterial cultures

The producer strain was *B. cereus* 8A, isolated and characterized as described elsewhere (Bizani and Brandelli, 2002). The indicator strain was *B. cereus* ATCC 14579 stored in 20% (v/v) glycerol at -20 $^{\circ}\text{C}$. Cells were propagated in BHI broth before use. The cultivation of the strains was performed aerobically.

3.3. Bacteriocin production

For bacteriocin production, *B. cereus* 8A was grown in 200 ml of BHI broth at 30 $^{\circ}\text{C}$ in a rotatory shaker at 125 cycles min^{-1} for 24 h. The cells were removed by centrifugation at $10,000$ g for 15 min. Bacteriocin activity was concentrated by precipitation with ammonium sulfate at 70% (w/v) saturation. The pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and extracted with 1-butanol (0.7 vol). After the butanol was evaporated under reduced pressure, partially-purified bacteriocin was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ until used for antimicrobial assay (Bizani et al., 2005b).

3.4. Bacteriocin activity assay

The antimicrobial activity was detected by agar disc diffusion assay (Motta and Brandelli, 2002). Aliquots of 20 μl bacteriocin preparation were applied on agar plates previously inoculated with a swab submerged in indicator strain suspension (*B. cereus* ATCC 14579) that corresponded to a 0.5 McFarland turbidity standard solution (10^8 CFU ml^{-1}). Plates were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$. The bacteriocin titre was determined by the serial two-fold dilution method. The reciprocal value of the highest dilution where an inhibition zone was observed was taken as activity units ml^{-1} (AU ml^{-1}).

3.5. Thermal inactivation

Thermal inactivation of cerein 8A was determined by incubating the bacteriocin at 70, 75, 77, 80 and 82 °C. Bacteriocin solutions (1.0 ml) were heated in sealed tubes, which were incubated in a thermostatically controlled water bath (B. Braun Biotech, Melsungen, Germany). Tubes were withdrawn at each time intervals, immediately immersed in an ice bath and bacteriocin activity was determined as describe earlier. The activity after 1 min of heating-up time ($t=0$) was considered to be the initial activity, thereby eliminating the effects of heating-up. Assays were done in duplicate.

3.6. Data analysis

Statistical analysis of the data was performed using the Statistica 7.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) and plots using Microsoft Excel 2000 (MapInfo Corporation, Troy, NY, USA).

4. Results and discussion

We have earlier reported that cerein 8A was inhibitory to a broad range of indicator strains, including pathogenic and spoilage organisms such as *L. monocytogenes*, *B. cereus* and clinical isolates of *Streptococcus* sp. and was stable for up to 70 °C and within a wide range of pH (Bizani and Brandelli, 2002). In this study, the kinetics of thermal inactivation of cerein 8A was evaluated and thermodynamic properties were calculated. Bacteriocin was thermally treated for 30 min at temperature ranging from 70 °C to 82 °C and the residual activity was determined. As expected, bacteriocin activity decreased as the heating time increased. Loss of activity was found to follow an apparent first order kinetic (Eq. (1)) during thermal treatment as depicted in Fig. 1. In this figure, symbols refer to the average of experimental values, while lines correspond to the fitted values of Eq. (1) to experimental data. The inactivation rate constants (k) were determined from the slope of such semi-log-plots and are giving in Table 1 (together with the r^2 of the correlation). The rate constant increased with the higher heating temperatures.

The logarithm representation of bacteriocin activity against time allows us to calculate D -values (Table 1), which decreased with increasing temperature, indicating a more rapid bacteriocin inactivation at higher temperatures. It can be observed that D -values are between 35 and 39 at temperatures between 70 °C and

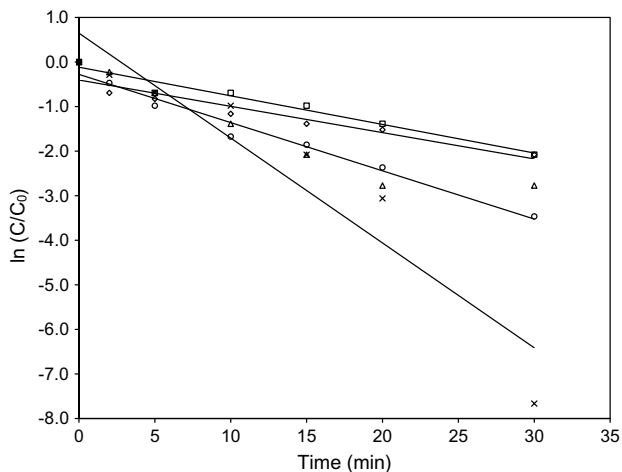


Fig. 1. Thermal inactivation kinetic of cerein 8A at 70 (◇), 75 (□), 77 (△), 80 (○), 82 (x) °C. Values are the means of three independent experiments. The standard deviations were always lower than 5%.

Table 1

Kinetics parameters of thermal inactivation of cerein 8A

Temperature (°C)	k (min ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	z (°C)
70	0.059 ± 0.009 ^a	0.9027	11.75	39.04	21.98
75	0.064 ± 0.006	0.9622	10.80	35.87	
77	0.103 ± 0.015	0.9084	6.74	22.40	
80	0.108 ± 0.008	0.9744	6.40	21.27	
82	0.235 ± 0.036	0.8973	2.94	9.78	

^a Standard error of regression (95% confidence interval).

75 °C and fall to values lower than 23 at 77 °C or more. The effect of temperature on D -values is also shown in Fig. 2, and the calculated z -value for the range of temperatures studied (70–82 °C) was approximately 22 °C (Table 1). The z -values for cooking and nutrient degradation (25–45 °C) are generally greater than microbial inactivation (7–12 °C) (Auwah et al., 2007). In fact, differences between the D - and z -values of microorganisms and nutrients are exploited to optimize thermal processes and can be exploited also to maintain bacteriocin activity after treatment. D - and z -values obtained for cerein 8A indicates that it can be utilized in conditions of HTST (high temperatures short times) pasteurization, where values of 72 °C and 15 s are generally considered. It is necessary to point out that thermal inactivation was studied for cerein 8A in buffer solution, and in a food system the bacteriocin could be more stable due to the protective effect of food proteins. It was recently demonstrated that cerein 8A inhibits *L. monocytogenes* in dairy products, remaining stable for at least four weeks in soft cheese (Bizani et al., 2008). The bacteriocins nisin and sakacin P quickly adsorb to proteins in the food matrix and their activity was stable for more than four weeks in heat-treated foods (Aasen et al., 2003). Higher bacteriocin stability in heat processed food was credited in part by inactivation of endogenous proteases, which may be harmful to antimicrobial peptides. The nature of food matrix influences the bacteriocin effectiveness. Nisin inactivation by some meat components, such as phospholipids and glutathione S-transferase have been reported (Cleveland et al., 2001).

The dependence of the inactivation rate constants with temperature fitted adequately the Arrhenius equation (Fig. 3). Activation energy obtained (105.7 kJ mol⁻¹) was similar to that obtained for heat inactivation of soybean trypsin inhibitors, from 103 to 195 kJ mol⁻¹ depending on the product moisture (van den Hout et al., 1999). Comparable values, 102.3 kJ mol⁻¹ and 146 kJ mol⁻¹, were observed for adenosine deaminase (Alrokayan, 2002) and pectinmethylesterase (Vivar-Vera et al., 2007) from skeletal muscle and hawthorn, respectively.

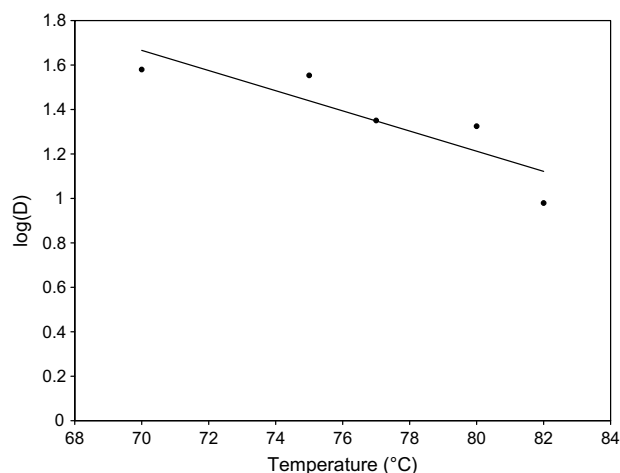


Fig. 2. Variation of the decimal reduction time (D) with temperature for cerein 8A. The regression equation was determined as $y = -0.0454x + 4.842$ ($r^2 = 0.7698$).

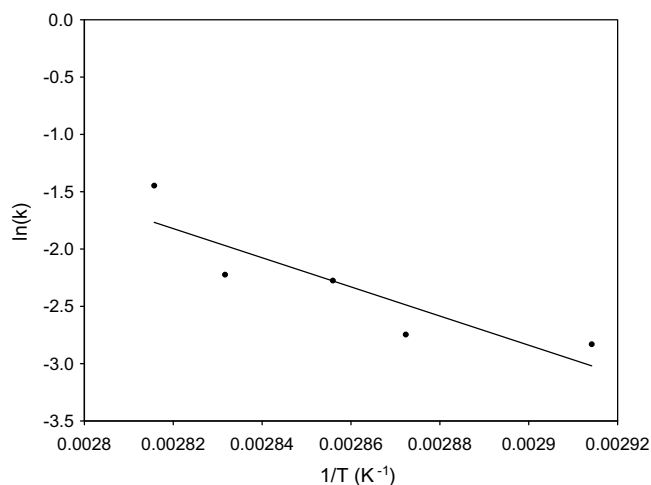


Fig. 3. Arrhenius plot of inactivation rates of cerein 8A. The regression equation was determined as $y = -12717x + 34.04$ ($r^2 = 0.7782$).

Table 2
Thermodynamic parameter values of thermal inactivation of cerein 8A activity

ΔE (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
105.7	102.8	104.7	-5.39

Table 2 also shows thermodynamic values (ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger and ΔS^\ddagger) obtained from Eq. (5)–(7). Similar data is poorly available for other antimicrobial peptides. The unfolding thermodynamics of the circular bacteriocin AS-48 was investigated by differential scanning calorimetry (Cobos et al., 2001). Those authors found that the specific enthalpy change upon unfolding is unusually small ($\Delta H_m = 230$ kJ mol⁻¹), whereas the Gibbs energy change at 25 °C is relatively high ($\Delta G_{298} = 32.8$ kJ mol⁻¹). This was attributed in part by asymmetry of charge distribution in protein surface, one of the sides display a cluster of positive charges and the opposite side is mostly hydrophobic. Cerein 8A was shown to have similar structural features, presenting amphipathic properties (Bizani et al., 2005b). In agreement, pediocin PA-1 is a heat-stable bacteriocin that exhibit both cationic and hydrophobic properties. This peptide undergoes conformational changes during heating from 20 °C to 80 °C, and irreversible aggregation is observed at pH 7 and 8, but not at pH 6 (Gaussier et al., 2003). Studies on the thermal denaturation of lysozyme showed the standard free energy change (ΔG^\ddagger) was 83.7 kJ mol⁻¹ at pH 7, decreasing to 32.2 kJ mol⁻¹ at pH 2 (Timasheff and Xie, 2003). In addition, the values of standard enthalpy change (ΔH^\ddagger) at unfolding temperature (T_m), as determined by the van't Hoff equation, were lower at pH 2 than at pH 7.

Bacteriocins may be used in combination with heat to obtain safe food with minimal destruction of food components such as flavor, color or nutrients during processing. However, adequate kinetic models of thermal destruction are essential to design new processes assuming a safe food product and giving a maximum retention of quality factors (Lenz and Lund, 1980; van Boekel, 1996). In this concern, the knowledge about kinetics and thermodynamics of heat inactivation of bacteriocins is an essential step to achieve this purpose.

5. Conclusions

Based on an isothermal experiment in the temperature range of 70–82 °C, and by using Arrhenius and thermal death time models,

thermal inactivation of cerein 8A could be described by a first-order kinetic model. D -, z - and k -values calculated by linear regression suggest that cerein 8A is a relatively thermostable bacteriocin with a z -value of 22 °C and E_a of 105.7 kJ mol⁻¹. More studies about kinetics of thermal inactivation of bacteriocins are necessary to allow their proper utilization as natural biopreservatives in the food industry.

Acknowledgments

Authors thank the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

References

- Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K., 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology* 87, 35–43.
- Alrokayan, S., 2002. Purification and characterization of adenosine deaminase from camel skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34, 1608–1618.
- Awuah, G.B., Ramaswamy, H.S., Economides, A., 2007. Thermal processing and quality: principles and overview. *Chemical Engineering and Processing* 46, 584–602.
- Bizani, D., Brandelli, A., 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *Journal of Applied Microbiology* 93, 512–519.
- Bizani, D., Brandelli, A., 2004. Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 158–162.
- Bizani, D., Motta, A.S., Morrissy, J.A.C., Terra, R.M., Souto, A.A., Brandelli, A., 2005a. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology* 8, 125–131.
- Bizani, D., Dominguez, A.P.M., Brandelli, A., 2005b. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology* 41, 269–273.
- Bizani, D., Morrissy, J.A.C., Dominguez, A.P.M., Brandelli, A., 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology* 121, 229–233.
- Bozari, I.S., Humpheson, L., Adams, M.R., 1998. Effect of nisin on health injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology* 43, 7–13.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1–20.
- Cobos, E.S., Filimonov, V.V., Galvez, A., Maqueda, M., Valdía, E., Martínez, J.C., Mateo, P.L., 2001. AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. *FEBS Letters* 505, 379–382.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058–1071.
- Dominguez, A.P.M., Bizani, D., Cladera-Olivera, F., Brandelli, A., 2007. Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 35, 238–243.
- Espach-Barroso, A., Loey, A.V., Hendrickx, M., Martín-Belloso, O., 2006. Inactivation of plant pectin methyltransferase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7, 40–48.
- Gao, Y.L., Ju, X.R., 2008. Exploiting the combined effects of high pressure and moderate heat with nisin on inactivation of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Microbiological Methods* 72, 20–28.
- Gaussier, H., Lavoie, M., Subirade, M., 2003. Conformational changes of pediocin in an aqueous medium monitored by Fourier transform infrared spectroscopy: a biological implication. *International Journal of Biological Macromolecules* 32, 1–9.
- Lenz, M.K., Lund, D.B., 1980. Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components. *Food Technology* 34, 51–55.
- Motta, A.S., Brandelli, A., 2002. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 63–70.
- 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.
- Pedersem, P.B., Bjornvad, M.V., Rasmussen, M.D., Petersen, J.N., 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36, 155–161.
- Polydera, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S., 2003. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering* 60, 21–29.
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Annual Review of Microbiology*, 357–364.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845–857.
- Stumbo, C.R., 1973. *Thermobacteriology in Food Processing*, second ed. Academic Press, New York.

- Timasheff, S.N., Xie, G., 2003. Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. *Biophysical Chemistry* 105, 421–448.
- Van Boekel, M.A.J.S., 1996. Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. *Journal of Food Science* 61, 477–485.
- Van den Hout, R., Meerdink, G., van't Riet, K., 1999. Modeling of the inactivation kinetics of the trypsin inhibitors in soy flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 63–70.
- Vivar-Vera, M.A., Salazar-Montoya, J.A., Calva-Calva, G., Ramos-Ramírez, E.G., 2007. Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT Food Science and Technology* 40, 278–284.
- Von Döhren, H., 1995. Peptides. *Biotechnology* 28, 129–171.



Short Communication

Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate

Rosiele Lappe, Amanda S. Motta, Voltaire Sant'Anna, Adriano Brandelli *

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2009

Received in revised form 1 September 2009

Accepted 2 September 2009

Keywords:

Antimicrobial peptide

Bacteriocin

*Bacillus cereus**Salmonella* Enteritidis

Transmission electron microscopy

ABSTRACT

The ability of the bacteriocin cerein 8A to inhibit *Salmonella* Enteritidis in combination with EDTA and sodium lactate was investigated. *Salmonella* Enteritidis was incubated with combinations of cerein 8A (3200 AU/mL) and EDTA (20, 50, 100 mmol/L) or sodium lactate (200 mmol/L). All treatments caused a significant reduction in the OD₆₀₀ values of *Salmonella* Enteritidis cultures. The addition of cerein 8A plus EDTA resulted in higher inhibition in comparison with the bacteriocin alone; the greater the concentration of EDTA, the greater the inhibitory effect. The combination of cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA results in a more efficient treatment to reduce the number of viable cells of *Salmonella* Enteritidis. The combination of cerein 8A plus sodium lactate also showed significant inhibition of the indicator organism. Transmission electron microscopy showed damaged cell walls and loss of protoplasmic material in treated cells. The cells of *Salmonella* Enteritidis treated with cerein 8A plus EDTA appeared more injured. The bacteriocin cerein 8A may be useful to inhibit Gram-negative bacteria, with enhanced effect in combination with chelating agents. Control of *Salmonella* Enteritidis, a Gram-negative bacterium constantly linked to food outbreaks, addresses an important aspect of food safety.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bacteriocins are antimicrobial peptides widespread produced by bacteria. Those produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of intensive investigation because of their potential use as biopreservatives in the food industry (O'Sullivan et al., 2002). These compounds have been effectively characterized and tested in food systems to combat pathogenic and spoilage microorganisms. Several bacteriocins from LAB have been studied as natural additives in the food industry and as antimicrobials in pharmaceutical purposes (Bower et al., 2001; Papagianni and Anastasiadou, 2009). Nisin is the most well characterized bacteriocin and its use in food is permitted in more than 40 countries (Cleveland et al., 2001; Galvéz et al., 2007). Many studies have demonstrated that the bacteriocins pediocin and nisin can reduce or inhibit *Listeria monocytogenes* in dairy products, particularly in pasteurized cheeses (Deegan et al., 2006; Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008).

Despite the intensive work on LAB, *Bacillus* is another interesting genus to investigate for antimicrobial peptides since this genus includes a variety of industrially important species and has a history of safe use in food and industry (Pedersem et al., 2002). The production of bacteriocins or bacteriocin-like substances (BLS) has been already described for many *Bacillus* species such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

licheniformis and *Bacillus cereus*, among other (von Döhren, 1995; Stein, 2005).

B. cereus 8A was isolated from soils of native woodlands of Southern Brazil. This strain produces a bacteriocin, cerein 8A, which inhibits several pathogenic and food-spoilage microorganisms (Bizani and Brandelli, 2002). This substance has a bactericidal effect on *Listeria monocytogenes* and *B. cereus*, apparently by disturbing the membrane function of target organisms (Bizani et al., 2005). Preliminary studies suggested that cerein 8A could inhibit *Salmonella* as well (Bizani et al., 2005).

The efficacy of many antimicrobial peptides to inactivate Gram-positive pathogens and spoilage organisms such as *L. monocytogenes* and *Clostridia* is well established (Cleveland et al., 2001; O'Sullivan et al., 2002). However, Gram-negative spoilage and pathogenic bacteria are especially problematic in food protection due to their inherent resistance to some antimicrobials that are applicable or present in foods (Helander et al., 1997). The architecture of the outer membrane (OM) of Gram-negative microorganisms prevents the penetration of many bacteriocins to their target, the cytoplasmic membrane, and therefore confers a high degree of resistance (Stevens et al., 1991; Schved et al., 1994). Chelating agents such as EDTA as well as the application of sublethal stress such as heating or freezing were shown to disrupt the permeability barrier of the OM leading to an increased sensitivity of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* towards nisin (Stevens et al., 1991; Kalchayanand et al., 1992).

Human salmonellosis occurs mainly due to consumption of food and water contaminated with *Salmonella* spp. Several foods have been associated with this infection. However, in recent years an increase of

* Corresponding author. Fax: +55 51 3308 7048.
E-mail address: abrand@ufrgs.br (A. Brandelli).

human salmonellosis due to the serotype Enteritidis was observed throughout the world, mainly related to chicken eggs and derivatives (Geimba et al., 2004). Although the combination of nisin with chelating agents to combat *Salmonella* has been investigated, studies with other antimicrobial peptides are scarce (Galv ez et al., 2007). The aim of this work was to investigate the effect of the bacteriocin cerein 8A in combination with EDTA and sodium lactate against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, a Gram-negative bacterium constantly linked to food outbreaks.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The producer strain was *B. cereus* 8A, isolated and characterized as described by Bizani and Brandelli (2002). The indicator strains *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 were stored in 20% glycerol at $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, and propagated twice in BHI broth (Becton & Dickinson, Cockeysville, MD, USA) before use.

2.2. Bacteriocin preparation and activity

B. cereus 8A was grown in BHI broth at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a shaker at 125 cycles/min for 32 h. The culture was centrifuged at $10,000\times g$ for 15 min. The bacteriocin was purified as described previously (Bizani et al., 2005). Briefly, ammonium sulfate was added to reach 70% saturation. The resulting pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS; 5 mmol/L sodium phosphate, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) and extracted with 1-butanol (0.7 vol.). After butanol evaporation, the bacteriocin was stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until its use for antimicrobial assays. The antimicrobial activity of the bacteriocin was assessed by agar disc diffusion assay. Aliquots (20 μL) of the bacteriocin preparation were applied onto 6-mm cellulose discs on agar plates previously inoculated with a 0.5 McFarland suspension of the indicator strain. Inhibition zones were measured after incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The bacteriocin titer was calculated by the serial dilution method (Motta and Brandelli, 2002).

2.3. Chemicals

The chemicals used were disodium EDTA (Merck, Darmstadt, Germany) and sodium lactate (Sigma, St. Louis, MO, USA). Stock solutions (1 mol/L) were prepared by dissolving the chemical in deionized water and were sterilized by autoclaving.

2.4. Determination of microbial counts

Viable cell counts, expressed as colony-forming units (CFU/mL), were determined as described previously (Motta and Brandelli, 2002). Bacterial suspensions were diluted to 10^{-6} in 8.75 g NaCl/L; the samples were homogenized and then plated (20 μL) in triplicate onto nutrient agar (Becton Dickinson) plates. The plates were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h, and 30–100 colonies were counted. In parallel, the optical density of the cultures at 600 nm (OD_{600}) was measured.

2.5. Antimicrobial effect on *Salmonella* Enteritidis

An overnight culture of *Salmonella* Enteritidis was obtained by growing the respective bacteria in BHI medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, 1.0 mL was transferred to 250 mL Erlenmeyer flask containing 99 mL of medium and incubated in a shaker at 125 cycles/min for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Growth was monitored by viable cell counts to reach 10^6 CFU/mL. Aliquots of 1 mL were centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min and the pellet was used in antimicrobial assay. The pellets were suspended with solutions containing the bacteriocin alone in concentration of 3200 activity units (AU)/mL, EDTA alone in concentrations of 20, 50 and 100 mmol/L, or 200 mmol/L sodium lactate. The substances tested were

diluted in 1 g/L peptone water to reach the working concentrations. To evaluate the synergistic effect of chemicals in the action of bacteriocin, it was added in combination with the three concentrations of EDTA (20, 50 and 100 mmol/L) and with 200 mmol/L sodium lactate. Cells treated with peptone medium served as controls. All treatments were incubated for 90 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and were carried out in triplicate. Effects of cerein 8A on *Salmonella* Enteritidis were evaluated by turbidity (OD_{600}), the number of viable cells after the incubation period. Synergistic effect (SE) was defined by the following equation:

$$SE = (\log \text{reduction of mixture}) / (\sum \text{individual log reductions})$$

2.6. Transmission electron microscopy

Samples were taken from all treatments and control after the incubation period. Cells were harvested by centrifugation and washed twice with 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.3). The cells were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 2.0% (v/v) formaldehyde in 0.12 mol/L phosphate buffer for 10 days and then postfixed in 2% (w/v) osmium tetroxide in the same buffer for 45 min. The samples were dehydrated in a graded acetone series (30–100%) and embedding in Araldite-Durcupan for 72 h at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Thin sections (microtome UPC-20, Leica) were mounted on grids, covered with collodion film, and poststained with 2% uranyl acetate in Reynold's lead citrate. All preparations were observed with a JEOL JEM 1200ExII electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 120 kV.

3. Results

Cerein 8A preparation showed inhibitory zones as predicted against the indicator strain *B. cereus* ATCC 14579, with an activity of 6400 AU/mL. The inhibition of *Salmonella* Enteritidis by the action of cerein 8A, EDTA and sodium lactate was first monitored by measurement of the optical density at 600 nm after the incubation period of 90 min (Fig. 1). The results indicated that all treatments tested, namely EDTA, sodium lactate and cerein 8A, alone and in combination, caused a significant reduction in the OD_{600} values of *Salmonella* Enteritidis cultures. When a cell suspension of *Salmonella* Enteritidis was treated with 3200 AU/mL cerein 8A the OD_{600} values

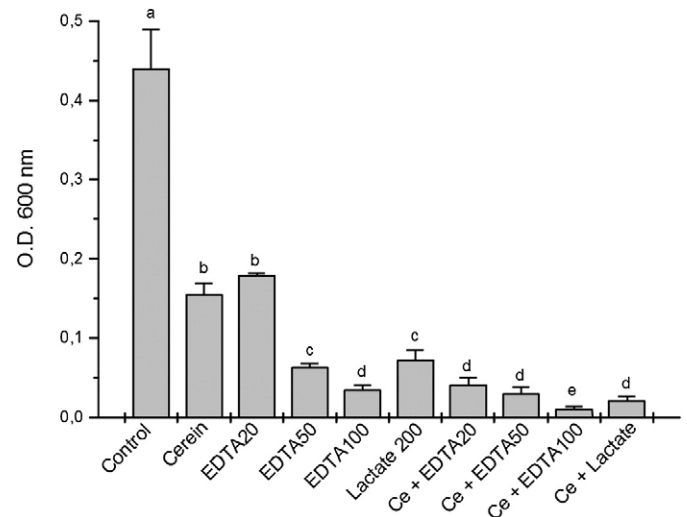


Fig. 1. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A and chelators. Cells were incubated with 3200 AU/mL cerein 8A (Ce), EDTA (20, 50 and 100 mmol/L), and sodium lactate (200 mmol/L) alone or in combination. Optical density was monitored in control and treated cells were monitored after 90 min. The mean O.D. of cell suspensions before incubation was 0.387 ± 0.045 . Bars are the mean \pm SEM of three independent experiments.

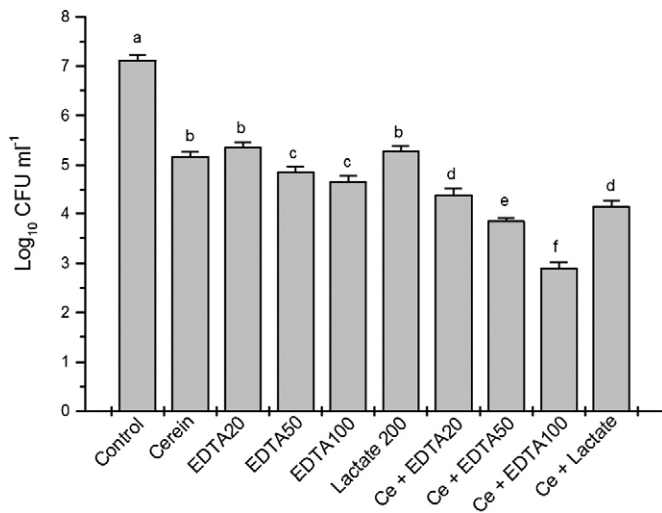


Fig. 2. Effect of cerein 8A and chelators on viability of *Salmonella* Enteritidis. Cells were incubated with 3200 AU/mL cerein 8A (Ce), EDTA (20, 50 and 100 mmol/L), and sodium lactate (200 mmol/L) alone or in combination. Viable cell counts were determined after incubation. Bars are the mean \pm SEM of three independent experiments.

Table 1
Reduction of viable counts of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A in combination with EDTA and sodium lactate.

Chemical	Log ₁₀ reduction		Synergistic effect
	Alone	Plus cerein 8A	
None	0	1.38	–
EDTA (20) ^a	1.77	2.69	0.85
EDTA (50)	2.27	3.26	0.89
EDTA (100)	2.47	4.22	1.10
Lactate (200)	1.85	2.96	0.92

^a Concentration expressed as mmol/L; cerein 8A was used at 3200 AU/mL.

were much lower than those of the controls without bacteriocin. The addition of bacteriocin plus all concentrations tested of EDTA or sodium lactate resulted in greater inhibition than obtained with the bacteriocin alone. The efficiency in reducing OD₆₀₀ of cell suspensions of *Salmonella* Enteritidis by the action of bacteriocin has increased as the concentration of EDTA increased. The treatment with cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA proved to be more effective. The combination of cerein 8A plus sodium lactate also showed significant inhibition of the indicator organism (Fig. 1).

The effect of cerein 8A and combinations with EDTA and lactate on the survival of *Salmonella* Enteritidis was also observed by measurement of viable cell counts. All treatments caused a decrease in the number of viable cells (Fig. 2). When a cell suspension of *Salmonella* Enteritidis was treated with cerein 8A the viable counts were lower than those of the controls without bacteriocin. The addition of bacteriocin plus EDTA resulted in higher inhibition in comparison with the bacteriocin alone; the greater the concentration of EDTA, the greater the inhibitory effect. Although a similar trend was observed, these reductions were not always correlated with those observed for OD measurements, indicating that different inhibitory mechanisms or different proportions of injured cells might be involved among the treatments. The log reductions in viable cells and the synergistic effect (SE) of cerein 8A plus chemicals were calculated (Table 1). The combination of cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA results in a more efficient treatment to reduce the number of viable cells of *Salmonella* Enteritidis (Table 1). Reductions of more than 2 log cycles in viable counts were observed in all treatments consisting of bacteriocin plus chemical. Higher SE was observed for cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA (Table 1).

Salmonella Enteritidis harvested from a 10⁶CFU/mL culture were incubated for 90 min with cerein 8A and chemicals. After incubation, the microorganisms were separated and prepared for transmission electron microscopy. The results can be visualized in Fig. 3. Control cells showed integrity and absence of detectable injury. The treated cells showed vesiculation of the protoplasm, pore formation, and in some cases, complete disintegration of the cells. The cells of *Salmonella* Enteritidis treated with cerein 8A alone showed small pores and the treatment does not affect the majority of cells. When the chelating agent EDTA was added the cells appeared more damaged. The injuries in cell wall become more marked with the combination of EDTA plus cerein 8A, including noticeable discharge of intracellular material, as shown for treatments with 50 and 100 mmol/L EDTA plus cerein 8A. Combination of cerein 8A with sodium lactate caused similar injury in *Salmonella* Enteritidis cells (Fig. 3).

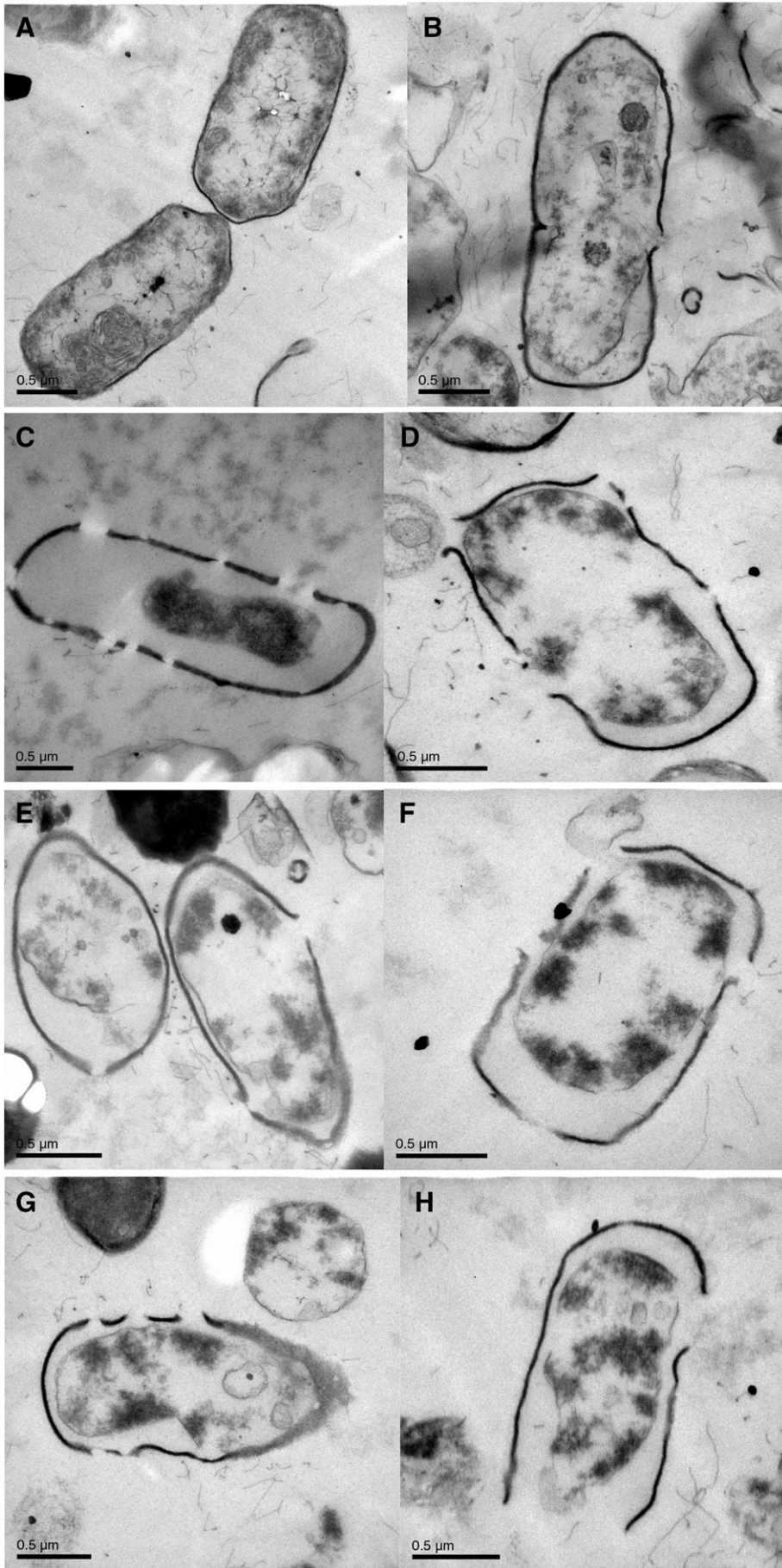
4. Discussion

Cerein 8A, an antimicrobial peptide produced by *B. cereus* 8A showed inhibitory activity against pathogenic and spoilage Gram-positive bacteria (Bizani and Brandelli, 2002). The results of this work indicate that this substance is also inhibitory against *Salmonella* Enteritidis. This effect was clearly improved with the addition of EDTA and sodium lactate. EDTA alone, in all concentrations, reduced the number of viable cells of *Salmonella* Enteritidis and their effect on increased permeability of the cells could be observed, where the increased concentration of EDTA reflected in increased damage to the cells. Chelating agents are compounds capable to destabilize the structure and alter the permeability of the OM (Vaara, 1992). Substances like EDTA, which bind magnesium ions in the lipopolysaccharides (LPS) layer, and membrane-disrupting agents such as trisodium phosphate, have been shown to be effective against *Salmonella* spp. (Shefet et al., 1995) and *Campylobacter* spp. (Slavik et al., 1994) in both poultry products and pure culture (Somers et al., 1994).

The transmission electronic microscopy showed pores on the cell envelope of *Salmonella* Enteritidis caused by cerein 8A, which justified the reduction in the number of viable cells. The improved effect of EDTA on the activity of cerein 8A could be verified by the noticeable reduction in the number of viable cells and supported by transmission electron microscopy, where the effects of this synergism resulted in remarkable pore formation, loss of intracellular contents and in some cases, destruction of the cells. In this case, extensive cell damage is most likely due to weakening of the OM following sequestration of magnesium ions by the chelating agents (Montville and Bruno, 1994). Electron microscopy studies on *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* treated with the bacteriocins nisin and pediocin ACh following pressurization showed extensive changes on the cell surface topography and morphology, indicating damage to the cell envelope (outer- and inner-membranes). Similar changes were observed for both bacteriocins (Kalchayanand et al., 2004).

The combined effect of bacteriocins with chelating agents has been investigated based on the hurdle concept (Cleveland et al., 2001). Combinations of nisin with chelators or physical disruption of the cells have been successfully applied to kill *E. coli* (Kalchayanand et al., 1992; Shefet et al., 1995). The bacteriocins nisin and lactocin 705/AL705 inhibited *E. coli* in combination with 500 and 1000 mmol/L EDTA and 800 mmol/L sodium lactate (Belfiore et al., 2007). These elevated concentrations may be necessary if the bacteriocin source contains high levels of Ca²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺ ions coming from the culture medium (e.g. supernatant concentrates). High concentrations of chelators may be also necessary to remove exogenous divalent cations associated with food systems and still be effective enough to destabilize the OM of Gram-negative bacteria present.

Fig. 3. Transmission electron microscopy of cells of *Salmonella* Enteritidis after treatments: (A) Control, (B) cerein 8A, (C) 50 mmol/L EDTA, (D) 100 mmol/L EDTA, (E) cerein 8A plus 20 mmol/L EDTA, (F) cerein 8A plus 50 mmol/L EDTA, (G) cerein 8A plus 100 mmol/L EDTA, (H) cerein 8A plus 200 mmol/L sodium lactate.



The combined effect of chelators on Gram-negative bacteria is mostly associated with LAB bacteriocins, and reports on other antimicrobial peptides are scarce (Motta et al., 2008). Cerein 8A was effective with relatively lower dose of EDTA or sodium lactate, possibly because it had an inhibitory effect on *Salmonella* by itself, contrary to that observed with nisin and other LAB bacteriocins (Belfiore et al., 2007; Galv ez et al., 2007).

The mechanisms of action of peptide antibiotics are diverse, but the bacterial membrane is the target for most bacteriocins (Cleveland et al., 2001). Cerein 8A caused a significant growth inhibition of *Salmonella* Enteritidis, suggesting a bactericidal mode of action. The simultaneous decrease in the OD also indicates the cells were lysed. Similarly, the bacteriolytic effect of the bacteriocin linenscin OC2 on *Listeria innocua* was observed by noteworthy decrease in OD readings (Boucabeille et al., 1997). Transmission electron microscopy showed damaged cell walls and loss of protoplasmic material. These results suggest that the mode of action of cerein 8A is to interfere with cell membranes. The mechanism of interaction of antimicrobial peptides with Gram-negative bacteria has been proposed. The initial association with the bacterial membrane occurs through electrostatic interaction with the LPS in the outer membrane leading to membrane perturbation. The cationic peptides displace Mg^{2+} and Ca^{2+} cations from the negatively charged LPS leading to a local disturbance in the outer membrane. This facilitates the formation of destabilized areas through which the peptide translocates the outer membrane in a process termed self-promoted uptake (Powers and Hancock, 2003).

Our results corroborate that the inhibitory activity of cerein 8A on Gram-negative bacteria can be enhanced when the OM is altered by chemical treatment with chelating agents. The treatment with EDTA in combination with cerein 8A results in a most effective strategy against *Salmonella* Enteritidis and may be valuable in controlling this bacterium in food.

Acknowledgments

Authors thank the Centro de Microscopia Eletrônica UFRGS for technical support on electron microscopy. This work was supported by CNPq (Brazil).

References

- Belfiore, C., Castellano, P., Vignolo, G., 2007. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiology* 24, 223–229.
- Bizani, D., Brandelli, A., 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *Journal of Applied Microbiology* 93, 512–519.
- Bizani, D., Motta, A.S., Morrissy, J.A.C., Terra, R.M., Souto, A.A., Brandelli, A., 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology* 8, 125–131.
- Boucabeille, C., Mengin-Lecreulx, D., Henkes, G., Simonet, J.M., van Heijenoort, J., 1997. Antibacterial and hemolytic activities of linescin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. *FEMS Microbiology Letters* 153, 295–301.
- Bower, C.K., Bothwell, M.K., McGuire, J., 2001. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 22, 259–265.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1–20.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058–1071.
- Galv ez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51–70.
- Geimba, M.P., Tondo, E.C., Oliveira, F.A., Canal, C.W., Brandelli, A., 2004. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Journal of Food Protection* 67, 1229–1233.
- Helander, I.M., von Wright, A., Mattila-Sandholm, T.M., 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology* 8, 146–150.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B., 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin ACh and nisin. *Letters in Applied Microbiology* 15, 239–243.
- Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A., Ray, B., 2004. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* 91, 91–98.
- Montville, T.J., Bruno, M.E.C., 1994. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *International Journal of Food Microbiology* 24, 53–74.
- Motta, A.S., Brandelli, A., 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 63–70.
- Motta, A.S., Flores, F.S., Souto, A.A., Brandelli, A., 2008. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. *Antonie van Leeuwenhoek* 93, 275–284.
- 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.
- Papagianni, M., Anastasiadou, S., 2009. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 8, 3–16.
- Pedersem, P.B., Bjornvad, M.V., Rasmussen, M.D., Petersen, J.N., 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36, 155–161.
- Powers, J.P.S., Hancock, R.E.W., 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24, 1681–1691.
- Schved, F., Henis, Y., Juven, B.J., 1994. Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 21, 305–314.
- Shefet, S.M., Sheldon, B.W., Klaenhammer, T.R., 1995. Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit *Salmonella typhimurium* and extend shelf life of broiler carcasses. *Journal of Food Protection* 58, 1077–1082.
- Slavik, M.F., Kim, J., Pharr, M.D., Raben, D.P., Tsai, S., Lobsinger, C.M., 1994. Effect of trisodium phosphate on *Campylobacter* attached to post-chill chicken carcasses. *Journal of Food Protection* 57, 324–326.
- Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O., 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal* 18, 329–343.
- Somers, E.B., Schoeni, J.L., Wong, A.C.L., 1994. Effects of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 22, 269–276.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845–857.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R., 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3612–3615.
- Vaara, M., 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology Reviews* 56, 395–411.
- Von Döhren, H., 1995. Peptides. *Biotechnology* 28, 129–171.