

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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *Bacillus liqueniformis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MÁRIO LETTIERI TEIXEIRA

Orientador: Dr. Adriano Brandelli

Outubro, 2007

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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *Bacillus liqueniformis***

Dissertação 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 Mestre em Biologia celular e molecular.

MÁRIO LETTIERI TEIXEIRA
Farmacêutico-Bioquímico
Orientador: Dr. Adriano Brandelli

Outubro, 2007

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois sem ele não haveria vida.

Ao Prof. Adriano Brandelli pela oportunidade a mim dada, pela sua paciência, atenção e pela excelente orientação que me foi dada.

Aos meus estimados colegas do laboratório 218, pela paciência, pela ajuda, carinho e amizade.

Aos meus amigos Alexandre e Emanuel, os quais me ajudaram nesta etapa da minha vida.

A minha família, especialmente a minha mãe (Carmela), ao meu pai (Vanderlei), ao meu irmão (Leandro), a minha dinda (Teresinha), a nona (Nicolina), ao nono (Mário) e a minha avó (Sueli – *in memoriam*), sem os quais eu não iria conseguir chegar ao final desta caminhada.

A minha noiva e futura esposa Fernanda pela paciência que teve comigo.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por proporcionar um ensino público de qualidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo Geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. Peptídeos Antimicrobianos: Função e Distribuição.....	14
3.2. Peptídeos Antimicrobianos produzidos por Bactérias.....	15
3.3. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Gram-negativas.....	16
3.4. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Gram-positivas.....	17
3.5. Uso de Bacteriocinas na Biopreservação de Alimentos.....	18
3.6. Características e Classificação das Bacteriocinas.....	20
3.7. Mecanismo e Espectro de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos...	21
3.8. Purificação.....	24
3.9. Bacteriocinas Produzidas pelo Gênero <i>Bacillus</i>	25
3.10. Bacteriocinas Produzidas por <i>Bacillus licheniformis</i>	26
3.11. Toxicidade da Bacteriocina Produzida por <i>Bacillus licheniformis</i>	27
3.12. Nanovesículas.....	28
4. CAPÍTULO I.....	30
4.1. Conclusões.....	36

5. CAPÍTULO II.....	37
5.1. Conclusões.....	58
6. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

AU: Unidades arbitrárias

BLS: Substância tipo-bacteriocina

CBiot: Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

cm: Centímetro

μL: Microlitro

mL: Mililitro

μg: Micrograma

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

rpm: Rotações por minuto

Da: Daltons

kDa: Quilodaltons

M: Molar

min: Minuto

mM: Milimolar

mm: Milímetro

NCB: Nanovesícula contendo bacteriocina

FDA: *Food and Drug Administration*

GRAS: *Generally Regarded as Safe*

**Purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por
*Bacillus liqueniformis***

Autor: Mário Lettieri Teixeira

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Bacillus licheniformis P40 produz uma bacteriocina que apresenta potencial para utilização como bioconservante no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos entre os quais se destacam *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Erwinia carotovora*. Estas substâncias possuem grande potencial biotecnológico que pode ser explorado pela indústria alimentícia. Assim sendo, este trabalho teve como objetivos a purificação e incorporação do peptídeo antimicrobiano em nanovesículas. A bacteriocina foi incorporada em nanovesículas de fosfatidilcolina, resultando em partículas de cerca de 570 nm. Houve Inibição completa do crescimento de *L. monocytogenes* com a adição de 100 e 50 UA.mL⁻¹ de bacteriocina encapsulada e livre, respectivamente. Observou-se uma redução no número de células viáveis para zero após 12 minutos de incubação com 400 UA.mL⁻¹ de bacteriocina encapsulada e livre, apresentando uma estabilidade de até 28 dias a 4°C, para a forma encapsulada. O composto bacteriano foi purificado através de etapas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de gel-filtração em Sephadex G-100 e cromatografia de fase reversa em Source-RPC. A purificação resultou num fator de 100 vezes com rendimento de 0.3%. A massa molecular do peptídeo foi determinado em cerca de 800 Da por espectrometria de massas. A bacteriocina é

termo-resistente, suportando aquecimento a 100°C por 5 minutos, e estável na faixa de pH de 6 a 10, porém sensível à ação de pronase E, butanol e ácido tricloroacético. O experimento realizado revelou ainda propriedades emulsificantes desta substância. Dados de espectroscopia de infravermelho indicaram uma estrutura molecular semelhante à de lipopeptídeos como, a surfactina e a lichenisina. Em relação à toxicidade frente a hemácias, em testes qualitativos, aferiram-se propriedades atóxicas, o que pode sugerir estudos mais detalhados sobre ensaios toxicológicos para uma provável utilização em produtos alimentícios.

**Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by
*Bacillus liqueniformis***

Author: Mário Lettieri Teixeira

Advisor: Adriano Brandelli

ABSTRACT

Bacillus licheniformis P40 produces a bacteriocin that presents potential for use as biopreservative in the control of pathogenic and spoilage microorganisms like *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Erwinia carotovora*. In that way, these substances present a biotechnological interest that it can be explored by the food industry. This work has as objectives the purification and incorporation of antimicrobial peptide into nanovesicles. The bacteriocin was incorporated in phospholipidic nanovesicles, resulting in particle size of about 570 nm. There was complete inhibition of the growth of *L. monocytogenes* with the addition of 100 and 50 UA.mL⁻¹ of encapsulated and free bacteriocin, respectively. It was observed a reduction in the number of viable cells to zero after 12 minutes incubation with 400 UA.mL⁻¹ of encapsulated or free bacteriocin, presenting a stability of until 28 days to 4°C for the encapsulated form. The bacterial composition was purified through steps of precipitation with ammonium sulfate, gel-filtration chromatography in Sephadex G-100 and reverse phase chromatography Source-RPC. The purification factor was 100 fold with yield of 0.3%. The molecular mass of the peptide was determined as about 800 Da by mass spectrometry. The bacteriocin was heat resistant, supporting heating at 100°C for 5 minutes, was stable at pH from 6 to 10, but sensitive to the action of pronase E, butanol and trichloroacetic

acid. Accomplished experiment indicated the peptide has emulsifying properties. Infrared spectroscopy indicated a molecular structure similar to some lipopeptides like surfactin and lichenisin. In relation to the toxicity front erythrocytes, non-toxic properties were observedd, which indicate more detailed studies on toxicological rehearsals for a probable use in food products.

1. INTRODUÇÃO

A manipulação inadequada de alimentos ou a deterioração dos mesmos por microrganismos são aspectos fundamentais no mercado alimentício atual, visto que, o número de casos de doenças veiculadas a alimentos tem aumentado consideravelmente.

Na indústria de alimentos, uma das principais dificuldades na manufatura de determinados produtos relaciona-se com a presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos, trazendo consideráveis prejuízos para a saúde humana. A busca por novos aditivos, que possam controlar estes microrganismos, é de suma importância e devido ao avanço da biotecnologia, já se utilizam bactérias produtoras de bacteriocinas (substâncias bactericidas, de origem protéica com atividade específica frente a outras bactérias), como é o caso de bactérias lácticas, que sintetizam a nisina.

Dessa forma, a investigação de bactérias que produzam substâncias que inibam espécies deteriorantes e/ou patogênicas tem sido alvo de interesse por diversos grupos de pesquisa, os quais testam à utilização de bacteriocinas, ou ainda substâncias denominadas como “*bacteriocin like-substances (BLS)*” com esta finalidade.

Dessa maneira, a descoberta de novas substâncias ocasiona também a necessidade de estudos toxicológicos, pois de nada adianta ter em mãos um composto químico extremamente eficaz, mas que ao mesmo tempo apresente propriedades citotóxicas, tornando-se injustificável o seu uso em produtos de consumo humano.

Bacillus licheniformis P40 foi a bactéria alvo deste estudo, porque foi caracterizada por produzir um peptídeo antimicrobiano com atividade contra diversos microrganismos patogênicos e deteriorantes. Além disso, o gênero *Bacillus* apresenta um grande potencial biotecnológico como produtor de compostos antimicrobianos. A linhagem indicadora escolhida foi a *Listeria monocytogenes*, conhecida por contaminar alimentos e causar patologias em humanos.

Portanto, este trabalho foi desenvolvido para determinar o processo de purificação de uma bacteriocina produzida por *Bacillus licheniformis* P40, seu mecanismo de ação e a utilização desta substância incorporada em veículos que diminuam o seu tempo de degradação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir, purificar e caracterizar a substância antibacteriana sintetizada por *Bacillus licheniformis* P40.

2.2 Objetivos Específicos

1. Obter um composto com atividade antimicrobiana a partir de uma cultura de *B. licheniformis*, isolada do peixe *Leporinus* sp.
2. Purificar esta substância através de métodos cromatográficos.
3. Caracterizar a atividade antimicrobiana, avaliando qual a concentração inibitória e cinética de ação contra *Listeria monocytogenes*.
4. Confeccionar uma nanovesícula contendo este composto para avaliar a atividade antimicrobiana e estabilidade do mesmo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Peptídeos Antimicrobianos: Função e Distribuição

A emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais gerou um crescente interesse no estudo de peptídeos naturais com atividades antibióticas. Tais peptídeos, denominados peptídeos antimicrobianos, participam do sistema inato de defesa de animais e plantas. Atualmente, existem mais de 500 peptídeos antimicrobianos isolados e estudados. A produção de peptídeos antimicrobianos faz parte dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante as etapas iniciais de infecção e sua importância na proteção contra patógenos tem sido descrita nas últimas décadas (HANCOCK & SCOTT, 2000; ZASLOFF, 2002).

Nos animais superiores, os sistemas de defesa imunológica do tipo celular e do tipo humoral não são acionados de forma rápida o suficiente para evitar a exposição inicial do organismo aos agentes patogênicos. Os locais onde o primeiro encontro com micróbios ocorre com mais frequência são as superfícies epiteliais (pele, olhos, vias aéreas, trato digestivo, vias urinárias e reprodutivas). Em mamíferos, por exemplo, estas superfícies secretam uma diversidade de peptídeos antimicrobianos, chamados defensinas, que formam uma barreira protetora contra infecção. As células fagocitárias também contêm em seu citoplasma diversos grânulos de armazenamento repletos de peptídeos antimicrobianos e enzimas digestivas. Estes grânulos esvaziam seu conteúdo em

vacúolos fagocitários gerando altas concentrações de enzimas e peptídeos microbicidas, enquanto alguns tipos de grânulos secretam seu conteúdo de peptídeos para o fluido extracelular onde matam ou impedem o crescimento de micróbios (GANZ & LEHNER, 2001).

O epitélio dos invertebrados, especialmente o trato digestivo dos insetos, secretam peptídeos antimicrobianos que são importantes na defesa contra infecção por patógenos. Os artrópodes também possuem peptídeos antimicrobianos que podem ser secretados e dissolvidos na endolinfa após uma infecção, assim como outros peptídeos produzidos constitutivamente e armazenados em grânulos presentes no interior dos hemócitos. Os hemócitos podem secretar na linfa os peptídeos armazenados em seu interior em resposta a uma infecção ou utiliza-los internamente para matar micróbios fagocitados. Nas plantas, os peptídeos antimicrobianos estão presentes em diversas estruturas, especialmente nas sementes que são vulneráveis durante o período de germinação (GANZ & LEHNER, 2001).

3.2. Peptídeos Antimicrobianos Produzidos por Bactérias

As bacteriocinas são definidas como substâncias bactericidas, antimicrobianos de natureza protéica, sintetizados por algumas linhagens bacterianas com ação contra outras populações da mesma espécie, ou sobre outros organismos (TAGG, *et al.*, 1976; RILEY, 1998; MARINGONI & KUROSZAWA, 2002).

A diferença de espectro de ação entre as bacteriocinas e os antibióticos tradicionais é que as primeiras apresentam uma ação direcionada a uma determinada bactéria, ou a algumas bactérias, portanto, possuem um espectro de ação estreito, fato este que não ocorre com os antibióticos. Dessa forma, a quase totalidade das bactérias são produtoras de algum tipo de bacteriocina (KLAENHAMMER, 1988).

3.3. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Gram-negativas

As bacteriocinas produzidas por bactérias gram-negativas apresentam aspectos semelhantes quando comparadas entre si, tomando-se como base, por exemplo, tamanho, atividade antimicrobiana, modo de ação e mecanismos de imunidade. A bactéria inicialmente mais estudada foi a *Escherichia coli*, que produz a colicina, a qual é codificada por plasmídio. O tamanho das bacteriocinas tipo-colicinas pode variar de 449 a 629 resíduos de aminoácidos (BENEDETTI & GELI, 1996; JAMES, *et al.*, 1996; GOUAUX, 1997).

Pseudomonas aeruginosa apresenta produção de bacteriocinas, que se assemelham às colicinas e, também, bacteriocinas codificadas por cromossomo (SANO, *et al.*, 1990).

Bacteriocinas produzidas por *Serratia marcesens* também são semelhantes a colicinas e são codificadas por plasmídios e cromossomos (GUASCH, *et al.*, 1995; ENFADEQUE, *et al.*, 1996).

3.4. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Gram-positivas

As bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas são mais estudadas que as bacteriocinas produzidas por gram-negativas, visto que são mais difundidas na natureza, e apresentam uma maior diversidade (TAGG, *et al.*, 1976; JACK, *et al.*, 1995).

Mas existe uma diferença entre estes dois tipos de bacteriocinas. O ponto de discordância está relacionado quanto à produção da mesma, enquanto a síntese deste composto para a bactéria gram-negativa é em menor escala, pois a sua produção está relacionada ao meio em que estão crescendo. Para as gram-positivas esse processo metabólico é melhor explorado, já que existe um dispositivo de transporte que facilita a secreção destes metabólitos, devido a um sistema de regulação mais adequado (RILEY & WERTZ, 2002b).

As bactérias ácido-lácticas são as principais representantes de bactérias gram-positivas produtoras de bacteriocinas, especialmente devido à produção de nisina, bastante utilizada pela indústria de alimentos (TAGG, *et al.*, 1976; RILEY & WERTZ, 2002b).

Contudo a produção de bacteriocinas por bactérias gram-positivas necessita de muitos mais genes para codificar a sua composição. Um exemplo dessa afirmação é o caso da nisina que apresenta genes para a sua produção e genes para a clivagem e regulação de síntese (KUIPERS, *et al.*, 1993; Vandermeer, *et al.*, 1993; RA, *et al.*, 1999).

O espectro de ação destas bacteriocinas abrange bactérias gram-positivas e, com menor intensidade, gram-negativas. Entre as gram-positivas pode-se

destacar: espécies dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, e *Staphylococcus*. Enquanto, as bactérias gram-negativas que são susceptíveis a ação de bacteriocinas são *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, e *Neisseria*, espécies estas que apresentam uma importância clínica considerável, pois são responsáveis por patologias bastante difundidas (MOTA-MEIRA, *et al.*, 2000).

3.5. Uso das Bacteriocinas na Bioconservação de Alimentos

Muitas bactérias lácticas têm papéis importantes na produção de alimentos fermentados, e algumas destas bactérias podem ser capazes de inibir o crescimento de uma grande variedade dos organismos patogênicos que podem estar presentes nos alimentos (RAY, *et al.*, 1992; STILLES, *et al.*, 1991).

O exemplo clássico de um agente inibitório natural produzido comercialmente é a nisina. É produzida por bactérias ácido-láticas, especificamente por *Lactococcus lactis* (GROSS, *et al.*, 1971). Devido a este tipo de bacteriocina estar naturalmente associada com determinados tipos de alimentos e não produzir nenhum efeito adverso quando ingerido, a agência norte-americana, *Food and Drugs Administration (FDA)*, considerou-a como uma substância *GRAS (Generally Regarded as Safe)* (FEDERAL REGISTER, 1998).

Já são conhecidas muitas espécies de bactérias ácido-láticas que são produtoras de bacteriocinas e apresentam potencial para aumentar o tempo de vida útil de alimentos. Estas bacteriocinas normalmente apresentam um amplo

espectro de ação contra microrganismos deteriorantes de alimentos. As bactérias ácido-lácticas podem ser utilizadas na indústria alimentícia como aditivos e bioconservantes, ao invés de algum aditivo químico, como conservantes, cuja função pode ser desempenhada por bacteriocinas. Esta permuta de compostos químicos sintéticos por bacteriocinas (compostos de origem biológica) apresenta a vantagem em termos tecnológicos da produção de alimentos, pois a etapa que envolve o tratamento térmico pode ser readequada. Neste caso a intensidade de calor seria reduzida, pois o excesso do mesmo pode originar a formação de compostos tóxicos ou reações químicas cruzadas (como, por exemplo, a Reação de Maillard). A síntese de compostos tóxicos pode acarretar neoplasias a longo prazo, e em relação às reações químicas, estas podem alterar as características organolépticas, prejudicando, portanto, a venda destes produtos no mercado.

A forma como pode ser inoculada a bactéria depende do tipo de alimento, pode haver a incorporação da cultura bacteriana, da própria bacteriocina de forma direta, da bacteriocina encapsulada, ou incorporação da bacteriocina na embalagem do produto. A desvantagem do uso de bacteriocinas como bioconservantes é que estas são geralmente mais sensíveis às variações ambientais, como alterações de pH, temperatura, composição química do alimento, bem como a microbiota normal do produto, que podem inativar ou diminuir a atividade antimicrobiana das mesmas, se comparadas aos conservantes químicos, bem como a necessidade de maiores estudos toxicológicos sobre o seu respectivo uso em alimentos (SCHILLINGER, *et al.*, 1996; MING, *et al.*, 1997; UECKERT, *et al.*, 1998; SIRAGUSA, *et al.*, 1999;

TYÖPPÖNEN, *et al.*, 2003; WOGAN, *et al.*, 2004; MAURIELLO, *et al.*, 2005; SILVÁN, *et al.*, 2006; GÁLVEZ *et al.*, 2007; NAGHMOUCHI, *et al.*, 2007).

3.6. Características e Classificação das Bacteriocinas

Segundo INGRAM (1969, 1970), foi relatado inicialmente que a síntese da nisina por cepas de *L. lactis* diferiu daquela de antibióticos bacterianos peptídicos previamente estudados, pois estes últimos não são sintetizados, caso esteja presente qualquer tipo de inibidor, que possa interferir em qualquer estágio da síntese protéica, portanto, a inibição da síntese de peptídeos antibióticos, se dá de uma forma muito mais fácil do que a inibição da síntese de nisina. A razão para esta diferença é que ao contrário de peptídeos antimicrobianos tais como a bacitracina e a gramicidina, que são sintetizados seqüencialmente por uma série de reações em complexos multienzimáticos, a nisina é sintetizada ribossomalmente como um precursor peptídeo (prepeptídeo) (HURST, 1981).

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 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 pelas bactérias lácticas.

IIa) Bacteriocinas semelhante 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 ativados 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.

3.7. Mecanismo e Espectro de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos

Apesar das diferenças, os modos de ação dos diversos peptídeos antimicrobianos envolvem, em geral, associação com os lipídios de membrana plasmática microbiana provocando 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 à interação com peptídeos antimicrobianos foram revistos pelos autores SCHREIER *et al.*, (2000); LADOKHIN & WHITE, (2001); LOHNER, (2001); ZASLOFF (2002). Estes mecanismos podem ser resumidos em três modelos:

1- Formação de poros organizados compostos por múltiplas unidades de peptídeo organizadas em 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 físicos químicos. O acúmulo de moléculas de peptídeos (muitas vezes envolvendo a formação de agregados) ocasiona flutuações e instabilidades estruturais locais na bicamada lipídica que resultam na formação de poros transientes.

Existem duas hipóteses para explicar como a permeabilização da membrana afeta a viabilidade dos micróbios. Uma baseia-se na perda de energia provocada pelo desequilíbrio e conseqüente destruição do potencial eletroquímico devido à formação de poros. A outra hipótese seria de que o peptídeo, após

danificar a membrana, pode atravessá-la e interferir com 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 micróbios. 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).

3.8. Purificação

Um dos esquemas mais bem sucedidos para a purificação de bacteriocinas tipo-lantionina tem a vantagem de relacionar a natureza catiônica e a hidrofobicidade destas moléculas e foi planejado inicialmente por SAHL e por BRANDIS (1981) para a purificação do Pep5 (lantibiótico produzido por cepas de *Staphylococcus epidermidis*). O método, que envolve etapas seqüenciais de adsorção, de cromatografia de troca-iônica e de cromatografia em gel-filtração, com modificações incluindo cromatografia de fase reversa e líquida de alta pressão (HPLC), foi usado subseqüentemente para purificar uma variedade de lantibióticos incluindo subtilina (SCHÜLLER, *et al.*, 1989), a SA-FF22 (JACK, *et al.*, 1992, 1994) e a salivaricina A (ROSS, *et al.*, 1993).

Um grande número de bacteriocinas não-lantioninas são purificadas de acordo com os métodos que consistiam no crescimento de cepas produtoras em um meio nutriente apropriado (preferivelmente líquido) sob condições ótimas para a produção de bacteriocina, formando um precipitado de células bacterianas e um sobrenadante (após centrifugação), contendo as proteínas de interesse. Após este processo, ocorre a precipitação das proteínas do sobrenadante por meio da adição de sulfato de amônio. As proteínas precipitadas são dissolvidas subseqüentemente em água deionizada ou em um tampão de baixa força iônica, e as moléculas de bacteriocina são separadas pelo uso de vários procedimentos incluindo cromatografia de interação hidrofóbica, de troca-iônica, e de gel-filtração (BERRIDGE, *et al.*, 1952; BHUNIA, *et al.*, 1988, 1991; HASTINGS, *et al.*, 1991; HECHARD, *et al.*, 1992; HENDERSON, *et al.*, 1992; HOLCK, *et al.*, 1992; HOLO,

et al., 1991; MURIANA, *et al.*, 1991; TAHARA, *et al.*, 1992; TICHACZEK, *et al.*, 1993; VAN BELKUM, *et al.*, 1991; VENEMA, *et al.*, 1993).

3.9. Bacteriocinas Produzidas pelo Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é reconhecido por apresentar muitas espécies que produzem peptídeos com ação bactericida e fungicida. Estes são classificados como metabólitos secundários, sendo secretadas para o meio extracelular, onde exercem a ação antimicrobiana (ZHENG, *et al.*, 1999; KATZ & DEMAINE, 1977; KENNEY e MORAN, 1991).

B. subtilis tem sido alvo de estudos bioquímicos durante várias décadas, e é considerado como um marco na pesquisa de bactérias produtoras de peptídeos antibacterianos que apresentam um amplo espectro de atividade (SONENSHEIN, *et al.*, 2003; MOSZER, *et al.*, 2002).

Algumas espécies de *Bacillus* têm uma história de produção de substâncias utilizadas na indústria alimentícia devido a sua inocuidade, inclusive como aditivos alimentícios (DE BÔER & DIDERICHSEN, 1991; PEDERSEN, *et al.*, 2002). Este gênero apresenta uma grande variedade de espécies que produzem bacteriocinas ou substâncias do tipo-bacteriocinas ("bacteriocin-like substance, BLS"), que apresentam atividade antimicrobiana contra microrganismos deteriorantes e patogênicos, tais como, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Erwinia carotovora* (CLADERA-OLIVEIRA, *et al.*, 2006; NAGHMOUCHI, *et al.*, 2007). Estes incluem *B. subtilis* (ZHENG, *et al.*, 1999), *B.*

thuringiensis (KAMOUN, *et al.*, 2005), *B. amyloliquefaciens* (LISBOA, *et al.*, 2006) e *B. cereus* (BIZANI & BRANDELLI, 2002).

3.10. Bacteriocinas Produzidas por *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis P40, foi isolado do peixe *Leporinus* sp., de origem nativa da bacia amazônica, esta bactéria produz uma bacteriocina que pode ser usada como um bioconservante, no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos, entre os quais pode-se destacar, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (CLADERA-OLIVEIRA, *et al.*, 2004). Esta bacteriocina também apresenta eficiência no combate ao desenvolvimento da putrefação em batatas, que é uma fitopatogenia causada por *Erwinia carotovora* (CLADERA-OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

B. licheniformis ZJU12 foi isolado de solo e apresentou capacidade de produção de peptídeos antimicrobianos com amplo espectro de atividade frente a bactérias gram-positivas e espécies patogênicas de fungos, com exceção de bactérias gram-negativas (MARTIRANI, *et al.*, 2002).

Alimentos derivados de leite também apresentaram colônias de *B. licheniformis*, inclusive sendo a sua bacteriocina purificada e testada frente a outras bactérias deteriorantes (HE, *et al.*, 2006).

Outras cepas de *B. licheniformis* BAS50 e *B. licheniformis* T6-5, foram isoladas de poços de petróleo, onde o crescimento destas cepas só foi possível devido à produção de substâncias surfactantes que apresentam a propriedade de

produzir mudanças na tensão superficial do seu meio ambiente (YAKIMOV, *et al.*, 1995; KORENBLUM, *et al.*, 2005). Também existe relato do isolamento de *B. licheniformis* do líquido do rúmen de búfalos, apresentando atividade antimicrobiana contra *Streptococcus bovis* e *Eubacterium ruminantium*, (PATTNAIK, *et al.*, 2001;).

3.11. Toxicidade de Peptídeos Produzidos por *Bacillus licheniformis*

Atualmente, a atividade antimicrobiana das bacteriocinas informada na literatura ilustrando a capacidade toxigênica não apresenta análises e comparações relacionadas, porque existe uma grande discrepância de metodologias utilizadas na verificação da mesma; embora, nos últimos anos existam estudos tentando comparar a relação atividade antimicrobiana versus toxicidade por várias espécies de bactérias (EIJNSINK, *et al.*, 1998; GUYONNET, *et al.*, 2000).

B. licheniformis já foi relacionado na literatura associado a quadros patológicos, como gastroenterites, septicemia, peritonite, e à deterioração de alimentos (FRANK, 1997; TURNBULL & KRAMER, 1995).

B. licheniformis produziu toxinas que causaram inibição da motilidade de espermatozóides, apresentando um limiar tóxico superior ao do *B. cereus*. A toxicidade neste tipo de células, pelas toxinas produzidas pelo *B. licheniformis* causou a reação de acrossomo, o que sugere a influência no sistema de sinalização celular, bem como a presença de *B. licheniformis* também foi

determinada em leite de vacas com mastite e foi verificada nestas amostras a presença de toxinas que apresentaram atividade espermicida (SALKINOJA-SALONEN, *et al.*, 1999; MIKKOLA, *et al.*, 2000; NIEMINEN, *et al.*, 2007).

Existem relatos na literatura que *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. cereus* produzem toxinas com propriedades hemolíticas e citotóxicas, causando distúrbios do trato gastrintestinal (DAMGAARD, 1995; BUDARINA, *et al.*, 1994). Em relação ao *B. licheniformis*, não foram encontrados estudos relacionados com a produção de compostos com características hemolíticas e ou com propriedades de hemaglutinação.

3.12. Nanovesículas

Nanovesículas formadas por fosfolipídeos podem ser caracterizadas como estruturas colidais que apresentam um ambiente interno hidrofílico (afinidade por fase aquosa) ou hidrofóbico (aversão à fase aquosa) e um ambiente externo que interagem com a fase lipofílica ou lipofóbico, respectivamente. Desta forma, existe a necessidade de confeccionar esta micela com compostos que apresentam características anfifílicas, exemplificando a fosfatidilcolina como a mais utilizada (POLOZOVA, *et al.*, 1999).

A formação da nanovesícula depende de qual o meio está submetida, sendo assim, ela pode ser formada em fase oleosa e depois em meio aquoso, apresentar uma inversão de polaridade dos seus respectivos constituintes (MERTINS, *et al.*, 2005).

Esta ferramenta biotecnológica tem sido muito estudada nas últimas décadas, pois proporciona uma nova forma de administração de fármacos, com liberação prolongada e gradativa, dessa forma, a indústria farmacêutica, a cada ano que se sucede, investe mais recursos financeiros (ALLEMANN, *et al.*, 1998; CEVC, 2004; SEKI, *et al.*, 2004).

A semelhança dos constituintes das membranas celulares com as substâncias utilizadas na confecção dos lipossomos facilita a sua utilização *in vivo* (IMURA, *et al.*, 2003).

Estruturas com arranjos baseados na combinação de compostos anfifílicos dispostos na forma de blocos, também estão sendo pesquisados para verificar a melhora do perfil de liberação, pois este tipo de conformação tende a se aproximar das características químicas do local onde será utilizada a nanovesícula. Esta formação, portanto, poderá facilitar a incorporação de fármacos, enzimas, nucleotídeos, radioisótopos ou meios de contraste nas nanoestruturas (KWON, 1998; NARDIN, *et al.*, 2000; BROZ, *et al.*, 2006).

4. CAPÍTULO I

NANOVESÍCULAS DE FOSFOLIPÍDEOS CONTENDO SUBSTÂNCIA DO TIPO BACTERIOCINA PARA CONTROLE DE *Listeria monocytogenes*

Nesse capítulo será discutida a fabricação de nanovesículas de fosfolipídeos contendo bacteriocina produzida pelo *B. licheniformis*. O estudo contempla a comparação entre a estabilidade da bacteriocina livre e contida na nanovesícula, bem como o tipo de mecanismo de atividade antimicrobiana.

**Artigo publicado no periódico Innovative Food Science and Emerging
Technologies ((disponível on line: doi:10.1016/j.ifset.2007.05.001))**



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Innovative Food Science and Emerging Technologies xx (2007) xxx–xxx

**Innovative
Food Science
&
Emerging
Technologies**
www.elsevier.com/locate/ifsset

Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*

Mário L. Teixeira^a, Juliana dos Santos^a, Nádyá P. Silveira^b, Adriano Brandelli^{a,*}

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

^b Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

Received 18 January 2007; accepted 11 May 2007

Abstract

Bacillus licheniformis strain P40 produces a bacteriocin-like substance (BLS) that has potential to be used as a natural biopreservative for control of pathogenic and food microorganisms. The objective of this study was the encapsulation of BLS in phosphatidylcholine vesicles, evaluating its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. The size of the nanovesicles with the BLS was around 570 nm and of the nanovesicles without BLS was of approximately 484.8 nm, as determined by light scattering with a He–Ne laser ($\lambda=632.8$ nm) as light source. The encapsulated BLS showed inhibitory activity against *L. monocytogenes* as observed by agar diffusion assay. Complete inhibition of *L. monocytogenes* growth was observed with the addition of 100 and 50 AU mL⁻¹ of encapsulated and free BLS, respectively. A reduction in the number of viable cells to zero was observed after 10 min incubation with 400 AU mL⁻¹ of either encapsulated or free BLS. The encapsulated BLS was stable for up to 30 days at 4 °C. These results indicate that nanovesicles containing BLS may have potential for use as food preservative. © 2007 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Bacteriocin; Nanovesicles; Encapsulation; *B. licheniformis*; *L. monocytogenes*

Industrial relevance: The increased concern on minimally processed food and natural additives has been stimulated many studies on the utilization of antimicrobial peptides as biopreservatives. The incorporation of bacteriocins into nanovesicles may represent an interesting alternative for controlled release and increased stability of bacteriocins.

1. Introduction

Nanovesicles represent promising systems for drug delivery and storage. These systems have acquired increasing attention as a tool to target drugs to its site of action or to optimize drug circulation *in vivo*, allowing reduction of side effects as well as making treatments easier. In the same way, nanovesicles can be used to protect a series of chemical compounds, being more commonly used for drugs. They can be also used to encapsulate molecules of larger sizes, like the polymer chitosan (Anderson, Burdick, & Langer, 2004; Drummond et al., 2005; Hashida, Kawakami, & Yamashita, 2005; Pavelic, Skalko-Basnet, Filipovic-Grcic, Martinac, & Jalsenjak, 2005). Recently, a

number of potential applications of nanoparticles in food and related industries have been described (Sanguansri & Augustin, 2006).

Bacteriocins are proteinaceous compounds produced by bacteria, often presenting a bactericidal effect against closely related species (Riley & Wertz, 2002). Lactic acid bacteria have been largely studied with the perspective of food protection against pathogenic and spoilage microorganisms (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001; O'Sullivan, Ross, & Hill, 2002). Also, bacteriocins are produced by several other classes of bacteria (Riley & Wertz, 2002).

Some species of *Bacillus* have a history of safe use in the industry, including the production of food additives (de Boer & Diderichsen, 1991; Pedersen, Bjornvad, Rasmussen, & Petersen, 2002). This genus presents a great variety of species that produce bacteriocins or bacteriocin-like substances (BLS),

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

which display antimicrobial activity against food-borne pathogenic microorganism. These include *B. subtilis* (Zheng, Yan, Vederas, & Suber, 1999), *B. thuringiensis* (Kamoun et al., 2005), *B. amyloliquefaciens* (Lisboa, Bonato, Bizani, Henriques, & Brandelli, 2006) and *B. cereus* (Bizani & Brandelli, 2002).

B. licheniformis P40, isolated from the Amazon basin fish *Leporinus* sp., produces a BLS that may be used as a biopreservative for control of pathogenic and spoilage microorganisms such as *L. monocytogenes* and *Bacillus cereus* (Cladera-Olivera, Caron, & Brandelli, 2004). This BLS was effective to combat soft rot development caused by *Erwinia carotovora* in potatoes (Cladera-Olivera, Caron, Motta, Souto, & Brandelli, 2006). The aim of this work was to develop phosphatidylcholine (PC) nanovesicles containing the BLS produced by *B. licheniformis* P40 and to characterize its antimicrobial activity against *L. monocytogenes*.

2. Materials and methods

2.1. Production of antimicrobial substance

B. licheniformis strain P40 was grown in Trypticase Soy Broth (TSB) medium (Acumedia Manufacturers, Lansing, MI, USA) at 30 °C in a rotary shaker at 125 cycles min⁻¹ for 48 h. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 ×g for 15 min at 4 °C. Ammonium sulfate was added to the supernatant to achieve 20% (w/v) saturation and the mixture was kept at 4 °C for 18 h. After centrifugation at 10,000 ×g for 15 min at 4 °C, the pellet was suspended in 10 mM phosphate buffer pH 6.0 and immediately submitted to a gel filtration chromatography using a Sephadex G-100 matrix (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The column was eluted with 10 mM phosphate buffer pH 6.0 as the mobile phase. Fractions of 1 mL were collected. Fractions presenting antimicrobial activity were pooled and sterilized through a 0.45 μm filter membrane. This fraction was used for encapsulation in phospholipid nanovesicles.

2.2. Production of nanovesicles

The nanovesicles were prepared by the reverse phase evaporation method as follows (Mertins, Cardoso, Pohlmann, & Silveira, 2006): 60 mg of phosphatidylcholine (95%; Solae, Esteio, Brazil) were dissolved in 10 mL of ethyl acetate and 200 μL of MilliQ water were dropped into the solution to form a water in oil (W/O) emulsion, which was sonicated at 400 Hz for 2–3 min at 30 °C, using a USC 700 ultrasonic processor (Unique, São Paulo, Brazil). This procedure yielded a homogeneous opalescent dispersion of reverse micelles. The organic solvent was taken out using a rotatory evaporator (Fisatom, São Paulo, Brazil) at 30–35 °C under vacuum, resulting in a high viscous organogel. The organogel was reverted to nanovesicles with the addition of 5 mL of MilliQ water under shaking. Samples were filtered through 0.45 μm pore membranes and placed into dust free cells for light scattering measurements. The nanovesicles containing bacteriocin (NCB) were prepared by the same procedure, adding 50, 100 or 200 μL of the BLS solution (0.98 mg protein mL⁻¹) plus MilliQ water to a final

volume of 200 μL. The concentration of BLS entrapped in the nanovesicles was determined using the Folin-phenol reagent method (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951), using a calibration curve developed with bovine serum albumin as protein standard.

2.3. Light scattering

Light scattering was performed on a Brookhaven BI-200M goniometer, BI-9000AT digital correlator (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, USA) with a He–Ne laser (λ=632.8 nm) as light source. An interference filter was used before detecting the signal on the photomultiplier. The sample cell was placed in the index-matching liquid decahydronaphthalene (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

The apparent values of hydrodynamic radius R_h (related to the diffusional dynamics of a vesicle) were obtained in this work by Dynamic Light Scattering (DLS) at 90°. The time correlation functions were measured in the multi-τ mode using 224 channels and data treatment was made by means of the Provencher Software CONTIN as described elsewhere (Mertins et al., 2006). The R_h determination was made by means of the Stokes–Einstein relation using the diffusion coefficient D_{app} determined by Eq. (1):

$$D_{app} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_h} \quad (1)$$

where k_B the Boltzmann constant, η_0 the viscosity of the solvent, T the absolute temperature and R_h the hydrodynamic radius.

2.4. Antimicrobial activity assay

The antimicrobial activity was detected by agar diffusion assay. An aliquot of 10 μL of the purified free BLS, NCB and nanovesicles free of bacteriocin were applied on agar plates previously inoculated with a swab submerged in indicator strain (*L. monocytogenes* ATCC 7644) suspension, which corresponded to a 0.5 McFarland turbidity standard solution, (approximately 10⁷ CFU mL⁻¹). Plates were incubated at 37 °C for 24 h. The reciprocal value of the highest dilution that produced an inhibition zone was taken as the activity unit (AU) per mL (Motta & Brandelli, 2002).

To verify the antimicrobial activity of the NCB, an aliquot of 10 μL was applied in the plate previously inoculated with *L. monocytogenes*. The NCB were also submitted to heating for 100 °C for 3 min before being tested for antimicrobial activity. The purified free BLS was used as positive control, and nanovesicles free of bacteriocin as negative control.

2.5. Mode of action on *L. monocytogenes* ATCC 7644

Sterile 96-well microplates (Corning, NY, USA) were filled with 0.1 mL of serial dilutions of the NCB (between 6.25 and 400 AU mL⁻¹). The NCB were diluted in 10 mM phosphate buffer pH 6.0 from a 3200 AU mL⁻¹ stock solution. A

standardized number of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (0.1 mL of a 10^7 CFU mL⁻¹ suspension in TSB broth) were inoculated in each well. A growth well (buffer plus inoculum) and a sterile control (broth only) were included in each panel. Microplates were incubated at 37 °C for 120 min, and then viable cell counts, expressed as CFU mL⁻¹, were determined as described elsewhere (Motta & Brandelli, 2002). The purified free BLS was used as positive control, and nanovesicles free of bacteriocin as negative control. The experiment was done in triplicate.

Kinetics of the NCB on *L. monocytogenes* was accomplished by the following procedure: a cell suspension of 10^7 CFU mL⁻¹ *L. monocytogenes* was incubated at 37 °C with 400 AU mL⁻¹ for up to 120 min. A control without bacteriocin addition adequately was done. The purified free BLS was used as positive control, and nanovesicles free of bacteriocin as negative control. The experiments were carried out in triplicate.

2.6. Hemolysis and hemagglutination

The hemolytic and hemagglutination properties of the bacteriocin were verified using human erythrocytes, essentially as described elsewhere (Bizani & Brandelli, 2001). Hemolysis was observed by visual inspection of blood agar plates. An isolate of *Staphylococcus aureus* with known hemolytic activity was used as a positive control. For hemagglutination tests, 50 mL of the BLS was mixed with the same volume of a 6% (v/v) washed erythrocyte suspension on a white porcelain tile. The negative control consisted of erythrocytes suspension in PBS. The reactions were visualized using a bright-field microscope, and considered positive if agglutination occurred within 15 min of incubation.

3. Results

3.1. Characterization of the bacteriocin-containing vesicles

The protein content of vesicles was measured to determine the total amount of BLS entrapped. Encapsulation of BLS in

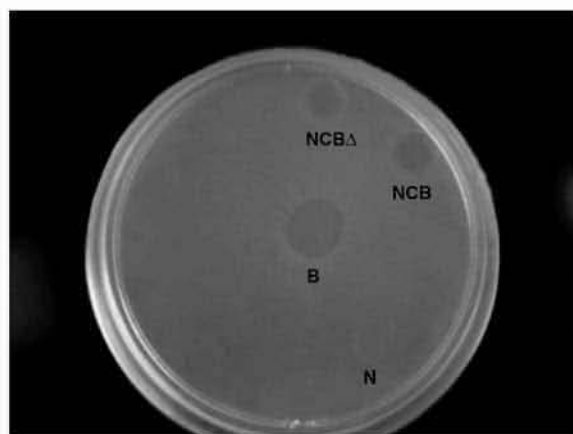


Fig. 1. Inhibitory zones of the nanovesicles containing bacteriocin. (B) Free bacteriocin; (N) nanovesicle alone; (NCB) nanovesicles-containing bacteriocin; (NCBΔ) heat-treated nanovesicle containing bacteriocin. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and the diameter of inhibition zones were measured.

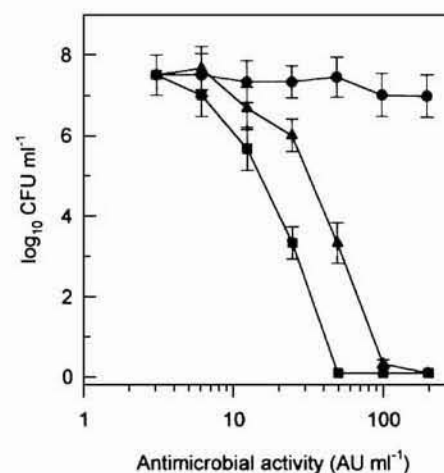


Fig. 2. Antimicrobial activity of nanovesicles containing bacteriocin (NCB) on *Listeria monocytogenes*. (●) nanovesicle alone, (■) free bacteriocin, (▲) NCB. Samples were incubated at 37 °C for 120 min, and then viable cell counts were determined. Each point represents the mean of three independent experiments.

phosphatidylcholine vesicles yielded protein concentrations of 0.07, 0.12 and 0.21 mg mL⁻¹ for protocols developed with 50, 100 and 200 μL of BLS solution, respectively.

The diameter of the vesicles prepared in the presence of bacteriocin (the encapsulated bacteriocin) was determined as 570 nm (range of vesicle diameter from 558 to 582 nm), whereas the vesicles without bacteriocin presented a diameter of 484.8 nm (from 467 to 501 nm). These results suggest that the phosphatidylcholine stabilizes the bacteriocin in the suspension, due to formation of a multilamellar structure, with base in the size difference between both systems (around 100 nm).

3.2. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the NCB was evaluated through the formation of inhibitory zones in agar plates inoculated with

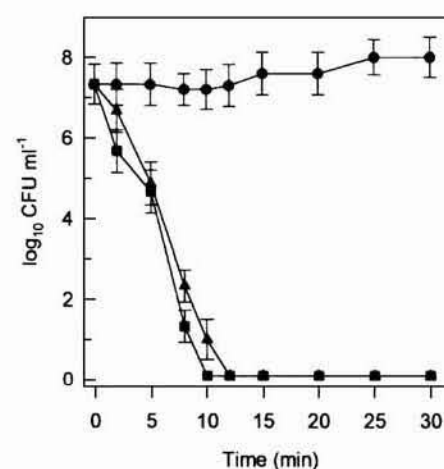


Fig. 3. Effect of nanovesicles containing bacteriocin (NCB) on *Listeria monocytogenes* growth. (●) nanovesicle alone, (■) free bacteriocin, (▲) NCB. Samples were incubated at 37 °C with 400 AU mL⁻¹ for the indicated times. Each point represents the mean of three independent experiments.

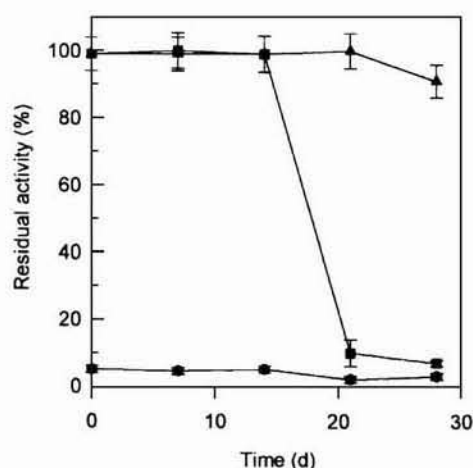


Fig. 4. Residual activity of nanovesicles containing bacteriocin (NCB) on *Listeria monocytogenes* growth. (●) nanovesicle alone, (■) free bacteriocin, (▲) NCB. Samples were kept at 4 °C for the indicated times and then residual antimicrobial activity was determined. Each point represents the mean of three independent experiments.

L. monocytogenes. Three different preparations of NCB and BLS were tested. The control of free bacteriocin resulted in an inhibitory zone of 21 ± 1 mm, while the inhibitory zones of the encapsulated bacteriocin and heat-treated encapsulated bacteriocin were 10 ± 2 mm (Fig. 1).

When *L. monocytogenes* cells were incubated with different concentrations of NCB, a dose response curve was obtained (Fig. 2). The number of viable cells decreased to zero in the presence of 100 AU mL^{-1} and 50 AU mL^{-1} of NCB and free BLS, respectively. Inhibitory effect was not observed at 6.25 AU mL^{-1} or lower dose. The values of IC_{50} (the concentration needed to reach half-maximum effect) for NCB and BLS were 40 and 20 AU mL^{-1} , respectively. Free and encapsulated bacteriocin were also tested at concentrations higher than 200 AU mL^{-1} (from 400 to 3200 AU mL^{-1}), and the resulting viable counts were always zero (not shown).

Kinetics of the NCB and BLS effect on growth of *L. monocytogenes* was investigated. The addition of NCB (400 AU mL^{-1}) to a cell suspension of *L. monocytogenes* resulted in a decrease in viable counts of 2 log cycles within 5 min of incubation (Fig. 3). A complete cell death was observed after 12 min of incubation. This kinetics was almost identical to that observed with 400 AU mL^{-1} of free BLS (Fig. 3).

The residual activity of the BLS and NCB were evaluated during storage at refrigeration temperature. The activity of free BLS was maintained for up to 14 days at 4 °C, after that nearly 90% of initial activity was lost within the next 7 days (Fig. 4). In contrast, the bacteriocin activity remained nearly constant for at least 30 days when incorporated into PC nanovesicles (Fig. 4).

3.3. Hemolytic and hemagglutination activities

The hemolytic and hemagglutination activities of BLS were assayed against human erythrocytes and negative reactions were observed with all preparations of BLS tested (not shown).

4. Discussion

The BLS P40 showed resistance against several organic solvents, maintaining, like this, antimicrobial activity, and tends to form large aggregates in aqueous solution (Cladera-Olivera et al., 2004). This substance also possesses foaming capacity, which suggests that it could also acts as a biosurfactant. These characteristics may facilitate the use of this compound in phospholipid nanovesicles, because it interacts with the PC, used in the process of encapsulating the BLS. The capacity to foam may indicate the presence of non-polar amino acid residues located at the surface of this peptide. Therefore, this structural feature could facilitate the PC covering, explaining the increased measured diameter by laser (diameter of NCB in relation to the nanovesicles free of bacteriocin). Dipalmitoyl and egg lecithins monolayers do not carry surface charge in a pH range of 4–8 (Hsieh, Chen, Wang, Chang, & Chang, 2002). Since PC show the properties of uncharged monolayers at pH 6.0 (the buffer solution pH), electrostatic interactions with BLS can be excluded. Thus the insertion of BLS in PC nanovesicles may be due to hydrophobic interactions and association with PC structures. The highest concentration of nisin was incorporated in PC liposomes in comparison with those also containing phosphatidylglycerol and/or cholesterol (Laridi et al., 2003; Were, Bruce, Davidson, & Weiss, 2003).

BLS maintains its inhibitory effect against *L. monocytogenes* after encapsulation in nanovesicles. Although the free BLS produces inhibitory zones larger than those observed for NCB, this fact may be associated to the controlled release of the bacteriocin from the vesicle and/or slower diffusion on semi-solid agar medium. In agreement with this result, a higher dose of NCB was required to kill all *L. monocytogenes* cells in comparison with free BLS. In addition, the test was accomplished after heating, which may destabilize the nanovesicles, allowing the release of the bacteriocin. As the bacteriocin activity is resistant to the applied thermal treatment (Cladera-Olivera et al., 2004), this provide an additional evidence that the antimicrobial activity of NCB was due to the bacteriocin.

The decrease in the number of viable cells of *L. monocytogenes* observed over a period of 10 min after the addition of free or encapsulated BLS suggests that it has a bactericidal activity. The quickly bacterial death suggests that the BLS targets to the cell wall or to the cytoplasmic membrane. Previous characterization of this BLS indicate its hydrophobic nature (Cladera-Olivera et al., 2004), reinforcing the possible mechanism of action by disrupting the membrane function of target microorganisms. In addition, free BLS showed a similar effect on the gram-negative bacterium *E. carotovora*, causing complete cell death within 20 min (Cladera-Olivera et al., 2006). The intrinsic characteristic of inhibiting *L. monocytogenes*, a pathogenic microorganism responsible for a great number of acquired infections related to food ingestion (Kiss, Tirczka, Szita, Bernáth, & Csikó, 2006), demonstrates the potential industrial use of BLS. Indeed, the bacteriocin nisin has been encapsulated in liposomes to improve its efficacy against *L. monocytogenes* (Laridi et al., 2003; Were et al., 2003). However, increased tolerance and resistance of *L. monocytogenes* to conventional

bacteriocins, such as nisin and pediocin, has been reported (Rasch & Knochel, 1998; Martínez & Rodríguez, 2005). Therefore, the research for new substances showing antilisterial activity, remain an important issue to develop new process to conserve foods.

Increased shelf-life of food products can be achieved by the use of bacteriocins like nisin and pediocin (Deegan, Cotter, Hill, & Ross, 2006f). However, large variations in the degree of inhibition have been observed and the antimicrobial efficiency may be restricted by undesirable interaction of free bacteriocin with food components (Aasen et al., 2003). In this study, the encapsulated BLS remained with approximately 90% its initial activity for 30 days, demonstrating a considerable improvement when compared with 14 days for the free BLS. This represents a very important characteristic for food utilization, since it may correspond to a significant improvement in shelf-life.

The lack of toxicity to eukaryotic cells is a desirable property for antimicrobials for food use. In fact, some bacteriocins produced by food-isolated bacteria have been associated with molecules such as hemolysins (Boucabeille, Mengin-Lecreux, Henkes, Simonet, & van Heijenoort, 1997). However, hemolytic and hemagglutination activities were not associated to this BLS, indicating the absence of harmful effect to human erythrocytes.

Our results indicate this antimicrobial peptide may have a true potential for use as food preservative, because it was easily incorporated in PC nanovesicles through a relatively inexpensive process. The advantage of this technology is based on the possibility to have a controlled release of the antimicrobial substance, enough for inhibiting the pathogenic strains, and therefore, avoiding the addition of great amounts of preservatives to obtain a desirable effect.

Acknowledgements

This work was supported by 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.
- Anderson, D. G., Burdick, J. A., & Langer, R. (2004). Materials science. Smart biomaterials. *Science*, *305*, 1923–1924.
- Bizani, D., & Brandelli, A. (2001). Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Brazilian Journal of Microbiology*, *32*, 334–339.
- 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.
- Boucabeille, C., Mengin-Lecreux, D., Henkes, G., Simonet, J. M., & van Heijenoort, J. (1997). Antibacterial and hemolytic activities of lincosin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens*. *FEMS Microbiology Letters*, *153*, 295–301.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., & Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, *38*, 251–256.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., Motta, A. S., Souto, A. A., & Brandelli, A. (2006). Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot development caused by *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology*, *52*, 533–539.
- 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 Boer, A. S., & Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *40*, 595–598.
- 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.
- Drummond, D. C., Marx, C., Guo, Z. H., Scott, G., Noble, C., Wang, D. H., et al. (2005). Enhanced pharmacodynamic and antitumor properties of a histone deacetylase inhibitor encapsulated in liposomes or ErbB2-targeted immunoliposomes. *Clinical Cancer Research*, *11*, 3392–3401.
- Hashida, M., Kawakami, S., & Yamashita, F. (2005). Lipid carrier systems for targeted drug and gene delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *53*, 871–880.
- Hsieh, Y. F., Chen, T. L., Wang, Y. T., Chang, J. H., & Chang, H. M. (2002). Properties of liposomes prepared with various lipids. *Journal of Food Science*, *67*, 2808–2812.
- Kamoun, F., Mejdoub, H., Auissaioui, H., Reinbolt, J., Hammani, A., & Jaoua, S. (2005). Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, *98*, 881–888.
- Kiss, R., Tirczka, T., Szita, G., Bernáth, S., & Csikó, G. (2006). *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. *International Journal of Food Microbiology*, *112*, 71–74.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuilleumard, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*, 325–333.
- Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A. P., & Brandelli, A. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic Forest. *International Microbiology*, *9*, 111–118.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 267–275.
- Martínez, B., & Rodríguez, A. (2005). Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiology Letters*, *252*, 67–72.
- Mertins, O., Cardoso, M. B., Pohlmann, A. R., & Silveira, N. P. (2006). Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *6*, 1–7.
- 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.
- Pavelic, Z., Skalko-Basnet, N., Filipovic-Grcic, J., Martinac, A., & Jalsenjak, I. (2005). Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *Journal of Controlled Release*, *106*, 34–43.
- Pedersen, P. B., Bjornvad, M. E., Rasmussen, M. D., & Petersen, J. N. (2002). Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *36*, 155–161.
- Rasch, M., & Knochel, S. (1998). Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin. *Letters in Applied Microbiology*, *27*, 275–278.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annual Reviews of Microbiology*, *56*, 117–137.
- Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development — A food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, *17*, 547–556.
- Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 8073–8079.
- Zheng, G., Yan, L. Z., Vederas, J. C., & Suber, P. (1999). Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *Journal of Bacteriology*, *181*, 7346–7355.

4.1. Conclusões

- O peptídeo antimicrobiano BLS P40 pode ser incorporado em nanovesículas de fosfatidilcolina;
- A incorporação da BLS em uma nanovesícula aumenta a sua estabilidade, ou seja, apresenta por um período maior de tempo a atividade antimicrobiana;
- A BLS apresenta atividade bactericida;
- O processo de incorporação é de fácil execução e de baixo custo, fatores relevantes para utilização industrial.

5. CAPÍTULO II

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM LIPOPEPTÍDEO DE *Bacillus licheniformis* APRESENTANDO ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EMULSIFICANTE

Nesse capítulo serão discutidas as etapas de purificação da bacteriocina produzida pelo *B. licheniformis*. O estudo contempla, ainda, a caracterização química parcial e demonstra a atividade antimicrobiana e emulsificante da mesma.

Artigo a ser submetido ao periódico Microbiological Research

1 Purification and partial chemical characterization of a lipopeptide from
2 *Bacillus licheniformis* showing dual antimicrobial and emulsifying
3 activities

4

5 **Mário Lettieri Teixeira, Florencia Cladera-Olivera, Juliana dos Santos and**
6 **Adriano Brandelli***

7

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

11

12 *Correspondence: ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto
13 Alegre, Brasil; e-mail: abrand@ufrgs.br

14

15

16 **Abstract**

17 *Bacillus licheniformis* strain P40 produces a bacteriocin-like substance (BLS) that
18 inhibits important pathogenic and food spoilage bacteria such as *Listeria*
19 *monocytogenes*, *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus* and *Erwinia carotovora*. The
20 antimicrobial peptide produced by *Bacillus licheniformis* P40 was purified by
21 ammonium sulfate precipitation, gel filtration chromatography on Sephadex G-100
22 and reversed phase chromatography on Source RPC. The purification was about
23 100-fold with a yield of 0.3%. The BLS showed a MW of about 800 Da. The

24 purified BLS was resistant to up to 100°C and pH ranging 3 to 10, but lost its
25 activity when treated with proteases and trichloroacetic acid. Reaction with
26 ninhidrin produced the yellowish color instead the characteristic purple. Data from
27 infrared spectroscopy also indicate the peptide is cyclic, resembling the
28 lipopeptides surfactin and lichenisin. The BLS also showed emulsifying properties
29 with several hydrophobic compounds.

30

31 **1. Introduction**

32 Bacteriocins are proteinaceous compounds produced by bacteria, often
33 presenting a bactericidal effect against closely related species (Riley and Wertz,
34 2002). Bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) have been largely studied with
35 the perspective of food protection against pathogenic and spoilage bacteria
36 (Cleveland *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002). Despite the intensive research on
37 LAB bacteriocins, increasing attention has been addressed to the antimicrobial
38 peptides produced by several other classes of bacteria (Riley and Wertz, 2002).

39 Some species of *Bacillus* have a history of safe use in the industry,
40 including the production of food additives (de Boer and Diderichsen, 1991;
41 Pedersen *et al.*, 2002). This genus presents a great variety of species that
42 produce bacteriocins or bacteriocin-like substances (BLS), which display
43 antimicrobial activity against food-borne pathogenic microorganism. These include
44 *B. subtilis* (Zheng *et al.*, 1999), *B. thuringiensis* (Kamoun *et al.*, 2005), *B.*
45 *amyloliquefaciens* (Lisboa *et al.*, 2006) and *B. cereus* (Bizani and Brandelli, 2002).

46 *B. licheniformis* P40, isolated from the Amazon basin fish *Leporinus* sp.,
47 produces a BLS that may be used as a biopreservative for control of pathogenic

48 and spoilage microorganisms such as *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*
49 (Cladera-Olivera, *et al.*, 2004). This BLS was effective to combat soft rot
50 development caused by *Erwinia carotovora* in potatoes (Cladera-Olivera *et al.*,
51 2006). In this report, the purification and characterization of this BLS is described.

52

53 **2. Materials and Methods**

54 *2.1. Microorganisms*

55 The bacterium *Bacillus licheniformis* P40, previously isolated and
56 characterized (Cladera-Olivera *et al.*, 2004) was used for production of BLS.
57 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 was used as indicator strain. The organisms
58 were stored at -20°C in Trypticase Soy Broth (TSB) medium (Acumedia
59 Manufacturers, Lansing, MI, USA) containing 20% glycerol. The bacteria were
60 propagated twice in fresh TSB medium before use.

61

62 *2.2. Assay of antimicrobial activity*

63 Antimicrobial activity was monitored by disc diffusion assay as described
64 elsewhere (Motta and Brandelli, 2002). Aliquots (20 mL) were applied onto
65 cellulose discs on agar plates previously inoculated with a swab submerged in
66 indicator strain suspension containing about 10^8 CFU mL^{-1} . Plates were incubated
67 at 37°C for 24 h and the clearing zones were measured around the discs. The BLS
68 titre was determined by the serial two-fold dilution method (Mayr-Harting *et al.*,
69 1972).

70 *2.3. Culture conditions and BLS production*

71 *B. licheniformis* P40 was grown in TSB broth for 48 h at 30°C and then
72 culture supernatant was obtained by centrifugation at 10,000 x g for 15 min at 4°C.
73 The supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane (Millipore, Billerica,
74 MA, USA), and the filtrate was considered as crude BLS preparation.

75

76 *2.4. BLS purification*

77 The crude BLS preparation was submitted to ammonium sulfate
78 precipitation at 20% saturation. After centrifugation for 10,000 x g at 4°C for 15
79 min, the pellet was resuspended in 100 mM phosphate buffer pH 6.0 and loaded
80 on a Sephadex G-100 column (GE Healthcare/Pharmacia Biotech, Uppsala,
81 Sweden). The column was eluted with 10 mM phosphate buffer pH 6.0 as mobile
82 phase. Fractions of 1 mL were collected. Fractions presenting antimicrobial activity
83 were pooled and sterilized through a 0.22 µm filter membrane (Millipore, Billerica,
84 MA, USA). These fractions were loaded on a Resource-RPC column (GE
85 Healthcare/Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), eluted with a gradient of 0 to
86 100% (v/v) acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany) containing trifluoroacetic acid
87 (TFA) (Merck, Darmstadt, Germany) 0,1% (v/v). The fractions positive for BLS
88 activity were pooled, and stored at 4°C until used.

89

90 *2.5. Effect of enzymes, temperature, chemicals and pH on antimicrobial activity*

91 The effect of enzymes, temperature and pH on BLS activity was determined
92 as described elsewhere (Bizani and Brandelli, 2002).

93 The resistance to proteolytic enzymes was evaluated by incubation of the
94 purified BLS (pH = 7.0) in presence of protease type XXV (Pronase E) (Sigma, St.

95 Louis, USA), papain (Merck, Darmstadt, Germany), proteinase K (Merck,
96 Darmstadt, Germany) and trypsin (Merck, Darmstadt, Germany) in final
97 concentrations of 2 and 10 mg.mL⁻¹ for 60 min at 37°C.

98 The stability of the purified BLS to different organic solvents was evaluated
99 using aliquots of 200 µL mixed with 100 µL of each organic solvent and being
100 incubated for 2 hours at 37°C. The stability to detergents was determined using
101 Tween 20, Tween 80 and Triton X100 in a final concentration of 10% (v/v) and
102 sodium deoxycholate (final concentration of 1 mg.mL⁻¹). Aliquots of the purified
103 BLS were incubated with the detergents for 60 min at 37°C.

104 It was also evaluated the stability in relationship to treatment with EDTA
105 (final concentration of 10 mM) and trichloroacetic acid (TCA, final concentration of
106 100 mg.mL⁻¹) (Merck, Darmstadt, Germany). In the case of TCA, the purified BLS
107 was previously incubated with the acid for 2 h at 4°C, centrifuged at 10,000 g for 5
108 min and neutralized before testing for antimicrobial activity.

109 After the treatments, residual activity was determined on *Listeria*
110 *monocytogenes* ATCC 7644.

111

112 2.6. Chemical characterization of BLS

113 Determination of free thiol groups was carried out essentially as described
114 elsewhere (Sullivan *et al.*, 1942). To 1 mL sample were added 0.2 mL NH₄OH, 1
115 mL of 0.5 g.L⁻¹ NaCN and 1 mL water. The mixture was incubated for 20 min at
116 25°C and then 0.2 mL of 0.5 g.L⁻¹ sodium nitroprusside was added. Absorbance at
117 530 nm was determined within 2 min. Free amino groups were determined by
118 reaction with ninhidrin (Moore and Stein, 1957) before and after peptide hydrolysis

119 with 6 M HCl at 110°C for 16 h. Samples of the peptide were also analyzed for
120 reaction with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FNBD) (Goodwin, 1968).

121

122 2.7. Spectroscopy

123 The BLS was analyzed by UV-visible, infrared spectroscopy and mass
124 spectrometry. The FTIR spectrum was recorded as KBr pellet in a Mattson FTIR
125 spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). UV-visible
126 spectrum was obtained using a Shimadzu UVX 1600 (Shimadzu, Columbia, MD,
127 USA) double beam spectrophotometer. Mass spectra were recorded on a MALDI-
128 TOF mass spectrometer (Waters-Micromass, UK).

129

130 2.8. Emulsifying activity

131 The capacity of BLS to emulsify several hydrophobic substances was
132 tested. BLS was mixed with 10 mL of kerosene, soybean oil, hexane, toluene and
133 allowed to 24 h at room temperature (Willumsen and Karlson 1997). After this time
134 the emulsifying index was determined by equation (1):

$$E_{24} = \frac{\text{height of the emulsion layer}}{\text{height of the total layer}} \times 100 \quad (1)$$

135

136

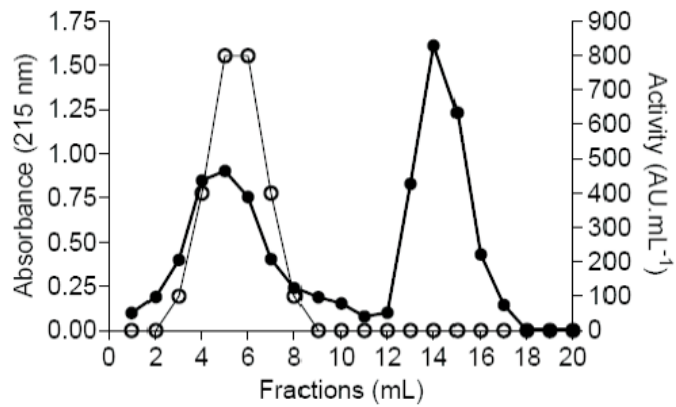
137

138 3. Results

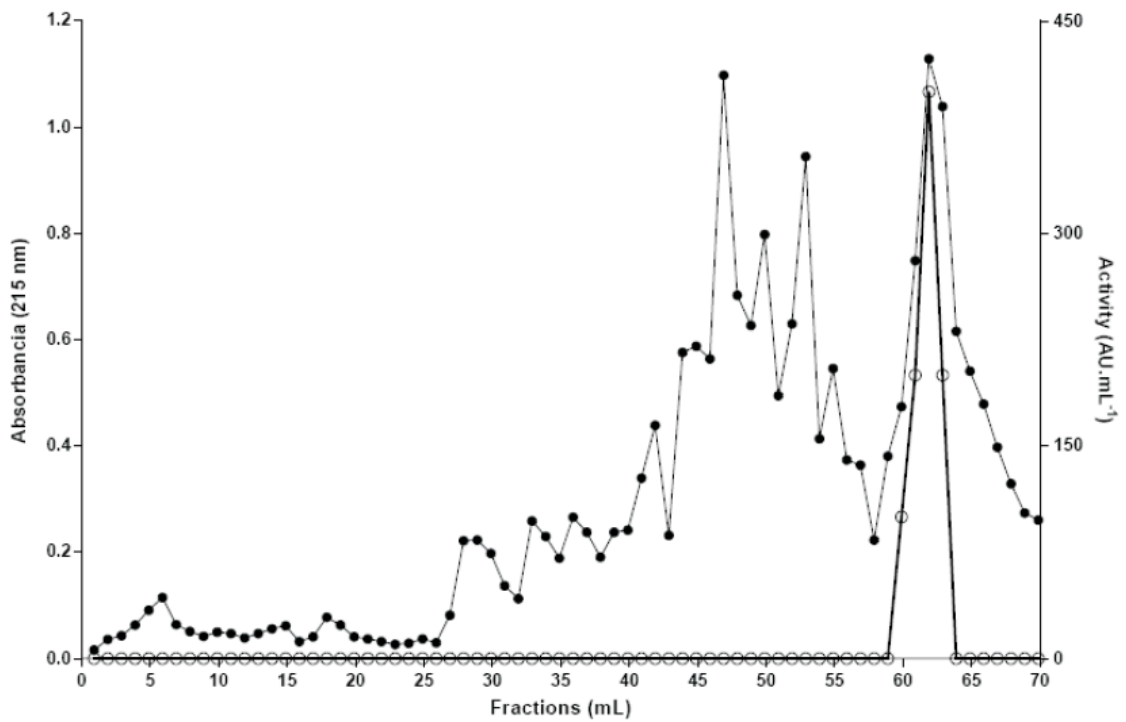
139 BLS was produced by *B. licheniformis* P40 and the antimicrobial substance
140 secreted to the supernatant culture was purified. The results of the purification are
141 summarized in Table 1. The protocol resulted in a purification of 100-fold and a

142 yield of 0.3%. Gel filtration chromatography resulted in an important step of
143 purification since the activity eluted not coinciding with the main peak of protein
144 (Fig. 1A). The BLS was further purified through the chromatographic column
145 Resource-RPC and only 3 fractions showed antimicrobial activity, coinciding with a
146 single peak of protein (Fig. 1B).

A



B



147

148

149

150

151

152

Figure 1. (A) Purification of BLS from *Bacillus licheniformis* P40, in Sephadex G-100. (○) antimicrobial activity in AU.mL⁻¹. (●) absorbance at 215 nm. **(B)** Purification of BLS from *Bacillus licheniformis* P40, in Resource-RPC. (○) antimicrobial activity in AU.mL⁻¹. (●) absorbance at 215 nm.

153 **Table 1.** Purification of BLS from *Bacillus licheniformis* P40.

Step	Volume (mL)	Protein (mg)	Protein (mg/mL)	AU	AU/mL	EA	Total Purification	Total Recovery
Crude filtrate	200	1.992	9,96	640.000	3200	321	1	100
Pellet	8	21,46	2,68	51.200	6400	2386	7	8,0
Sephadex G-100	16	2,22	0,14	12.800	800	5766	18	2,0
Resource-RPC	4	0,05	0,01	1.600	400	32000	100	0,3

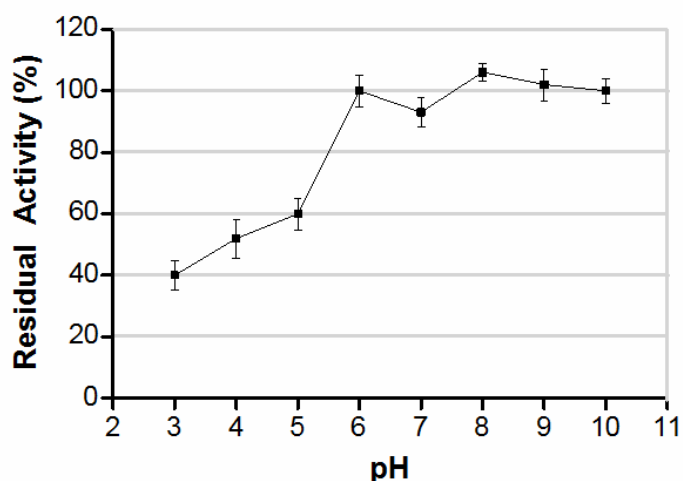
154

155 BLS was resistant to heating, maintaining its activity for up to 100°C for 10
 156 min, but not to the proteolytic action of pronase and trypsin (Table 2). BLS activity
 157 was sensitive to acidic pH. An important decrease in the antimicrobial activity was
 158 observed at pH values lower than 6 (Figure 2). Among chemicals tested, only
 159 butanol and trichloroacetic acid caused loss of BLS activity (Table 3).

160

161 **Table 2.** Effect of proteolytic enzymes on BLS P40 activity.

Enzims	Final Concentration (mg/mL)	Residual Activity (%)
Pronase E	2	88 ± 10
	5	91 ± 10
	10	0 ± 10
Trypsin	2	94 ± 8
	5	95 ± 17
	10	50 ± 17
Papain	2	95 ± 8
	5	97 ± 11
	10	89 ± 9
Proteinase K	2	88 ± 14
	5	95 ± 9
	10	91 ± 15



162
163 **Figure 2.** Effect of pH on the antimicrobial activity of BLS P40 (▪).

164

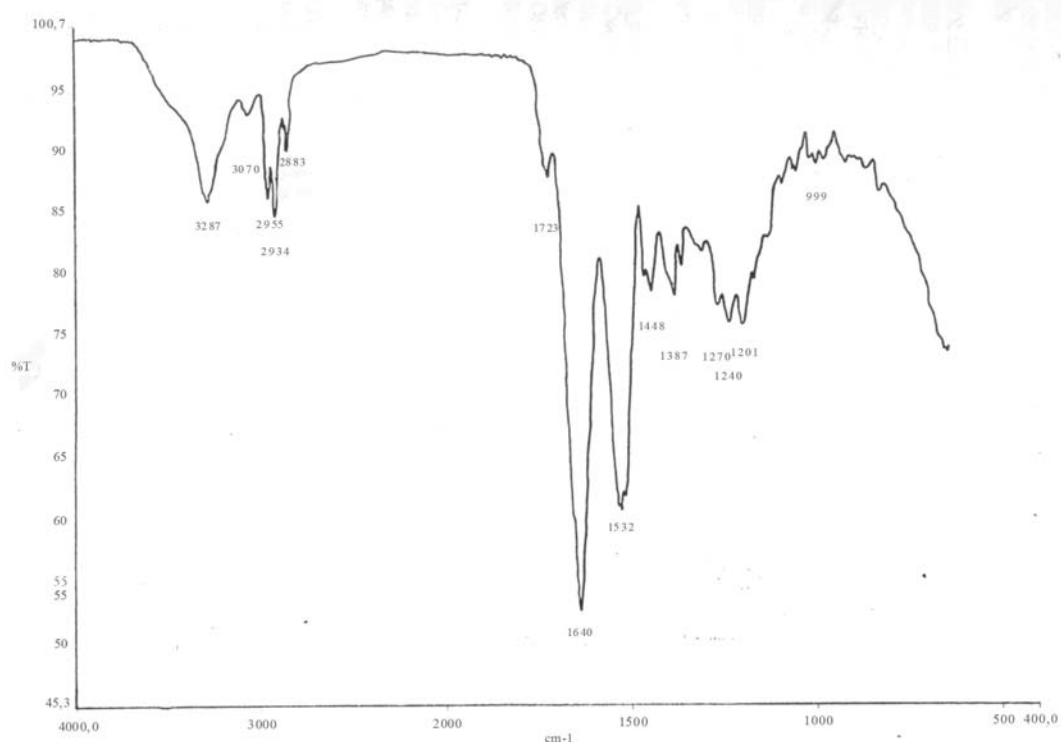
165 **Table 3.** Effect of chemicals on BLS P40 activity.

Chemicals	Concentration	Residual Activity (%)
Acetone	50 % (v/v)	100
Chloroform	50 % (v/v)	100
Ethanol	50 % (v/v)	100
Butanol	50 % (v/v)	0
Toluene	50 % (v/v)	100
EDTA	10 mM	100
TCA	100 mg/mL	0
Sodium deoxycholate	1 mg/mL	100
Tween 20	10% (v/v)	100
Tween 80	10% (v/v)	100
Triton X100	10% (v/v)	100

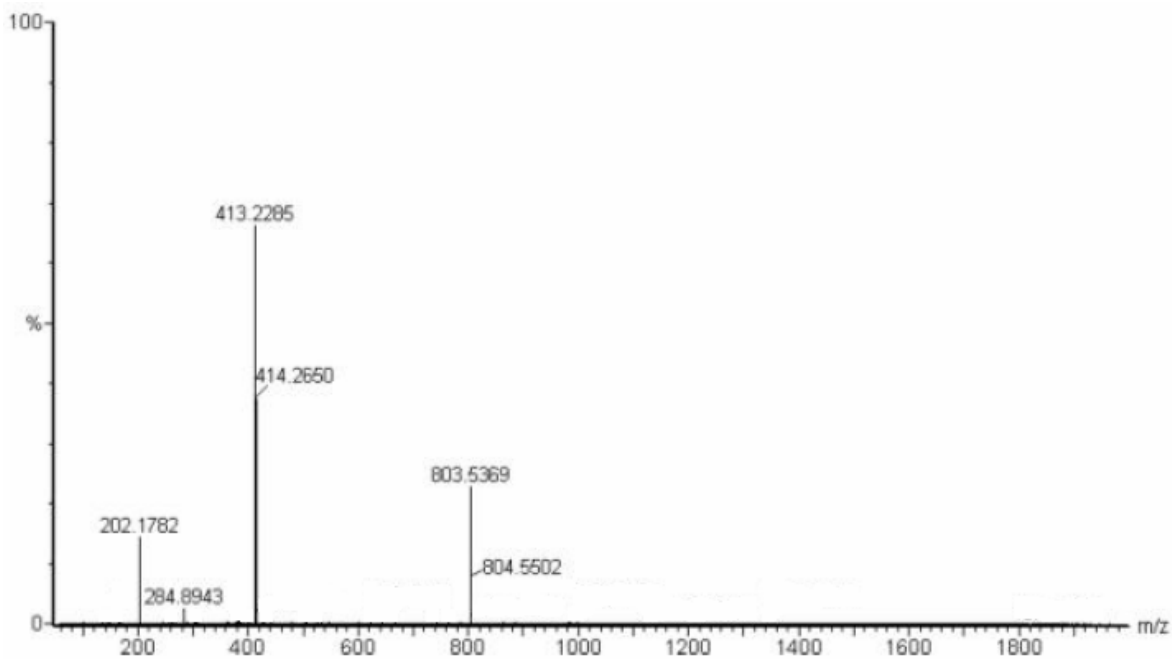
166

167 The BLS reaction with ninhidrin resulted a pale yellow color instead the
168 characteristic purple, which was observed after peptide hydrolysis. In addition,
169 BLS was not reactive with FNDB, indicating that no free $-NH_2$ groups were
170 available. Negative reaction for $-SH$ was also observed. The UV-visible spectrum
171 indicates the presence of aromatic amino acids. Also, typical absorbance of
172 peptide bonds at 220 nm was observed (data not shown).

173 BLS was analyzed by infrared and mass spectroscopy. The FTIR spectrum
174 of BLS showed characteristic peaks at 1640 cm^{-1} , characteristic of amide group
175 ($\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$ stretching) and 2955 cm^{-1} , characteristic of aliphatic C-H stretching
176 (fatty acids) (Figure 3). The MALDI TOF MS was chosen to measure the mass of
177 the compound. The mass spectrum showed a homologous $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion at m/z
178 803.5 (Figure 4).



179 **Figure 3.** FTIR spectrum of BLS P40.
180



181

182 **Figure 4.** Mass spectrum of BLS P40.

183

184 The partial characterization of BLS P40 suggests that this substance
 185 exhibits amphiphilic properties. The putative emulsifying activity of this substance
 186 was then investigated. The BLS showed emulsifying activity against several
 187 hydrophobic compounds, like kerosene and vegetable oils (Table 4).

188

189 **Table 4.** Emulsifying activity of the BLS P40.

Chemicals	E ₂₄ (%)
Kerosene	35 ± 6
Soybean oil	49 ± 6
Olive oil	46 ± 5
Cyclohexane	0 ± 0
Toluene	57 ± 8

190

191 **4. Discussion**

192 A bacteriocin-like substance produced by *B. licheniformis* was purified and
193 partially characterized. This peptide already demonstrated a wide action spectrum,
194 showing bactericidal activity against pathogenic bacteria pathogens and spoilage
195 food caused by bacteria, such as, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. carotovora* and
196 *S. aureus*, among other, as well as possessing the capacity to resist at high
197 temperatures (Cladera-Olivera *et al.*, 2004). In addition, it was produced in
198 inexpensive media such as cheese whey, which is considered a wastewater
199 generated in large amounts by the dairy industry. This turn the production of BLS
200 attractive since it seems more economical to conduct a productive process using a
201 by-product as cultivation media. Whey is used as culture medium for production of
202 nisin and pediocin, and the development of a bacteriocin powder from whey
203 fermentation could have applications in several foods where whey is already an
204 existing ingredient (Morgan *et al.*, 1999).

205 The overall recovery and purification fold obtained for BLS P40 were
206 comparable to that described for other bacteriocins (Martinez and Rodriguez,
207 2005; Rasch and Knocher, 1998). The purification of BLS showed a very effective
208 step at gel filtration, where the antimicrobial activity eluted free of most proteins.
209 The precipitation at low saturation of ammonium sulfate and elution at void volume
210 of gel filtration indicate that the BLS was secreted in the form of large aggregates.
211 This allowed an efficient purification in these steps. This observation was also
212 related for other bacteriocins, such as lactocins (Kamoun, 2005) and linocin M18
213 (Valdés-Stauber and Scherer, 1994).

214 The next purification step was to submit the BLS to a reversed phase
215 chromatography. Since this antimicrobial peptide presents hydrophobic
216 characteristics, it would elute when the solvent gradient (buffer/acetonitrile) was
217 with predominance of the apolar phase. This was observed and demonstrated in
218 the Figure 1B, in that way the antimicrobial activity was isolated in a single peptide
219 peak. The current purification protocol could be developed taking advantage of the
220 physicochemical characteristics of the BLS, mainly for the precipitation with
221 ammonium sulfate and gel-filtration chromatography.

222 From the mass spectrum, it can be concluded that this peptide presents a
223 low molecular weight. This information, together with the data obtained from
224 infrared spectrum, suggests a relationship with antimicrobial lipopeptides. The
225 occurrence of hydrophobic amino acids, which could be responsible to induce,
226 clustering in aqueous media, is associated with previously characterized
227 antimicrobial peptides from *B. subtilis* and *B. licheniformis*, such as liquenisin,
228 surfactin and esperin (Konz, *et al.*, 1998; Klaenhammer, 1993; Thomas and Ito,
229 1990). The amphiphatic lipopeptides that present antimicrobial activity can be
230 generated by the condensation with β -hydroxyl or β -amino fatty acids are already
231 known as products of the secondary metabolism of *B. subtilis* (Baugart, *et al.*,
232 1991; Bayer, *et al.*, 1995). Variations in length and ramification of the chains of
233 fatty acids suggest the hydrophobic behavior and emulsifying properties. In this
234 way, the BLS produced by the *B. licheniformis* P40 can be considered chemically
235 similar to antimicrobial lipopeptides produced by *B. subtilis* (Kowall *et al.*, 1998;
236 Stein, 2005). However, the molecular mass of BLS P40 (about 800 Da) was lower
237 than surfactin and liquenisin (1,036 Da and 1,021 Da, respectively), suggesting

238 that a different molecule was isolated. In this regard, we recently described a BLS
239 from a new *Bacillus* species isolated at the same geographic region, which was
240 purified and showed a molecular mass of 1,456 Da (Motta, *et al.*, 2007). Surfactin-
241 like compounds produced by species of *Bacillus* present about 7 amino acid
242 residues linked to a lipidic chain. The breakage of the cyclic structure of these
243 compounds originates molecules with molecular weight that can vary from 394 to
244 968 Da (Kalinovskaya, *et al.*, 2002).

245 Antimicrobials of the lipopeptide type are frequently produced by strains of
246 the genus *Bacillus* (Stein, 2005). Production of antimicrobial substances by
247 *Bacillus* species isolated from apolar environments have been already reported
248 (Korenblum, *et al.*, 2005). Among the examples mentioned in the literature,
249 surfactin has been the subject of extensive investigation. Surfactin presents a low
250 molecular mass and amphiphilic characteristics, being capable to act as
251 bioemulsifier (Peypoux *et al.*, 1999). Similarly to surfactin, the BLS P40 showed a
252 double antimicrobial-emulsifying effect, which indicates that it could be useful in
253 some food systems. However, this bifunctional activity should be tested in further
254 experiments to obtain toxicological information. According to Rosenborg and Ron
255 (1999), three functions may be attributed to the bioemulsifiers: (i) an increase of
256 the surface area of insoluble hydrophobic substances in water, (ii) an increase in
257 the bioavailability of hydrophobic substances increasing the solubility (iii) to
258 influence in the attachment and separation of microorganisms to and of surfaces.

259 The biotechnological potential of this BLS can be in a brief future, related to
260 the use in the food industry (due to antibacterial activity) and in biodetergent
261 formulation.

262 **Acknowledgements**

263 This work was supported by CNPq, Brazil.

264

265 **References**

- 266 Baumgart, F., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J. and Ziessow, D. (1991).
267 Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D
268 NMR spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,
269 177, 998-1005.
- 270 Bayer, A., Freund, S. and Jung, G. (1995). Post-translational heterocyclic
271 backbone modifications in the 43-peptide antibiotic microcin B17. Structure
272 elucidation and NMR study of to ¹³C, ¹⁵N-labelled gyrase inhibitor. *European*
273 *Journal Biochemistry*, 234, 414-426.
- 274 Bizani, D., & Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a
275 newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 512-
276 519.
- 277 Bizani D., Dominguez A.P.M., & Brandelli, A. (2005). Purification and partial
278 chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in*
279 *Applied Microbiology*, 41, 269-273.
- 280 Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., & Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance
281 production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*,
282 38, 251-256.
- 283 Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., Motta, A.S., Souto, A.A., & Brandelli, A. (2006).
284 Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot development caused by
285 *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 533-539.

286 Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., & Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins:
287 safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food*
288 *Microbiology*, 71, 1-20.

289 de Boer, A.S., & Diderichsen, B. (1991) On the safety of *Bacillus subtilis* and *B.*
290 *amilolyquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 595-
291 598.

292 Goodwin, J.F. (1968) On the measurement of urinary amino nitrogen with 1-fluoro-
293 2,4 dinitrobenzene. *Clinica Chimica Acta* 21, 231-240.

294 Kalinovskaya, N., Kuznetsova, T., Ivanova, E., Romanenko, L., Voinov, V., Huth,
295 F., & Laatsch, H. (2002). Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides
296 synthesized by *Bacillus pumilus* from Ascidian *Halocynthia aurantium*. *Marine*
297 *Biotechnology*. 4, 179-188.

298 Kamoun, F., Mejdoub, H., Auissaioui, H., Reinbolt, J., Hammani, A., & Jaoua, S.
299 (2005) Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin
300 F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringensis*. *Journal of Applied*
301 *Microbiology*. 98, 881-888.

302 Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid
303 bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-86.

304 Konz, D., Doekel, S. and Marahiel, M. (1999). Molecular and biochemical
305 characterization of the protein template controlling biosynthesis of the
306 lipopeptide lichenisin. *Journal of Bacteriology*, 181, 133-140.

307 Korenblum, E., der Weid, I., Santos, A.L., Rosado, A.S., Sebastian, G.V., Coutinho,
308 C.M., Magalhaes, F.C., Paiva, M.M. and Seldin, L. (2005). Production of
309 antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B.*

310 *licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil.
311 *Journal of Applied Microbiology*, 98, 667-675.

312 Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T., Franke, P., & Ziessow, D. (1998)
313 Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus*
314 *subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid Interface Science*, 204, 1-8.

315 Lisboa, M.P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J.A.P., Brandelli, A. (2006)
316 Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus*
317 *amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic Forest. *International*
318 *Microbiology* 9, 111-118.

319 Martínez, B., & Rodríguez, A. (2005) Antimicrobial susceptibility of nisin resistant
320 *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiology Letters* 252, 67-72.

321 Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C.W. (1972). Methods for studying
322 bacteriocins In: Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (Ed.) *Methods in Microbiology*, v.
323 7A, New York: Academic Press, 1972, 315-422.

324 Minamisawa, K., Seki, T., Onodera, S., Kubota, M., Asami, T. (1992) Genetic
325 relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates by repeated
326 sequences and various other characteristics. *Applied and Environmental*
327 *Microbiology* 58, 2832-2839.

328 Moore, S., & Stein, W.H. (1957) A modified ninhidrin method for the photometric
329 determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological*
330 *Chemistry* 211, 907-913.

331 Morgan SM, Galvin M, Kelly J, Ross RP, Hill C (1999) Development of a lacticin
332 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne
333 pathogens. *Journal of Food Protection* 62, 1011-1016.

334 Motta, A.S., & Brandelli, A. (2002) Characterization of an antimicrobial peptide
335 produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 63-70.

336 Motta, A.S., Lorenzini, D.M., Brandelli, A. (2007). Purification and Partial
337 Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Novel *Bacillus* sp.
338 Isolated from the Amazon Basin. *Current Microbiology* 54 (4), 282-286.

339 O'Sullivan, L., Ross, R.P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin producing
340 lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84,
341 593-604.

342 Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry
343 of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 553-563.

344 Rasch, M., & Knochel, S. (1998) Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes*
345 to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin. *Letters in Applied Microbiology* 27, 275-
346 278.

347 Riley, M.A., & Wertz, J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary
348 perspectives. *Biochimie*, 84, 357-364.

349 Rosenberg, E., & Ron, E.Z. (1999) High and low-molecular-mass microbial
350 surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 154-162.

351 Sangali, S., & Brandelli, A. (2000) Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain
352 kr2. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 735-743.

353 Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific
354 functions. *Molecular Microbiology*. 56, 845-857.

355 Sullivan, M.X., Hess, W.C. & Howard, H.W. (1942). The quantitative estimation of
356 both cystine and cysteine in mixture. *Journal of Biological Chemistry*, 145, 621-
357 624.

- 358 Thomas, D.W & Ito, T. (1990). The revised structure of the peptide antibiotic
359 esperin, established by mass spectrometry. *Tetrahedron*, 25, 1985-1990.
- 360 Valdés-Stauber, N & Scherer, S. (1994). Isolation and characterization of Linocin
361 M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Applied and*
362 *Environmental Microbiology*, 60, 3809-3814.
- 363 Willumsen, P.A., & Karlson, U. (1997). Screening of bacteria isolated from PAH-
364 contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers.
365 *Biodegradation*, 7, 415-423.
- 366 Zheng, G., Yan, L.Z., Vederas, J.C., & Suber, P. (1999). Genes of the sbo-alb
367 locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial
368 bacteriocin subtilisin. *Journal of Bacteriology*, 181, 7346-7355.

5.1. Conclusões

- A BLS P40 foi purificada por protocolo de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de gel filtração e cromatografia de fase reversa;
- A BLS P40 possui massa molecular de aproximadamente 800 Da;
- A BLS P40 foi inativada por pronase E, TCA e butanol, e parcialmente inativada por tripsina e pH inferior a 6,0;
- A BLS P40 apresenta propriedades emulsificantes;
- Esta substância apresenta bifuncionalidade, com potencial aplicação como bioconservante ou como biodetergente.

6. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bacteriocina produzida por *B. licheniformis* P40 mostrou resistência contra vários solventes orgânicos, mantendo sua atividade antimicrobiana, e tende a formar agregados em solução aquosa, características importantes para o processo de incorporação em nanovesículas de fosfolipídeos. Estas características são relevantes porque o processo de formação da vesícula possui uma etapa crítica, que é a adição do solvente orgânico acetato de etila. Caso a bacteriocina não apresentasse estabilidade frente a solventes orgânicos, a incorporação em nanovesículas seria prejudicada, pois estaríamos incorporando uma substância sem atividade biológica para desempenhar a função de bioconservante. Esta substância apresentou ainda capacidade emulsificante, indicando características anfipáticas e que pode sugerir a sua utilização como um biosurfactante. Esta propriedade pode ter influenciado no sucesso de incorporação da bacteriocina em nanovesículas, permitindo uma maior interação com a fosfatidilcolina usada no processo de encapsulamento. Além disso, a capacidade de formação de espuma pode indicar a presença de resíduos de aminoácidos apolares localizados à superfície deste peptídeo. Assim sendo, esta particularidade estrutural poderia facilitar o revestimento da nanovesícula com a fosfatidilcolina, pois o meio de formação da vesícula é em primeira etapa apolar e depois polar (com acréscimo de água esterilizada).

A presença ou não da bacteriocina no interior da nanovesícula foi determinada pela leitura com laser para mensurar o diâmetro (MERTINS, *et al.* 2006), ocorrendo, dessa forma, um aumento dessa medida da nanovesícula

contendo a bacteriocina em relação ao controle negativo (nanovesícula sem bacteriocina).

O resultado de inibição efetiva da bacteriocina contra *Listeria monocytogenes*, após incorporação da mesma em nanovesícula, e comparado com a bacteriocina sem encapsulamento, é de grande importância, pois é um passo relevante para o desenvolvimento de novos processos em termos de conservação de alimentos. Embora a bacteriocina sem encapsulamento tenha produzido um halo de inibição maior que o halo da bacteriocina encapsulada, isso não remete a uma perda de atividade da mesma, mas sim um indicativo de que a diminuição da atividade está associada à permeabilidade da vesícula e liberação de bacteriocina para o meio exterior, por uma espécie de meio de liberação controlada, bem como a difusão da nanovesícula no meio de cultura. A bacteriocina manteve-se estável por um período de aproximadamente 30 dias, enquanto a bacteriocina sem encapsulação perdeu a sua atividade antilisteria ao redor de 14 dias. Desse modo, a incorporação de bacteriocina em nanovesículas, sugere um processo de liberação controlada, pois ao mesmo tempo em que ocorre a difusão desta para o meio exterior, a quantidade que fica no interior da vesícula, está sendo protegida da degradação por agentes externos, dessa forma, teríamos um perfil de liberação gradativa do princípio ativo.

A atividade bactericida da bacteriocina foi determinada através da observação da diminuição no número de células viáveis de *L. monocytogenes* em um período de 10 minutos após a adição da nanovesícula contendo 400 UA.mL⁻¹. Esse tempo por ser bastante reduzido sugere que o mecanismo de ação contra este patógeno seja pelo rompimento da parede celular e membrana plasmática

(BIZANI & BRANDELLI, 2002). A bacteriocina, por apresentar características emulsificantes, pode interagir com a parede celular e membrana citoplasmática, permitindo a abertura de poros nas mesmas, dessa forma, ocorre o extravasamento do conteúdo citoplasmático da bactéria e, conseqüente, morte celular. Há estudos na literatura indicando que a incorporação de nisina em lipossomos também melhorou a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (WERE, *et al.*, 2003; LARIDI, *et al.*, 2003).

A bacteriocina produzida por *B. licheniformis* P40 foi purificada e parcialmente caracterizada. Este peptídeo já demonstrou um amplo espectro de ação, apresentando atividade bactericida frente a bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos, tais como, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. carotovora* e *S. aureus*, entre outros, bem como possuindo a capacidade de resistir a altas temperaturas (CLADERA-OLIVEIRA, *et al.*, 2004). Além disso, pode ser produzido em meios não suplementados, como soro de queijo que é considerado uma matéria-prima sem valor comercial da indústria láctea, devido a essa particularidade, esta bactéria é de fácil cultivo, podendo ser bastante explorada na produção de bioconservantes, sendo objeto de estudos posteriores a sua avaliação toxicológica.

De posse do espectro de massas e do espectro de infravermelho, pode se verificar que este peptídeo apresenta um peso molecular próximo as de outras bacteriocinas já descritas na literatura, informações, estas, sugerem que existe relação com outros peptídeos antimicrobianos. A prevalência de aminoácidos com características apolares, responsáveis pelo comportamento em meio aquoso, é característico de outros peptídeos antimicrobianos já isolados e identificados,

como é o caso da liquenisina, surfactina, esperina, entre outros (KONZ, *et al.*, 1998; KLAENHAMMER, 1993; BAUMGART, *et al.*, 1991; THOMAS & ITO, 1990). A bacteriocina produzida pelo *B. licheniformis* P40 pode ser considerada quimicamente semelhante às bacteriocinas surfactantes produzidas pelo *B. subtilis* (KOWALL, *et al.*, 1998; STEIN, 2005), embora sua massa molecular seja inferior ao descrito para estas substâncias.

Os dados obtidos neste trabalho podem contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas em preservação e conservação de alimentos, pois algumas bactérias que fazem parte da produção de determinados produtos, como, por exemplo, iogurtes, produzem peptídeos antimicrobianos, como é o caso das bactérias lácticas, entre elas podemos citar, *Lactobacillus* sp, que sintetizam a nisina (bacteriocina reconhecida como GRAS) (CLEVELAND, *et al.*, 2001).

A incorporação de peptídeos no interior de nanovesículas é uma ferramenta nova, utilizada para melhorar a estabilidade dos mesmos, ressaltando a busca por alimentos que possuam um maior tempo de vida de prateleira (“shelf-life”). Este tipo de processo pode ser usado em escala industrial, devido a sua facilidade de manipulação e execução, processo, este, que não necessita de equipamentos sofisticados e nem várias etapas de produção.

O estudo também contribui para elucidar o tipo de mecanismo que esta bacteriocina apresenta, sugerindo que seja baseado na lise da parede celular e membrana celular de bactérias gram-positivas, as quais possuem representantes que causam a deterioração de alimentos e podem causar patologias em humanos (KISS, *et al.*, 2006). A ação bactericida em até 10 minutos nos remete a esta

conclusão, bem como a vantagem de se utilizar este tipo de composto em alimentos em que não permite a proliferação de patógenos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEMANN, E.; LEROUX, J.; GURNY, R. 1998. Polymeric nanoand microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34: 171-189.
- ANDERSON, D.G.; BURDICK, J.A.; LANGER, R. 2004. Materials science. Smart biomaterials. *Science*, 305: 1923-1924.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. 1998. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*, 47: 415-433.
- BAUMGART, F.; KLUGE, B.; ULLRICH, C.; VATER, J.; ZIESSOW, D. 1991. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 177: 998-1005.
- BENEDETTI, H.; GELI, V. 1996. Colicin transport, channel formation and inhibition. *Handbook of Biology and Physics*, 2: 665-691.
- BERRIDGE, N.J.; NEWTON, G.G.F.; ABRAHAM, E.P. 1952. Purification and nature of the antibiotic nisin. *Biochemical Journal*, 52: 529-535.
- BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 261-268.
- BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B.; KALCHAYANAND, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 25-30.

- 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.; MORRISSY, J.; TERRA, R.; SOUTO, A.; BRANDELLI, A. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, 8: 125-131.
- BROZ, P.; DRIAMOV, S.; ZIEGLER, J.; BEN-HAIM, N.; MARSCH, S.; MEIER, W.; HUNZIKER, P. 2006. Toward Intelligent Nanosize Bioreactors: A pH-Switchable, Channel-Equipped, Functional Polymer Nanocontainer. *Nano Letters*, 6 (10): 2349-2353
- BUDARINA, Z. I.; SINEV, M. A.; MAYOROV, S. G.; TOMASHEVSKI, A. Y.; SHMELEV, I. V.; KUZMIN, N. P. 1994. Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*. *Archives of Microbiology*, 161: 252–257.
- CEVC, G. 2004. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 675-711.
- CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 251-256.
- CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; MOTTA, A.S.; SOUTO, A.A.; BRANDELLI, A. 2006 Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot development caused by *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 533-539.

- 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.
- DAMGAARD, P. 1995. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12: 245-250.
- DE BOER, A.S.; DIDERICHSEN, B. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amylolyquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 595-598.
- DE VUYST, L.D; VANDAMME, E.J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. London: *Blackie Academic & Professional*.
- DRUMMOND D.C.; MARX, C.; GUO, Z.H.; SCOTT, G.; NOBLE, C.; WANG, D.H.; PALLAVICINI, M.; KIRPOTIN, D.B.; BENZ, C.C. 2005. Enhanced pharmacodynamic and antitumor properties of a histone deacetylase inhibitor encapsulated in liposomes or ErbB2-targeted immunoliposomes. *Clinical Cancer Research*, 11: 3392-3401.
- EIJSINK, V.G.; SKEIE, M.; MIDDELHOVEN, P.H.; BRURBERG, M.B.; NES, I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3275-3281.
- ENFEDAQUE, J.; FERRAR, S.; GUASCH, J. F.; TOMAS, J.; REGUE, M. 1996. Bacteriocin 28b from *Serratia marcescens* N28b: identification of *Escherichia coli* surface components involved in bacteriocin binding and translocation. *Canadian Journal Microbiology*, 42: 19-26.

- FEDERAL REGISTER. 1998. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Federal Register*, 54: 11247-11251.
- FRANK, J. F. 1997. Milk and dairy products, p. 100–116. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.; OMAR, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001.
- GANZ, T.; LEHNER, R.I. 2001. Antimicrobial peptides in innate immunity. In: Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. (Ed. Karl Iohner). *Horizon Scientific Press*, Wymondham, U. K.
- GOUAUX, E. 1997. The long and short of colicin action: the molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure*, 5: 313-377
- GROSS, E.; MORELL, J.L. 1971. The structure of nisin. *Journal of the American Chemical Society*, 93: 4634-4635.
- GUASCH, J.; ENFEDAQUE, J.; FERRER, S.; GARGALLO, D.; REGUE, M. 1995. Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcesens* biotypes. *Research in Microbiology*, 146: 477-483.
- GUYONNET, D.; FREMAUX, C.; CENATIEMPO, Y.; BERJEAUD, J.M. 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1744-1748.
- HANCOCK, R.E.W.; DIAMOND, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiology*, 8, 402-410.

- HANCOCK, R.E.W.; SCOTT, M.G. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 8856-8861.
- HASHIDA, M.; KAWAKAMI, S.; YAMASHITA, F. 2005. Lipid carrier systems for targeted drug and gene delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53: 871-880.
- HASTINGS, J.W.; SAILER, M.; JOHNSON, K.; RAY, K.L.; VEDERAS, J.C. STILES, M.E. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology*, 173: 7491-7500.
- HE, L.; CHEN, W.; LIU, Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research*, 161 (4): 312-326.
- HECHARD, Y.; DERIJARD, B.; LETELLIER, F.; CENATIEMPO, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*, 138: 2725-2731.
- HENDERSON, J.T.; CHOPKO, A.L.; VAN WASSENAAR, P.D. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 295: 5-12.
- HOLCK, A.; AXELSSON, L.; BIRKELAND, S. E.; AUKRUST, T.; BLOOM, H. 1992. Purification of amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB 706. *Journal of General Microbiology*, 138: 2715-2720.

- HOLO, H.; NISSEN, O.; NESS, I. F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation, and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*, 173: 3879-3887.
- HURST, A. 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27: 85-123.
- IMURA, T.; OTAKE, K.; HASHIMOTO, S.; GOTOH, T.; YUASA, M.; YOKOYAMA, S.; SAKAI, H.; RATHMAN, J.; ABE, M. 2003. Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 27: 133-140.
- INGRAM, L. 1969. Synthesis of the antibiotic nisin: formation of lanthionine and b-methylanthionine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 184: 216-219.
- INGRAM, L. 1970. A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 224: 263-265.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R. 1992. Factors affecting the production of the group A streptococcus bacteriocin SA-FF22. *Journal of Medical Microbiology*, 36: 132-138.
- JACK, R.W.; CARNE, A.; METZGER, J.; STEFANOVIC, S.; SAHL, H.G.; JUNG, G.; TAGG, J.R. 1994. Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthioninecontaining antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *European Journal of Biochemistry*, 220: 455-462.
- JAMES, R.; KLEANTHOUS, C.; MOORE, G. R. 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology* 142: 1569-1580.
- KAMOUN, F.; MEJDOUB, H.; AUISSAIOUI, H.; REINBOLT, J.; HAMMANI, A.; JAOUA, S. 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of

- Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 881-888.
- KATZ, E.; DEMAIN, A.L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriology. Reviews*, 41: 449-474.
- KENNEY, T. J.; MORAN, C.P. 1991. Genetic evidence for interaction of sA with two promoters in *Bacillus subtilis*. *Journal Bacteriology*, 173: 3282-3290.
- KISS, R.; TIRCZKA, T.; SZITA, G.; BERNÁTH, S.; CSIKÓ, G. 2006. *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 71-74.
- KLAENHAMMER, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- KONZ, D.; DOEKEL, S.; MARAHIEL, M. 1999. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *Journal of Bacteriology*, 181: 133-140.
- KORENBLUM, E.; DER WEID, I.; SANTOS, A.L.; ROSADO, A.S.; SEBASTIAN, G.V.; COUTINHO, C.M.; MAGALHAES, F.C.; PAIVA, M.M.; SELDIN, L. 2005. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (3): 667-675.
- KUIPERS, O. P.; BEERTHUYZEN, M. M.; SIEZEN, R. J.; DE VOS, W. M. 1993. Characterization of the nisin gene-cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*—requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *European Journal of Biochemistry*, 216: 281-291.

- KWON, S. 1998. Diblock copolymer nanoparticles for drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 15: 481-512.
- LADOKHIN, A.S.; WHITE, S.H. 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melitin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1514: 253-260.
- LARIDI, R.; KHEADR, E.E.; BENECH, R.O.; VUILLEMARD, J.C.; LACROIX, C.; FLISS, I. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13: 325-33.
- LISBOA, M.P.; BONATTO, D.; BIZANI, D.; HENRIQUES, J.A.P.; BRANDELLI, A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic Forest. *International Microbiology*, 9: 111-118.
- LOHNER, K. 2001. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In: Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. (Ed. Karl Lohner). *Horizon Scientific Press*, Wymondham, U. K.
- MAGET-DIANA, R. 1999. 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.
- MARINGONI A.C.; KUROZAWA C. 2002. Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1339-1345.
- MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. 2005. Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiology Letters*, 252: 67-72.

- MARTIRANI, L.; VARCAMONTI, M.; NASCLERIO, G.; FELICE, M. 2002. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 1: 1-5.
- MAURIELLO, G.; DE LUCA, E.; LA STORIA, A.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. 2005. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 464-469.
- McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 285-308.
- MERTINS, O.; CARDOSO, M.B.; POHLMANN, A.R.; SILVEIRA, N.P. 2006. Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6: 1-7.
- MIKKOLA, R.; KOLARI, M.; ANDERSSON, M.; HELIN, J.; SALKINOJA-SALONEN, M. 2000. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. *European Journal Biochemistry*, 267: 4068-4074.
- MING, X.; WEBER, G.H.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.E. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, 62: 413-415.
- MOSZER, I.; JONES, L.M.; MOREIRA, S.; FABRY, C.; DANCHIN, A. 2002. SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Research*, 30: 62-65.
- MOTA-MEIRA, M.; LAPOINTE, G.; LACROIX, C.; LAVOIE, M. C. 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 24-29.

- MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. 2002. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 63-70.
- MURIANA, P.; KLAENHAMMER, T.R. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for the lactocin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* sp. *Journal of Bacteriology*, 173: 1779-1788.
- NAGHMOUCHIA, K.; DRIDER, D.; FLISS, I. 2007. Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1508-1517.
- NAGHMOUCHIA, K.; KHEADRA, E.; LACROIX, B.; FLISS, I. 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 24: 718-727.
- NARDIN, C.; HIRT, T.; LEUKEL, J.; MEIER, W. 2000. Polymerized ABA Triblock Copolymer Vesicles. *Langmuir*, 16: 1035-1041.
- NIEMINEN, T.; RINTALUOMA, N.; ANDERSSON, M.; TAIMISTO, A.M.; ALI-VEHMAS, T.; SEPPÄLÄ, A.; PRIHA, O.; SALKINOJA-SALONEN, M. 2007. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Journal Veterinary Microbiology*. doi:10.1016/j.vetmic.2007.05.015.
- 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.
- PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; FILIPOVIC-GRCIC, J.; MARTINAC, A.; JALSENJAK, I. 2005. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *Journal of Controlled Release*, 106: 34-43.

- PATNAIK, P.; KAUSHIKÀ, J.K.; GROVER, S.; BATISH, V.K. 2001. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 636-645.
- PEDERSEN, P.B.; BJORNVAD, M.E.; RASMUSSEN, M.D.; PETERSEN, J.N. 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 36: 155-161.
- POLOZOVA, A.; YAMAZAKI, A.; BRASH, J.; WINNIK, F. 1999. Effect of polymer architecture on the interactions of hydrophobically modified poly-(*N*-isopropylamides) and liposomes. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 147: 17-25.
- RA, R.; BEERTHUYZEN, M; DE VOS, W. M.; SARIS, P. E. J.; KUIPERS, O. P. 1999. Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology*, 145: 1227-1233.
- RASCH, M.; KNOCHEL, S. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 275-278.
- RAY, B.; DAESCHEL, M. 1992. Food biopreservatives of microbiological origin. *CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.*
- RILEY, M. A. 1993. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 1380-1395.
- RILEY, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocins evolution. *Annual Reviews of Genetics*, Palo Alto, 32: 255-278.

- RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84: 357-364.
- RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. 2002. Bacteriocin: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56: 117-137.
- ROSS, K.F.; RONSON, C.; TAGG, J.R. 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Applied Environmental and Microbiology*, 59: 2014-2021.
- ROUVEIX, B. 2007. Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1208-1209.
- SAHL, H.G.; BRANDIS, H. 1981. Production, purification and chemical properties of an anti-staphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of General Microbiology*, 127: 377-384.
- SALKINOJA-SALONEN, M.S.; VUORIO, R.; ANDERSSON, M.A.; KAMPFER, P.; ANDERSSON, M.C.; HONKANEN-BUZALSKI, T. ; SCOGING, A.C. 1999. Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4637-4645.
- SANO, Y.; MATSUI, H.; KOBAYASHI, M.; KAGEYAMA, M. 1990. Pyocins S1 and S2, bacteriocins of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. Ed. S Silver, pp. 352–58. Washington, DC: ASM.
- SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 71: 58-64.

- SCHREIR, S.; MALHEIROS, S.V.P.; DE PAULA, E. 2000. Surface active drugs: self-association and interactions with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508: 210-234.
- SCHÜLLER, F.; BENZ, R.; SAHL, H.G. 1989. The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *European Journal of Biochemistry*, 182: 181-186.
- SEKI, J.; SONOKE, S.; SAHEKI, A.; KOIKE, T.; FUKUI, H.; DOI, M., MAYUMI, T., 2004. Lipid transfer protein transports compounds from lipid nanoparticles to plasma lipoproteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 275: 239-248.
- SILVÁN, J. M.; LAGEMAAT, J.; OLANO, A.; CASTILLO, M. D. 2006. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (5): 1543-1551.
- SIRAGUSA, G.R.; CUTTER, C.N.; WILLETT, J.L. 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiology*, 61: 229-235.
- SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. 2003. *Bacillus subtilis* and its closest Relatives. From Genes to Cells. *American Society for Microbiology Press*. Washington, DC.
- STILLES, M.E.; HASTINGS, J.W. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science & Technology*, 2: 247-251.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriology Reviews*, 40: 722-756.

- TAHARA, T.; KANATANI, K.; YASHIDA, K.; MIURA, H.; SAKAMATO, M.; OSHIMURA, M. 1992. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK 8912. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56: 1212-1215.
- TICHACZEK, P.S.; NISSEN-MEYER, J.; NES, I.F.; VOGEL, R.F.; HAMMES, W.P. 1993. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH 673. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 460-468.
- THOMAS, D.W.; ITO, T. 1969. The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry. *Tetrahedron*, 25: 1985-1990.
- TURNBULL, P.C.B.; KRAMER, J.M. 1995. *Bacillus*, p. 349–356. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
- TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 233-244.
- UECKERT, J.E.; TER STEEG, P.F.; COOTE, P.J. 1998. Synergistic antibacterial action of heat in combination with nisin and magainin II amide. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 487-494.
- VAN BELKUM, M.J.; KOK, J.; VENEMA, G.; HOLO, H.; NES, I.F.; KONINGS, W.N.; ABEE, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *Journal of Bacteriology*, 173: 7934-7941.

- VANDERMEER, J. R.; POLMAN, J.; BEERTHUYZEN, M. M.; SIENZEN, R. J.; KUIPERS, O. P.; DEVOS, W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus-lactis* nisin-a operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 175: 2578-2588.
- VENEMA, K.; ABEE, T.; HAANDRIKMAN, A.J.; LEENHOUTS, K.J.; KOK, J.; KONINGS, W.N.; VENEMA, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiolactivated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental and Microbiology*, 59: 1041-1048.
- .WERE, L. M.; BRUCE, B. D.; DAVIDSON, P. M.; WEISS, J. 2003. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipids nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 8073-8079.
- WOGAN, G. N.; HECHT, S. S.; FELTON, J. S.; CONNEY, A. H.; LOEB, L. A. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14 (6): 473-486.
- WU, M.; MAIER, E.; BENZ, R.; HANCOCK, R.E.W. 1999. 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.
- YAKIMOV, M.; TIMMIS, K.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1706-1713.

ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.

ZHENG, G.; YAN, L.Z.; VEDERAS, J.C.; SUBER, P. 1999. Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *Journal of Bacteriology*, 181: 7346-7355.