

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**MODELAGEM CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DO PEPTÍDEO  
ANTIMICROBIANO P34 EM SISTEMAS ALIMENTARES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VOLTAIRE SANT'ANNA

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**MODELAGEM CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DO PEPTÍDEO  
ANTIMICROBIANO P34 EM SISTEMAS ALIMENTARES**

VOLTAIRE SANT'ANNA  
- ENGENHEIRO DE ALIMENTOS (UFRGS) –

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente como requisito para obtenção do Grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

ORIENTADOR: DR. ADRIANO BRANDELLI

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2010

“Único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

“Pedras no caminho? Junto todas e um dia construo meu castelo”

Fernando Pessoa

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Adriano Brandelli, pela confiança, apoio e paciência com minhas dúvidas quanto às publicações.

À Renata, pelas loucuras, os chimas e as gargalhadas; Stela, pela parceria de concursos, dúvidas de alimentos e as risadas; Michele, pelos congressos, apoio de iniciação científica e risadas; Ana e Dani, pelas dúvidas de *papers* e risadas; a Florência, pela paciência da co-orientação extra-oficial (sem isso não teria ido tão longe) e risadas; Fer Lopes e Leães pelas parcerias de bancada, discussões de protocolos e risadas; Pati pela parceria nos artigos e muitas risadas. A todos do lab 218 pela parceria, cumplicidade e pelas conversas inúteis nos intervalos de experimentos. Sem vocês nada disse teria tido graça.

À minha namorada, Paloma, pelo amor incondicional e apoio às minhas idas ao laboratório durante vários fins-de-semana.

Aos meus pais por todo suporte emocional e financeiro que me têm dedicado ao longo de 20 anos.

Ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

## Modelagem cinética de inativação térmica do peptídeo antimicrobiano P34 em sistemas alimentares<sup>1</sup>

**Autor:** Voltaire Sant'Anna

**Orientador:** Adriano Brandelli

### RESUMO

O peptídeo antimicrobiano P34, produzido por *Bacillus* sp. P34, bactéria isolada do intestino do peixe Piau-com-pinta da bacia amazônica, tem potencial uso como bioconservante em alimentos, principalmente aqueles que sofrem tratamento térmico. Neste trabalho, foi realizado um estudo da modelagem cinética de inativação térmica do peptídeo antimicrobiano P34, além de calcular os parâmetros cinéticos e termodinâmicos em diferentes condições de estresse. Amostras de 1,0 ml da bacteriocina P34 em solução tampão pH 4,5, 6,0 ou 7,0 ou em solução tampão pH 7,0 com adição de 1 ou 5% de cloreto de sódio ou ainda em leite desnatado ou integral sofreram tratamento térmico entre 90°C e 120°C por até 300 min. Os resultados mostram que a equação de reação de primeira ordem é a que melhor descreve a cinética de inativação térmica do peptídeo P34. Os valores  $D$  em pH 4,5 variaram entre 14 e 192 min, com valor  $z$  de 27 °C; em pH 6,0, esse parâmetro variou entre 26 e 191 min, com valor  $z$  de 33 °C; já em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, os valores  $D$  variaram entre 39 e 227 min com valor  $z$  de 27 °C; em pH 7,0 com adição de 1% de cloreto de sódio os valores  $D$  variaram de 28 a 245 min, com valor  $z$  de 37 °C; com a adição de 5% de sal em pH 7,0 os valores  $D$  variaram entre 32 e 698 min, com valor  $z$  de 24 °C. A diminuição do pH reduziu a estabilidade térmica do peptídeo P34. Em altas temperaturas a presença de sal reduziu a estabilidade térmica, enquanto nas menores temperaturas estudadas houve aumento da sua resistência. Resultados similares ocorreram em leite. Em altas temperaturas houve mais rápida inibição da atividade antimicrobiana do peptídeo P34. Os valores  $D$ , em leite desnatado, variaram entre 32 a 327 min, enquanto em leite integral, entre 17 a 194 min. Já em leite integral a 90 °C não houve inibição da atividade do peptídeo. A presença de gordura acelerou a inibição da bacteriocina, possivelmente devido ao rompimento da membrana dos glóbulos de gordura, permitindo a adsorção do peptídeo na fração lipídica em altas temperaturas. A análise termodinâmica sugere que o desdobramento da molécula do peptídeo P34 pode ser o passo determinante para a inativação térmica irreversível nas condições testadas. Os resultados mostram que o peptídeo P34 pode ser usado em condições de pasteurização ou de esterilização, mantendo parte de sua atividade antimicrobiana após o tratamento térmico.

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (98 p.). Agosto, 2010.

# Kinetic modeling of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in food systems<sup>1</sup>

**Author:** Voltaire Sant'Anna

**Orientation:** Adriano Brandelli

## ABSTRACT

The antimicrobial peptide P34, produced by *Bacillus* sp. P34, a bacterium isolated from the gut of the Piau-com-pinta fish from the aquatic environment of the Amazon basin, has potential use as bioconservante in foods, especially those that suffer heat treatment. In this work, a study was performed to analyse the applicability of various inactivation models available in the literature and their thermodynamic and kinetic parameters under different stress conditions were calculated. Aliquots of 1,0 ml of the bacteriocin at pH 4,5, 6,0 or at sodium phosphate buffer pH 7,0; and at skim or fat milk were heated in sealed tubes (1 mm of in the range of 90-120 °C for over 300 min. The first-order model provided the best description of the kinetics of inactivation. The *D* values at pH 4,5 the *D* values ranged between 14-192 min, with *z* value of 27 °C; at pH 6,0 ranged from 25 to 191 min, with *z* value of 33 °C; at phosphate buffer at pH 7,0 ranged between 39-227 min, with *z* value of 38 °C; at pH 7,0 with addition of 1% of sodium chloride the *D* values ranged between 28-245 min, with *z* value of 37 °C; with the addition of 5% of the salt at pH 7,0 the *D* values ranged from 32 to 698 min, with *z* value of 24 °C. The low pH reduced the thermal stability of the peptide P34. At high temperatures the presence of salt reduced the thermal stability, while at the lower temperatures studied there was an increase of its resistance. Similar results occurred in milk. At high temperatures there was a faster inhibition of antimicrobial peptide P34. The *D* values, at skim milk, ranged between 32 and 327 min, while at fat milk, between 17 and 194 min. At 90 °C, in fat milk, the peptide was not inhibited. The presence of fat accelerated the inhibition of bacteriocin, possibly due to disruption of the membrane of fat globules, allowing the adsorption of the peptide in the lipid fraction at high temperatures. The thermodynamic analysis suggests that the unfolding of the molecule of the peptide P34 may be the a determining step for the irreversible thermal inactivation under the conditions tested. The results show that the peptide P34 can be used under pasteurization or sterilization conditions, mantaining part of its antimicrobial activity after the thermal processing.

1/ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (98 p.). August, 2010.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Histórico das bacteriocinas.....	<b>3</b>
2.2 Definição de bacteriocina.....	<b>4</b>
2.3 Classificação de bacteriocinas.....	<b>5</b>
2.4 Peptídeo P34.....	<b>7</b>
2.5 Aplicação de bacteriocinas em alimentos.....	<b>9</b>
2.6 Combinação bacteriocinas com outros métodos de conservação....	<b>12</b>
2.6.1 Combinação com pulsos elétricos.....	<b>12</b>
2.6.2 Combinação com EDTA e lactato de sódio.....	<b>13</b>
2.6.3 Combinação com ultra altas pressões.....	<b>13</b>
2.6.4 Combinação com atmosfera modificada.....	<b>14</b>
2.6.5 Combinação com tratamento térmico.....	<b>15</b>
2.7 Modelagem cinética de inativação térmica.....	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Manutenção dos microrganismos.....	<b>21</b>
4.2 Produção da bacteriocina P34.....	<b>21</b>
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	<b>22</b>
4.4 Inativação térmica.....	<b>23</b>
4.5 Comparação de modelos.....	<b>24</b>
4.6 Análise cinética de inativação.....	<b>26</b>
4.7 Análise termodinâmica de inativação.....	<b>27</b>
4.8 Análise estatística.....	<b>28</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
5.1 Comparação de modelos de inativação térmica.....	<b>29</b>
5.2 Análise cinética de inativação térmica em solução tampão pH 7,0... <b>34</b>	
5.3 Análise cinética de inativação térmica em condições de estresse.... <b>37</b>	
5.4 Análise termodinâmica de inativação térmica em diferentes condições.....	<b>45</b>

5.5 Análise cinética e termodinâmica de inativação térmica em leite.....	51
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>8 ANEXO.....</b>	<b>81</b>



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Equação de Arrhenius para as constantes de inativação térmica da bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10mM pH 7,0.....**32**
- FIGURA 2.** Dependência da distribuição de Weibull coeficiente  $b$  em função da função log-logística da bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10mM pH 7,0.. .....**33**
- FIGURA 3.** Inativação térmica da bacteriocina P34 a 90 (o), 100 (x), 110 ( $\Delta$ ), 115 ( $\square$ ), 120 °C ( $\diamond$ ).....**34**
- FIGURA 4.** Variação do tempo de redução decimal ( $D$ ) em função da temperatura de inativação da bacteriocina P34.....**36**
- FIGURA 5.** Inativação térmica da bacteriocina P34 modelada pela equação de reação de primeira ordem a 90 (x), 100 (o), 110 ( $\Delta$ ), 115 ( $\square$ ), 120 °C ( $\diamond$ ). (A) em pH 4,5, 0% de NaCl, (B) em pH 6,0, 0% de NaCl, (C) em pH 7,0 e 1% de NaCl, (D) em pH 7,0, 5% de NaCl.....**40**
- FIGURA 6.** Variação do tempo de redução decimal ( $D$ ) em função da temperatura para inativação da bacteriocina P34. ( $\diamond$ ) em pH 4.5, 0% de NaCl, ( $\square$ ) em pH 6,0, 0% de NaCl; (o) em pH 7,0, 1% of NaCl; (x) em pH 7,0, 5% of NaCl.....**42**
- FIGURA 7.** Gráfico da plotagem das constantes de inativação em função da temperatura de para a equação de para a bacteriocina P34. ( $\Delta$ ) em pH 4,5 com 0% NaCl; (x) em 6,0 com 0% NaCl; ( $\diamond$ ) em pH 7,0, com 1% de NaCl; ( $\square$ ) em pH 7,0 com 5% de NaCl.....**46**
- FIGURA 8.** Atividades residuais da bacteriocina P34 modelada pela equação de reação de primeira ordem a 100 (x), 110 ( $\Delta$ ), 115 ( $\square$ ), 120 °C ( $\diamond$ ). (A) leite desnatado em pó; (B) leite integral em pó..... **52**
- FIGURA 9.** Variação do tempo de redução decimal ( $D$ ) em função da temperatura para inativação da bacteriocina P34. ( $\diamond$ ) leite desnatado; ( $\square$ ) leite integral.....**55**
- FIGURA 10.** Gráfico da plotagem das constantes de inativação em função da temperatura de para a equação de para a bacteriocina P34. (o) leite desnatado; ( $\square$ )leite integral.....**58**

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Equações cinéticas de inativação térmica para analisar a estabilidade térmica do peptídeo P34.....**17**
- TABELA 2.** Adequação dos modelos selecionados para representar a inativação térmica da bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0.....**30**
- TABELA 3.** Os parâmetros cinéticos de inativação térmica do peptídeo P34 para a bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10mM pH 7,0.....**35**
- TABELA 4.** Parâmetros cinéticos de inativação térmica da bacteriocina P34 no pH e condições diferentes de sal.....**41**
- TABELA 5.** Valores de energia de ativação ( $E_a$ ) térmica da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 em diferentes condições de solução.....**47**
- TABELA 6.** Valores dos parâmetros termodinâmicos de inativação térmica da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 em diferentes condições de solução.....**49**
- TABELA 7.** Parâmetros cinéticos de inibição do peptídeo P34 em leite desnatado e integral.....**54**
- TABELA 8.** Valores dos parâmetros termodinâmicos de inativação térmica da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 em leite desnatado e integral....**60**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BAL</b>	Bactérias Ácido Láticas
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>BLS</b>	Substância tipo-bacteriocina
<b>CIA</b>	Critério de Informação de Akaike
<b>D</b>	Tempo de redução decimal (min)
<b>Da</b>	Daltons
<b>Ea</b>	Energia de ativação ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>mg</b>	Miligramas
<b>ml</b>	Mililitros
<b>kDa</b>	KiloDaltons
<b>k</b>	constante de inativação térmica ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>kg</b>	Kilogramas
<b>UA</b>	Unidades Arbitrarias
<b>l</b>	Litros
<b>MGGL</b>	Membrana de Glóbulos de Gordura do Leite
<b>PRM</b>	Produtos da Reação de Maillard
<b>MPa</b>	Mega Pascal
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	microlitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>min</b>	minutos
<b>kJ</b>	kiloJoule
<b>h</b>	Constante de Planck ( $6,6262 \times 10^{-34} \text{ J s}$ )
<b><math>K_B</math></b>	Constante de Boltzmann ( $1,3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ )
<b>R</b>	Constante universal dos gases ( $8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
<b><math>t_{1/2}</math></b>	Tempo de meia-vida (min)
<b>UAP</b>	Ultra Alta Pressão
<b>UHT</b>	<i>Ultra High Temperature</i>
<b><math>\chi^2</math></b>	Chi-quadrado
<b><math>\Delta H^\#</math></b>	Varição de entalpia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
<b><math>\Delta G^\#</math></b>	Varição de energia livre de Gibbs ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
<b><math>\Delta S^\#</math></b>	Varição de entropia ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

## 1. INTRODUÇÃO

A busca de novas formas de bioconservação de alimentos tem sido impulsionada principalmente devido à demanda por parte de consumidores por produtos seguros, minimamente processados de alta qualidade, preparados sem aditivos químicos e com longa vida-de-prateleira.

O desenvolvimento e a proliferação de bactérias resistentes a antibióticos têm-se tornado um grave problema de saúde pública no mundo. A rápida escalada da resistência microbiana pode fazer com que algumas infecções bacterianas não possam ser tratadas com os agentes antimicrobianos existentes. Além disso, nas últimas décadas notou-se que há uma evolução bastante pronunciada da incidência das doenças de origem alimentar provocadas por bactérias. Esforços em várias áreas das ciências da saúde, dentre eles principalmente a da microbiologia, vêm sendo realizados para estudar e controlar este problema. Dentre as soluções está a descoberta de novos antimicrobianos. Neste sentido tem-se investido amplamente no estudo de bacteriocinas, substâncias de natureza protéica produzidas por bactérias, com atividade antimicrobiana, com potencial uso como bioconservantes em alimentos. Muitas bacteriocinas de bactérias ácido-lácticas têm sido caracterizadas e testadas em alimentos com objetivo de

biopreservação, com sucesso. A nisina é a bacteriocina mais estudada, sendo o seu uso em alimentos já permitido em mais de 40 países.

Uma interessante estratégia para o controle e combate de microrganismos em alimentos é a combinação de bacteriocinas com outros métodos de inibição como tratamentos térmicos, redução de pH, salinização, altas pressões, entre outros. Assim, torna-se interessante aprofundar as pesquisas sobre o comportamento dessas substâncias em sistemas alimentares e sua estabilidade frente a essas combinações de tecnologias.

Devido à escassa informação sobre a cinética de inativação térmica de bacteriocinas na literatura, é importante se obter dados para otimizar o uso dessas substâncias como bioconservantes na indústria de alimentos. Além disso, é de extrema importância que se conheça o comportamento e a estabilidade dessas substâncias aplicadas em sistemas alimentares durante processos que utilizam calor, muito comum à indústria de alimentos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico das bacteriocinas

Os primeiros registros sobre bacteriocinas datam por volta do ano de 1877, quando Pasteur e Joubert reportaram uma interação antagonista entre bactérias ao observar que um “isolado comum” podia interferir no crescimento de *Bacillus anthracis*, quando inoculados juntos (REEVES, 1965). Já em 1925, André Gratia publicou um estudo referente ao antagonismo promovido por uma linhagem de *Escherichia coli* sobre outras linhagens da mesma espécie. As substâncias responsáveis por esse efeito inibitório foram denominadas de ‘colicinas’ em referência ao microrganismo produtor original. Com a descoberta de que a produção desses compostos não se limitava ao grupo dos coliformes, Jacob e colaboradores em 1953 (*apud* REEVES, 1972) propuseram o termo ‘bacteriocina’ para as proteínas antimicrobianas produzidas por microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos.

Em 1947, Mattick e Hirsch (*apud* COTTER *et al.*, 2005) concentraram uma substância inibidora produzida por uma linhagem de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que apresentava um amplo espectro de atividade, denominando-a de nisina. Esta bacteriocina foi inicialmente purificada e comercializada na Inglaterra em 1953, sendo considerada segura para uso em alimentos pelo JECFA/OMS em 1969. Na Europa, em 1983, nisina foi adicionada à lista de

aditivos alimentares e, em 1988, nos EUA, o *Food and Drug Administration* autorizou seu uso em queijos processados. O uso desta bacteriocina é hoje permitido como conservante em mais de 40 países (COTTER *et al.*, 2005). No Brasil, em 1996, foi autorizado seu emprego em queijos na concentração de até 12,5 mg kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 1996).

## 2.2 Definição de bacteriocina

As bacteriocinas são definidas como substâncias bactericidas, antibióticos de natureza protéica altamente específicos, não multiplicáveis, sintetizados por algumas linhagens bacterianas com ação contra isolados das mesmas espécies, ou sobre outros organismos estritamente relacionados com a espécie produtora (COTTER *et al.*, 2005;).

O termo substância tipo-bacteriocina (*bacteriocin-like substance*) aplica-se às moléculas de natureza protéica, porém ainda não purificadas e com estrutura ainda não completamente definidas ou que não cumprem com todas as características das bacteriocinas. Essas substâncias, geralmente, possuem um maior espectro de ação do que a definição clássica de bacteriocinas, atuando contra uma variedade de bactérias gram-positivas, algumas gram-negativas e até contra alguns fungos (MESSENS e DE VUYST, 2002).

Assim, toda bacteriocina ou substância tipo-bacteriocina tem uma proteína ou peptídeo que é essencial para sua função bactericida (Reeves, 1965). A maioria das bacteriocinas descritas até o momento tem um baixo peso molecular e são estáveis ao calor. Estas características essencialmente as diferenciam de alguns antibióticos, considerados metabólitos secundários, com

variável espectro de ação, quando presentes em relativamente baixas concentrações (REEVES, 1965; COTTER *et al.*, 2005; CLEVELAND *et al.*, 2001).

### **2.3 Classificação das bacteriocinas**

A descoberta de diferentes bacteriocinas revelou diversidade de estruturas químicas e características permitindo o agrupamento em diferentes classes (KLAENHAMMER, 1993).

Klaenhammer (1993) propôs a classificação das substâncias em 4 classes. A classe I, ou lantibióticos, representada pela nisina, é constituída por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (<5 kDa), diferenciados dos demais pela presença de lantionina e derivados; a classe II é composta por pequenos peptídeos (<10 kDa) termoestáveis divididos em três subclasses: IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B); a classe III é representada por peptídeos termolábeis de alto peso molecular (>30 kDa) como helveticina J; na classe IV encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura. Contudo, Cleveland e colaboradores (2001) acreditam que estes complexos são artefatos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas.

Em 2005, Cotter e colaboradores propuseram uma nova classificação, a qual subdivide as bacteriocinas em duas categorias distintas: os lantibióticos (classe I) contendo lantionina e os não lantibióticos (classe II), enquanto os peptídeos de alto peso molecular termolábeis, formalmente componentes da



classe III, seriam separadamente designados de 'bacteriolisinas'. Estes autores sugerem ainda, que a classe IV seja extinta.

Mais recentemente, Nes e colaboradores (2007) revisaram a classificação das bacteriocinas e propuseram a seguinte organização, onde as bacteriocinas estariam distribuídas em três grandes classes de acordo com seu modo de ação, estrutura, suas características bioquímicas e genéticas.

A classe I ou lantibióticos é composta por peptídeos que contêm lantionina ou  $\beta$ -lantionina, sendo dividida em duas subcategorias: tipo A (moléculas lineares com estrutura flexível em solução) com a nisina e subtilina como seus principais exemplos, e tipo B (com estrutura rígida e globular) com a mersacidina, mutacina como integrantes dessa categoria.

A classe II contém pequenos peptídeos (< 10 kDa) heterogêneos e estáveis e que também podem ser subdivididos. A subclasse IIa é composta por bacteriocinas com alta especificidade contra *Listeria monocytogenes*. Possuem 37 a 48 resíduos de aminoácidos, com uma porção N-terminal com configuração de folha pregueada e uma porção C-terminal contendo uma ou duas  $\alpha$ -hélices (FIMLAND *et al.*, 2005). Os principais representantes dessa subclasse são a pediocina, enterocina e a sakacina. A subclasse IIb é composta por bacteriocinas heterodiméricas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos. Estes peptídeos apresentam atividade muito baixa se forem empregados individualmente (GARNEAU *et al.*, 2002). Compõe essa subclasse a plantaricina e a lactacina F. Já a subclasse IIc é composta pelas bacteriocinas que apresentam uma união covalente das terminações C e

N, resultando em uma estrutura cíclica (KAWAI *et al.*, 2004). São representantes desta classe: a enterocina AS-48, a circularina A e a reutericina.

A classe III é composta por grandes proteínas (>30 kDa) termolábeis, são bacteriocinas complexas quanto à atividade e à estrutura protéica. Seu mecanismo de ação se diferencia das demais bacteriocinas, promovendo a lise celular através da lise da parede celular do microrganismo alvo. Apresentam uma porção N-terminal homóloga a uma endopeptidase, responsável pela catálise da parede celular, e uma porção C-terminal responsável pelo reconhecimento da célula alvo (LAI *et al.*, 2002).

#### **2.4 Peptídeo P34**

Apesar de nisina já ter seu uso permitido para aplicações em alimentos e sua eficácia no controle microbiano comprovado, ela apresenta algumas limitações tecnológicas. Nisina é ativa em pH ácido, tendo pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana em pH neutro. Além disso, algumas bactérias têm a capacidade de produzir substâncias proteolíticas que inibem essa bacteriocina, já sendo relatado a expressão nisinase (enzima que degrada nisina) em alguns trabalhos. Ainda tem sido relatado o desenvolvimento de resistência por parte de alguns microrganismos à nisina (ALIFAX e CHEVALIER, 1962; LEE *et al.*, 2002; GARDE *et al.*, 2004). Com isso, é interessante o estudo de novos peptídeos antimicrobianos para incrementar sistemas de conservação na indústria de alimentos visando a segurança alimentar desses produtos.

Motta (2006) purificou e caracterizou um peptídeo com atividade antimicrobiana produzido por *Bacillus* sp. P34, microrganismo isolado do

intestino do peixe Piau-com-pinta, proveniente de ambiente aquático da bacia amazônica brasileira.

O peptídeo P34 é um metabólito primário produzido na fase exponencial de crescimento do *Bacillus* sp. P34, com massa molecular de 1.456 Da e amplo espectro de ação. Apresenta atividade antimicrobiana frente a importantes patógenos e deteriorantes de alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Erwinia carotovora*, *Aeromonas hydrophila*, entre outras (MOTTA *et al.*, 2007a).

Esse peptídeo se mantém ativo em faixa de pH entre 3,0 e 10,0, após tratamento térmico de 100 °C, e apresenta atividade residual de 65% em temperatura de congelamento por 15 dias (MOTTA, 2006). Essa substância ainda é sensível a lipase e a todas as enzimas proteolíticas testadas. Seu modo de ação antimicrobiano se dá por alterações em nível de membrana celular provocando efeitos bactericida e bacteriolítico em *Listeria monocytogenes* (MOTTA *et al.*, 2007b; MOTTA *et al.*, 2008).

Em experimentos de citotoxicidade *in vitro*, tendo nisina como padrão de comparação, foi observado comportamento similar entre as duas bacteriocinas nos testes realizados (VAUCHER *et al.*, 2010), indicando baixa toxicidade do peptídeo P34.

A produção em escala industrial da bacteriocina P34 ainda exige amplo estudo da conformação de sua molécula, sua seqüência de aminoácidos, da sua expressão em bactérias reconhecidas como seguras para aplicação em alimentos, além de otimização em larga escala do seu protocolo de purificação. Porém estudos até então desenvolvidos conferem ao peptídeo P34 um

potencial uso em sistemas de conservação de alimentos, principalmente naqueles que necessitam de tratamento térmico para o aumento da sua vida-de-prateleira.

## **2.5 Aplicação de bacteriocinas em alimentos**

A biopreservação é uma técnica utilizada para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos por meio do emprego de microbiota protetora e/ou seus produtos antimicrobianos, como ácidos orgânicos e bacteriocinas (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Bactérias ácido lácticas (BAL) têm um grande potencial para uso como bioconservadores, porque elas são seguras para consumo humano (*Status GRAS*) e são a microbiota predominante durante armazenamento em muitos alimentos (CASTELLANO *et al.*, 2008). A bacteriocina mais estudada é a nisina, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, e foi comercializada pela primeira vez na Inglaterra em 1953 e desde então foi aprovada para uso em mais de 40 países (ARAUZ *et al.*, 2009). No Brasil é a única com permissão para aplicação na indústria de alimentos (BRASIL, 1996).

Nisina foi utilizada em leite desnatado com sucesso para o controle de *L. monocytogenes* quando o produto foi armazenado a 4°C por até 14 dias. No mesmo trabalho, quando aplicada em leite integral, a bacteriocina, em concentração de 0,1 mg ml<sup>-1</sup>, auxiliou no controle do patógeno, porém não inibindo seu crescimento ao longo do período de armazenagem (MALHEIROS *et al.*, 2010). Pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici* MCH14, quando incorporada em salsichas para o controle de *L. monocytogenes* e

*Clostridium perfringens*, foi capaz de inibir parcialmente o crescimento dos patógenos quando o produto foi armazenado a 4°C por 60 dias e mesmo quando o alimento foi armazenado em temperaturas acima da de refrigeração (10 ou 15°C) por um período de até 30 dias (NIETO-L OZANO *et al.*, 2010). Em estudo realizado por Leroy e De Vuyst (2005), no qual foi avaliada a eficácia de sakacina CTC 494 em salsicha, foi verificado que, na presença de grandes quantidades de gordura, típico desse tipo de produto, a bacteriocina foi aparentemente inativada possivelmente devido à adsorção do antimicrobiano pela gordura. Ananou e colaboradores (2010) verificaram que, em presunto cozido, enterocina AS-48, bacteriocina produzida por *Enterococcus faecalis*, aumentou a fase lag de *L. monocytogenes*, porém não foi eficaz no seu controle ao longo de 60 dias de armazenamento. No mesmo estudo, *Staphilococcus aureus* se mostrou sensível à enterocina AS-48, porém a bacteriocina não manteve a contagem do patógeno ao longo dos 60 dias de armazenamento.

O gênero *Bacillus* inclui uma variedade de espécies industrialmente importante e tem um histórico de uso seguro em alimentos e na indústria farmacêutica (PEDERSEN *et al.*, 2002). Apesar do intenso trabalho de bacteriocinas produzidas por BAL, bacteriocinas ou várias substâncias tipo-bacteriocinas (BLS) têm sido descritas para *Bacillus amyloliquefaciens* (LISBOA *et al.*, 2006), *Bacillus cereus* (BIZANI *et al.*, 2005), *Bacillus licheniformis* (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004), *Bacillus thuringiensis* (CHERIF *et al.*, 2001) entre outros, apresentando um amplo espectro de atividade antibacteriana e potencial uso como bioconservantes em alimentos.

BLS P40 foi utilizada em batatas para evitar o crescimento de *Erwinia carotovora*, bactéria deteriorante responsável pela doença podridão-mole. A BLS teve efeito bactericida, evitando os sintomas da doença em batatas, mostrando grande potencial para proteger os tubérculos durante seu armazenamento (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2006). Bizani e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do peptídeo cereína 8A, produzida por *B. cereus* 8A, isolado de solos brasileiros, em leite e em superfície de queijo frente a *L. monocytogenes*. Em leite UHT a bacteriocina foi capaz de diminuir a contagem do patógeno ao longo de um período de armazenagem de 14 dias. Em leite pasteurizado, igualmente, foi verificada a redução de células viáveis no produto lácteo quando tratado com o antimicrobiano. Já na superfície de queijo minas frescal, a cereína 8A reduziu em 2 ciclos logarítmicos a contagem de *L. monocytogenes* em relação ao controle realizado.

O peptídeo antimicrobiano P34 foi avaliado em lingüiça frescal de frango (QUADROS, 2007). Neste estudo foi possível verificar que, após 14 dias de armazenagem em temperatura de refrigeração, a bacteriocina reduziu a contagem de *L. monocytogenes* em cerca de 2,4 ciclos logarítmicos em relação à contagem inicial do patógeno. Quando ela foi combinada com solução de nisina comercial, Nisaplin<sup>®</sup>, houve sinergismo da ação antimicrobiana das bacteriocinas em relação ao tratamento apenas com a bacteriocina P34 (QUADROS, 2007).

As propriedades químicas e físicas de um alimento, como pH, proteínas, gorduras e enzimas proteolíticas podem afetar a atividade antimicrobiana de

bacteriocinas (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004). Nisina é altamente ativa em pH ácido e pouco, ou nada, ativa em pH perto da neutralidade. A baixa eficiência em produtos cárneos pode ser devido à interferência de componentes da carne, tais como fosfolipídeos que limita a sua atividade ou devido à presença de enzimas proteolíticas presentes nesses produtos (DEEGAN *et al.*, 2006). Certos aditivos alimentares têm-se mostrados antagônicos à nisina. Por exemplo, a nisina é degradada na presença de metabissulfito de sódio (um antioxidante e agente antimicrobiano de largo espectro) e dióxido de titânio (clareador), que são muitas vezes utilizados em alimentos (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 1996).

## **2.6 Combinação de bacteriocinas com outras técnicas de conservação**

A literatura sugere que bacteriocinas não devem ser utilizadas como a principal barreira para impedir o crescimento ou sobrevivência de agentes patogênicos, mas elas poderiam fornecer um obstáculo adicional para controlar ou evitar o crescimento de microrganismos patógenos (DEEGAN *et al.*, 2006). Segundo Cleveland e colaboradores (2001), bacteriocinas frequentemente tem efeito sinérgico quando combinadas com outros agentes antimicrobianos.

### **2.6.1 Combinação com pulsos elétricos**

A atividade de bacteriocinas frente a bactérias Gram-negativas é geralmente baixa. O uso de pulsos eletromagnéticos, que aumenta a permeabilidade de membranas celulares das bactérias, tem sido usado para

incrementar a atividade de bacteriocinas contra bactérias Gram-negativas. Essa técnica tornou a nisina mais eficaz no controle de *Escherichia coli* (TEREBIZNIK *et al.*, 2000).

### **2.6.2 Combinação com EDTA e lactato de sódio**

Antioxidantes muito usados na indústria de alimentos, com atividade quelante, EDTA e lactato de sódio também têm sido usados em combinação com bacteriocinas visando a desestabilização da membrana celular de bactérias Gram-negativas. Tanto nisina quanto lactocina 705/AL05 tiveram sua atividade antimicrobiana aumentada quando foram combinadas com EDTA ou lactato de sódio (BARI *et al.*, 2005; BELFIORE *et al.*, 2007). O tratamento de células de *Salmonella* Enteritidis com cereína 8A e EDTA ou lactato de sódio mostrou, em microscopia eletrônica, vesiculização do protoplasma da célula, a formação de poros e, em alguns casos, a desintegração das células. As células de *Salmonella* Enteritidis tratadas apenas com cereína 8A apresentaram pequenos poros, não em sua maioria, na membrana da célula. A combinação dos tratamentos foi mais eficaz no controle de células viáveis do patógeno quando comparado a suas aplicações individualmente (LAPPE *et al.*, 2009a).

### **2.6.3 Combinação com ultra-altas pressões**

Outra técnica que vem sendo utilizada é o uso de ultra-alta pressões (UAP) para o controle microbiano em alimentos. Considerando-se a ação antimicrobiana de bacteriocinas, a sua combinação com UAP é uma interessante técnica para uso em indústrias de alimentos visando grande



redução de bactérias patogênicas e deteriorantes, além de minimizar o impacto do processamento industrial sobre a qualidade e fatores nutricionais dos alimentos (SOBRINO-LÓPEZ e MARTIN-BARBOSA, 2008). Nisina mostrou melhorar a ação antimicrobiana de tratamentos com UAP em leite frente a *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* e *L. innocua* devido a lesões na membrana celular dessas bactérias tornando-as mais sensíveis a bacteriocinas (BLACK *et al.*, 2005). Da mesma forma, a combinação de pediocina AcH e tratamento de 350 MPa de pressão, aumentou a vida de prateleira de rosbife de 42 dias para 84 dias quando armazenado em temperatura de refrigeração (KALCHAYANAND *et al.*, 2003). Já lacticina 3147 e UAP aumentaram a redução de células viáveis de *Staphylococcus aureus* em leite e no soro de leite (MORGAN *et al.*, 2000), mantendo ainda parte de sua atividade antimicrobiana após o tratamento dos produtos.

#### **2.6.4 Combinação com atmosfera modificada**

Embalagem em atmosfera modificada (AM) é freqüentemente usada na indústria de alimentos para prolongar a vida útil dos alimentos perecíveis. Fang e Lin (1994) verificaram que *L. monocytogenes* foi completamente inibida em carne de porco quando o produto foi tratado com nisina e embalado em AM composta de 80% de CO<sub>2</sub> e 20% de ar durante o armazenamento por 30 dias. Nisina e pediocina, em salmão defumado resfriado embalado a vácuo ou em embalagem com 100% de CO<sub>2</sub> inibiram o crescimento de *L. monocytogenes* quando o produto foi armazenado em temperatura de 4°C (NILSSON *et al.*, 1997; SZABO e CAHILL, 1998). O sinergismo dos tratamentos foi creditado à

ação de bacteriocina e CO<sub>2</sub> na membrana citoplasmática da célula, reforçando a permeabilização da membrana (NILSSON *et al.*, 2000).

### **2.6.5 Combinação com tratamento térmico**

Tratamento térmico é o processo mais utilizado para aumentar a vida-de-prateleira de alimentos (AWUAH *et al.*, 2007). Do ponto de vista da técnica de obstáculos, a nisina é conhecida pela sua influência na resistência térmica de microrganismos.

O valor de tempo de redução decimal (valor *D*) de *B. cereus* em leite foi reduzido na presença de nisina em 40% em temperaturas na faixa de 80-100 °C (PENNA e MORAES, 2002), enquanto o valor de *D* de *Bacillus stearothermophilus* a 130 °C foi reduzido em 21% devido com a presença de nisina (WANDLING *et al.*, 1999). Com isso, o uso de nisina em combinação com tratamentos de calor tem a capacidade de prolongar a vida-de-prateleira de leite, tornando possível a substituição de intensos processamentos térmicos para os tratamentos mais brandos e, conseqüentemente, melhor qualidade sensorial e nutricional dos produtos (SOBRINO-LÓPEZ e MARTIN-BARBOSA, 2008).

Além disso, tem sido demonstrado que a intensidade dos tratamentos térmicos podem ser reduzidas quando em combinação com nisina e enterocina AS-48 quando endósporos bacterianos foram usados como cultura indicadora. (BEARD *et al.*, 1999; WANDLING *et al.*, 1999; GRANDE *et al.*, 2006), indicando a possibilidade de reduzir custos no tratamento térmico e diminuindo o impacto do calor sobre os alimentos (GÁLVEZ *et al.*, 2007). Outro fator

interessante no uso de bacteriocinas termoestáveis nessas análises é que elas têm a capacidade de suportar os tratamentos com calor, mantendo parte de sua atividade antimicrobiana no produto durante sua vida-de-prateleira.

Exemplos desse impacto foram os testes realizados por Wirjantoro e colaboradores (2001), em que o leite adicionado de nisina e aquecido a 115 °C por 2 segundos, foi microbiologicamente e sensorialmente aceitável depois de 28 dias, além de não apresentar *off-flavors* ao longo de um tempo de prateleira de 32 dias. Da mesma forma, em estudo posterior, não houve crescimento microbiano em leite tratado simultaneamente com a nisina e calor (117 °C por 2 segundos) após o armazenamento a 10 °C por 1 ano. O leite tratado desta maneira foi facilmente distinguível e preferido ao leite UHT em ensaios de análise sensorial.

## **2.7 Modelagem cinética de inativação térmica**

Modelos cinéticos de destruição térmica são essenciais para o desenvolvimento de novos processos considerando a segurança alimentar e gerando maximização da retenção de fatores de qualidade (AWUAH *et al.*, 2007). Assim, para a eficaz combinação de bacteriocinas com tratamento térmico é essencial que se determine os modelos cinéticos que regem o comportamento dessas substâncias antimicrobianas em processamentos que usam calor.

Modelos matemáticos consistem em equações que fornecem uma saída com base em um conjunto de dados de entrada. É uma forma concisa de expressar comportamento físico em termos matemáticos. O objetivo da

modelagem matemática de inativação térmica é avaliar o efeito de diferentes tratamentos térmicos sobre a atividade residual, podendo então estimar a perda de atividade durante o tratamento, sem a necessidade de executar ensaios numerosos (VAN BOEKEL, 2008). Modelagens de inativação têm sido descritas para microrganismos, componentes de alimentos e enzimas (NAIM *et al.*, 2008; BLASCO *et al.*, 2004; SHALINI *et al.*, 2008). Considerando-se que a inativação prossegue normalmente através de uma rede de reações, incluindo a desnaturação, agregação, coagulação e decomposição química, os modelos cinéticos são baseados em mecanismos diferentes: de primeira ordem, reações consecutivas e paralelas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Equações cinéticas de inativação térmica para analisar a estabilidade térmica do peptídeo P34.

<b>Modelo (nº Equação)</b>	<b>Equação</b>	<b>Referência</b>
Primeira ordem (1)	$\frac{A}{A_o} = \exp(-kt)$	LUDI KHUYZE <i>et al.</i> , 1999
Distribuição de Weibull (2)	$\frac{A}{A_o} = \exp(-bt^n)$	WEIBULL, 1951
Ordem $n$ (3)	$\frac{A}{A_o} = \{A_o^{1-n} + (n-1) \times kt\}^{1/(1-n)}$	LUDI KHUYZE <i>et al.</i> , 1999
Duas frações (4)	$\frac{A}{A_o} = a \times \exp(-k_L t) + (1-a) \times \exp(-k_R t)$	CHEN e WU 1998
Conversão fracionada (5)	$\frac{A}{A_o} = A_r + (A_o - A_r) \times \exp(-kt)$	RIZVI e TONG 1997

Nas equações,  $A$  representa a atividade antimicrobiana ( $\text{UA ml}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (min),  $A_0$  é a atividade inicial ( $\text{UA ml}^{-1}$ ) e  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) é a constante de inativação térmica em uma dada temperatura.

A cinética de primeira ordem (Eq. 1) já foi relatada descrevendo a inativação térmica da bacteriocina cereína 8A (LAPPE *et al.*, 2009b) e várias enzimas (LUDI KHUYZE *et al.*, 1999). Os parâmetros temperatura-dependentes dessa modelagem são dados pela equação de Arrhenius (Equação 6), que descreve a relação entre a constante de inativação térmica ( $k$ ) e a temperatura.

$$\ln(k) = \ln(C) - \frac{E_a}{RT} \quad (6)$$

onde  $C$  é a constante de Arrhenius,  $E_a$  é a energia de ativação,  $R$  a constante universal dos gases e  $T$  é a temperatura absoluta.

Para enzimas há modelagens cinéticas que sugerem que a perda de atividade pode ser descrita pela soma de duas decaídas exponenciais, uma para parte termolábil da enzima e outra para a porção termorresistente da molécula ativa (Eq. 3-5).  $k_L$  e  $k_R$  são a constante de inativação térmica para a reação de primeira ordem para a fração lábil e resistente, respectivamente. O coeficiente  $a$  representa a fração ativa do grupo térmico lábil em relação à atividade total (CHEN e WU, 1998; WEEMAES *et al.*, 1998). Conversão fracionada se refere a um processo de inativação de primeira ordem e leva em conta a não inativação total da atividade enzimática após aquecimento prolongado, devido à presença de uma fração extremamente resistente ao

calor (RIZVI e TONG, 1997).  $n$  é a ordem da reação no modelo de ordem variável.

O padrão de distribuição de Weibull (WEIBULL, 1951) se baseia no pressuposto de que, nas condições analisadas, a taxa momentânea da sensibilidade térmica ao calor é um fator da intensidade do aquecimento transiente e a atividade residual, e não da taxa na qual a atividade residual foi atingida (PELEG e PENCHINA, 2000). Eq. (2) representa a forma cumulativa da distribuição de Weibull. O parâmetro  $b$  da distribuição de Weibull é característica de cada reação e equivale a taxa de reação térmica. Diferentemente da reação de primeira ordem, em que a taxa de inativação térmica é constante ( $k$ ), o parâmetro  $b$  da distribuição de Weibull é dependente da temperatura. Esta dependência pode ser expressa algebricamente pela equação log-logística (CORRADINI e PELEG, 2004), de acordo com a equação 7:

$$b(T) = \log_e \{ 1 + \exp[k'(T - T_c)] \} \quad (7)$$

onde  $T_c$  e  $k'$  são constantes, sendo que  $T_c$  marca o nível de temperatura em que a inativação começa a acelerar e  $k'$  é a taxa com que  $b(T)$  aumenta com o aumento da temperatura.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade térmica do peptídeo antimicrobiano P34.

O trabalho tem como objetivos específicos:

- Determinar a equação matemática que melhor descreve a cinética de inativação do peptídeo antimicrobiano P34 em solução tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0;
- Avaliar a influência de pH ácido e a presença de cloreto de sódio na estabilidade térmica da bacteriocina P34;
- Cálculo dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica;
- Avaliar a estabilidade térmica da bacteriocina P34 em leite desnatado e integral, calculando os parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil).

### **4.1 Manutenção dos microrganismos**

O microrganismo produtor da bacteriocina foi o *Bacillus* sp. P34, isolado do intestino do peixe Piau-com-pinta, proveniente da bacia Amazônica brasileira (MOTTA *et al.*, 2004). O microrganismo indicador para atividade antimicrobiana foi *L. monocytogenes* ATCC 7644. As culturas foram mantidas em ágar BHI a 4°C. A cada 7 dias, essas culturas foram inoculadas em novas placas de ágar BHI e incubadas por 24 horas a 37 °C. O estoque foi feito do cultivo em caldo BHI, contendo 20% de glicerol e armazenado a -20 °C.

### **4.2 Produção da bacteriocina P34**

A produção da bacteriocina P34 foi obtida como descrita por Motta e colaboradores (2007a). Para a padronização do inóculo da bactéria produtora da bacteriocina P34, colônias do microrganismo produtor foram coletadas por raspagem de placas e transferidas para frascos com 20 ml de caldo BHI. A



cultura foi incubada a 37 °C (temperatura de melhor crescimento do *Bacillus* sp. P34) por 24 horas em equipamento incubador com agitação (120 rpm). Uma alíquota de 1,5 ml do inóculo foi transferida para 150 ml de caldo BHI e incubado a 30 °C (temperatura ótima de produção da bacteriocina) por 24 horas, em equipamento incubador com agitação (120 rpm). Para a obtenção da substância antimicrobiana, o cultivo em caldo foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 7°C, para separar as células bacterianas do sobrenadante bruto do meio de cultivo.

Seguindo protocolo de Motta e colaboradores (2007a), o sobrenadante bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio à 20 % de saturação, em banho de gelo a 10°C, sob agitação. Após, houve nova centrifugação e o *pellet* foi ressuscitado com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e filtrado em membrana 0,22 µm. A seguir, foi eluído com a mesma solução tampão em coluna de gel-filtração Sephadex G-100 e frações de 1 ml foram coletadas para realização do teste de atividade antimicrobiana.

### **4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana**

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita pelo Método de Difusão em Ágar com Discos (KIMURA *et al.*, 1998). Para o preparo da cultura indicadora, foi feita a suspensão de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em tubo de ensaio com solução de NaCl 0,85% padronizada com densidade ótica de 0,15, que corresponde a 0,5 na Escala de McFarland, tendo-se aproximadamente  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônias por mililitro). A suspensão foi espalhada uniformemente sobre ágar BHI com *swab* estéril, e alíquotas de 20

$\mu\text{l}$  da bacteriocina foram aplicadas sobre o ágar BHI. As placas foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, sendo a presença de halos indicativa da presença de atividade antimicrobiana. A quantificação da atividade antimicrobiana da bacteriocina foi determinada pelo método da diluição seriada modificada. A atividade foi definida como sendo a recíproca da última diluição que apresentou zona de inibição e é expressa em unidades arbitrárias por mililitro ( $\text{UA ml}^{-1}$ ), de acordo com Mayr-Harting e colaboradores (1972).

#### **4. 4 Inativação Térmica**

A estabilidade térmica da bacteriocina P34 foi avaliada de quatro formas independentes: em condição ideal (solução tampão pH 7,0), em presença de cloreto de sódio, em meio ácido e em leite. Primeiramente foram realizados testes de inativação térmica da bacteriocina P34 em solução tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0; em um segundo momento, à bacteriocina P34 extraída da coluna de Sephadex G-100, foi adicionado 1% ou 5% de cloreto de sódio; em outro experimento ao peptídeo P34 extraído da cromatografia de gel filtração foi adicionado HCl  $0,5\text{ mol l}^{-1}$  até que o pH da solução atingisse 4,5 ou 6,0; e, finalmente, à bacteriocina P34 parcialmente purificada foi adicionado leite desnatado ou integral em pó (adquirido no comércio local) na concentração sugerida pelo fabricante para se obter leite fluido ( $0,1\text{ mg ml}^{-1}$ ).

Devido à falta de tubos TDT, mais recomendados para o estudo de cinética de inativação térmica, o protocolo utilizado foi aquele sugerido por Lappe e colaboradores (2009b). Alíquotas de 1 ml de bacteriocina P34 foram aquecidas em tubos selados, sofrendo então tratamento térmico em bloco

térmico controlado em diferentes temperaturas. Os tubos foram retirados em intervalos de tempos determinados e imediatamente resfriados. A atividade antimicrobiana foi então determinada como descrita anteriormente. A atividade após 1 minuto de aquecimento ( $t = 0$  min) foi considerada como a atividade inicial, eliminando desse modo os efeitos do aquecimento. Isso para assegurar que a temperatura no centro geométrico do tubo esteja na mesma temperatura do bloco térmico, caracterizando o experimento como isotérmico. Os experimentos foram realizados em duplicatas. O peptídeo P34 foi incubado em uma faixa de temperatura entre 90 °C a 120 °C.

#### **4.5 Comparação de modelos**

A comparação entre modelos foi realizada para a bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Os resultados de atividade residual após tratamento térmico foram adequados aos modelos apresentados na Tabela 1 e parâmetros de ajuste dos dados experimentais às equações foram analisados.

Para a comparação dos ajustes obtidos por regressão não-linear, parâmetros estatísticos e critérios físicos foram considerados. Critérios estatísticos incluíram o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e critério de informação de Akaike (CIA) (HURVICH e TSAI, 1989).

Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para comparar modelos de inativação térmica de enzimas (SCHOKKER e VAN BOEKEL, 1997; CORRADINI e PELEG, 2004) e é dada por:

$$\chi^2 = \frac{\sum (a_{measured} - a_{predicted})^2}{(n - p)} \quad (8)$$

Quando os modelos com diferentes números de parâmetros são comparados, a soma dos quadrados dos resíduos pode não dar informações suficientes para a distinção entre os modelos. O critério de informação de Akaike (CIA) produz um ranking de modelos parcimoniosos quando o número de dados experimentais é pequeno, ou quando o número de parâmetros ajustados é uma fração moderada de um grande número de dados. Este critério compara os modelos de sua soma de quadrados, corrigido para o número de parâmetros (HURVICH e TSAI, 1989).

O CIA tem sido o método de comparação estatístico de inativação térmica utilizado para analisar a modelagem matemática de enzimas (SCHOKKER e VAN BOEKEL, 1997; VAN DEN HOUT *et al.*, 1999) e é definido em trabalho de Van den Hout e colaboradores (1999) como:

$$CIA = n \ln \left( \frac{\sum (a_{measured} - a_{predicted})^2}{n} \right) + \frac{n(n + p)}{n - p - 2} \quad (9)$$

onde  $n$  é o número de observações e  $p$  o número de parâmetros.

O modelo com o menor  $\chi^2$ , CIA e com maiores valores de  $R^2$  para a atividade antimicrobiana residual é a melhor escolha de um ponto de vista estatístico. Além disso, a estimativa de um ou mais parâmetros negativos pela

análise de um dado modelo foi considerado como critério de rejeição da equação.

#### 4.6 Análise cinética de inativação

No processamento com uso de calor, é comum caracterizar as reações de primeira ordem em termos de valores  $D$  e  $z$  (TDT - tempo de morte térmica). O tempo de redução decimal (Valor  $D$ ) é o tempo necessário para uma redução de 90% da atividade inicial a uma dada temperatura. É obtido através da plotagem dos valores de atividade antimicrobiana em uma escala logarítmica versus o correspondente tempo de processamento. Ele é obtido pela equação:

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

O valor  $z$  é a temperatura necessária para reduzir o valor de  $\log D$  uma unidade, e é obtida plotando os valores de  $D$  em uma escala logarítmica versus as temperaturas correspondentes (STUMBO, 1973).

Os valores de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foram obtidos pela equação:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (11)$$

#### 4.7 Análise termodinâmica de inativação

As constantes de inativação (valor  $k$ ) podem seguir a lei de Arrhenius (Eq. 6), que descreve a relação entre a constante de inativação térmica ( $k$ ) e a temperatura.

A  $E_a$  pode ser obtida pela equação de regressão linear de  $\ln(k)$  vs  $1/T$  dos dados obtidos, e comparada com a equação que rege essa lei.

Com isso, através da teoria de estado de transição (Eq. 12-14), foi possível calcular a entalpia de inativação ( $\Delta H^\ddagger$ ), a energia livre de inativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) e entropia de ativação ( $\Delta S^\ddagger$ ) pode ser calculado pelas expressões:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - R.T \quad (12)$$

$$\Delta G^\ddagger = -R.T \cdot \ln\left(\frac{k.h}{K_B T}\right) \quad (13)$$

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T} \quad (14)$$

onde  $h$  ( $6,6262 \times 10^{-34}$  J s) é a constante de Planck e  $k_B$  ( $1,3806 \times 10^{-23}$  J K<sup>-1</sup>) é constante a Boltzmann.

#### **4.8 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram analisados pela comparação entre as médias de duplicatas, através de análise de variância e posterior teste de *Tukey* pelo software *Statistica 7.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK), sendo as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peptídeo P34 foi anteriormente relatado como inibidor de uma ampla gama de importantes bactérias, incluindo microrganismos patogênicos e deteriorantes, como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Erwinia carotovora* e isolados clínicos de *Aeromonas hydrophila*. Ainda manteve-se estável em temperaturas de até 100 °C, além de não perder atividade antimicrobiana quando em ampla faixa de pH (MOTTA *et al.*, 2007b). Com isso, ela se apresenta como potencial antimicrobiano a ser usado como alternativa a conservantes usualmente utilizados no controle bacteriano.

### 5.1 Comparação de modelos de inativação térmica

Foram testadas diversas equações de cinética de inativação térmica para ajustar os dados experimentais. Os resultados para a adequação das atividades residuais para os diferentes modelos são mostrados na Tabela 2.



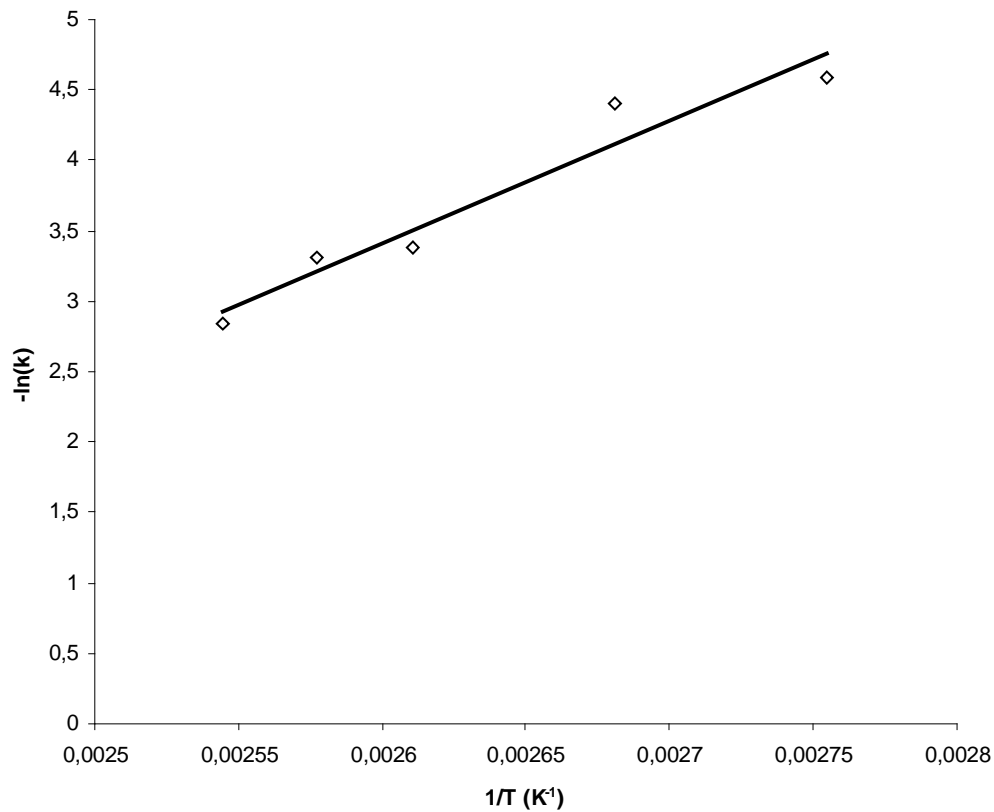
**Tabela 2.** Adequação dos modelos selecionados para representar a inativação térmica da bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0.

<b>Modelo (Equação)</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>CIA</b>	<b>Análise</b>
Primeira ordem (1)	[0.899;0.995]	[0.0006;0.0095]	[-31;-15]	Aceito;
Distribuição de Weibull (2)	[0.898;0.997]	[0.0002;0.012]	[-29;-11]	Baixo ajuste dos parâmetros dependentes da temperatura; rejeitado;
Ordem $n$ (3)	[0.47;0.99]	[0.0002;0.126]	[-32;37]	Baixos valores de $R^2$ e altos de CIA e $\chi^2$ ; rejeitado;
Duas frações (4)	[0.959;0.995]	[0.0006;0.0147]	[-24;24]	$k_L=k_S$ ; rejeitado;
Conversão fracionada (5)	[0.908;0.998]	[0.0002;0.014]	[-31;24]	Parâmetros estimados foram negativos; rejeitado

Os modelos que sugerem a existência uma fração lábil e resistentes também foram testados. Para equação de ordem  $n$  (Eq. (3)), o modelo não rendeu valores adequados de  $R^2$  em altas temperaturas, e os valores de CIA e  $\chi^2$  foram muito superiores em comparação com outros modelos (Tabela 2). Para o modelo de duas frações (Eq. (4)), os resultados mostraram que os parâmetros de taxa de inativação de ambas as frações foram iguais, indicando que a inativação da bacteriocina P34 ocorre em apenas uma etapa. Para a conversão fracionada (Eq. (5)), o modelo não pode explicar a inativação da bacteriocina P34, porque os valores das constantes obtidos na análise estatística foram negativos. Assim, este modelo foi rejeitado para a modelagem da inativação térmica do peptídeo.

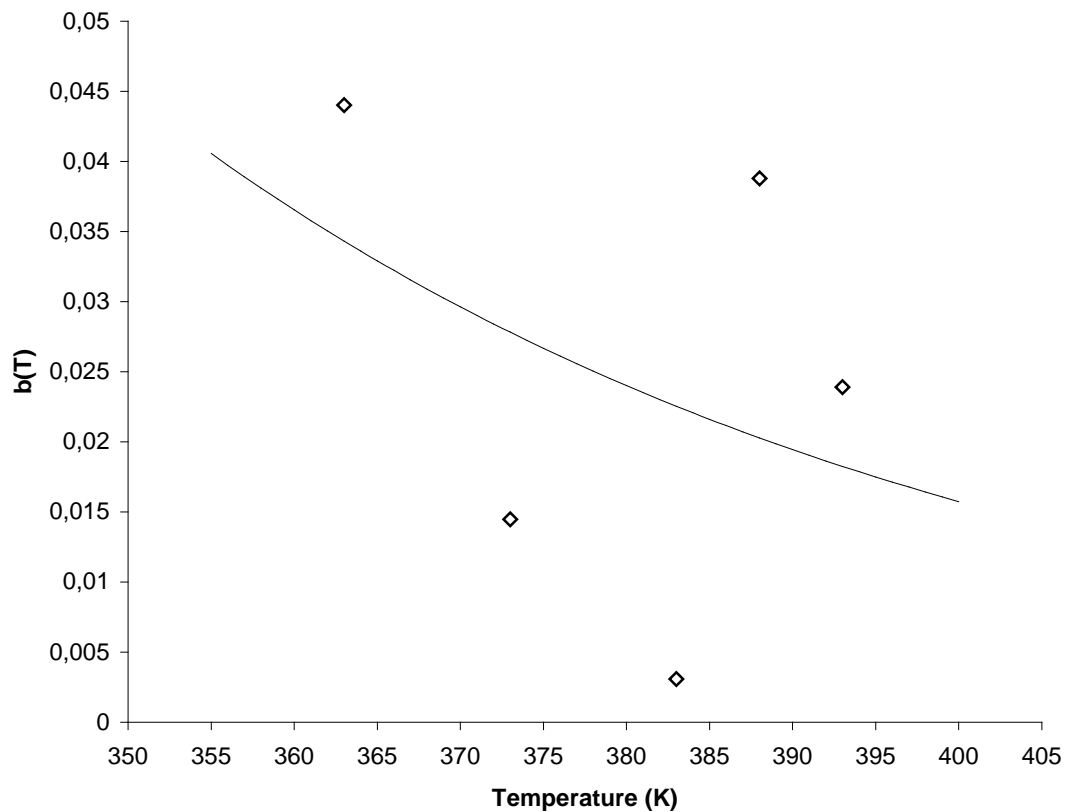
A validação da aplicabilidade e utilidade do modelo de distribuição de Weibull foram discutidos recentemente (PELEG e COLE, 1998; VAN BOEKEL, 2002; SHLEVIN *et al.*, 2003). Esse modelo tem sido proposto para explicar a inativação térmica de enzimas (SHALINI *et al.*, 2008) e microrganismos (CORRADINI e PELEG, 2007), por isso esse modelo foi avaliado para sua aplicabilidade aos dados experimentais de inativação do peptídeo P34. Modelos de reação de primeira ordem e de distribuição de Weibull renderam um bom ajuste para os dados, com valores de  $R^2$ ,  $\chi^2$  e valores CIA muito semelhantes. Os valores de  $R^2$  para o modelo de primeira ordem variaram de 0,899 a 0,995, enquanto a distribuição de Weibull os valores de  $R^2$  variaram entre 0,898 e 0,997. Valores de CIA para a reação de primeira ordem foram inferiores aos do padrão de Weibull, variando de -31 a -15 e -24 a -11, respectivamente. O  $\chi^2$  variou de 0,0006 e 0,0095 para o modelo de primeira ordem e entre 0,0002 to 0,012 para o padrão de Weibull, indicando um ajuste similar para ambos os modelos.

Os valores obtidos para os critérios analisados foram muito semelhantes para ambos os modelos, o que não permite escolher um deles para melhor representar a degradação térmica da bacteriocina P34. Assim, os parâmetros dependentes da temperatura obtidos para equação de primeira ordem (valores  $k$ ) e de distribuição de Weibull (valores  $b(T)$ ) foram ajustados aos modelos de Arrhenius (Eq. (6)) e log-logística (Eq. (7)). O  $R^2$  para a equação de Arrhenius forneceu um bom ajuste para os dados com valor de  $R^2$  de 0,94 (Figura 2).



**Figura 1.** Equação de Arrhenius para as constantes de inativação térmica da bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10mM pH 7,0. A equação de regressão foi definida como  $-\ln(k) = 191,135 + 8671,1T^{-1}$ ;  $R^2 = 0,938$ .

Para os parâmetros do modelo Weibull da equação log-logística obteve-se um valor muito baixo para  $R^2$  (0,10 para o modelo Weibull), conforme mostrado na Figura 3.



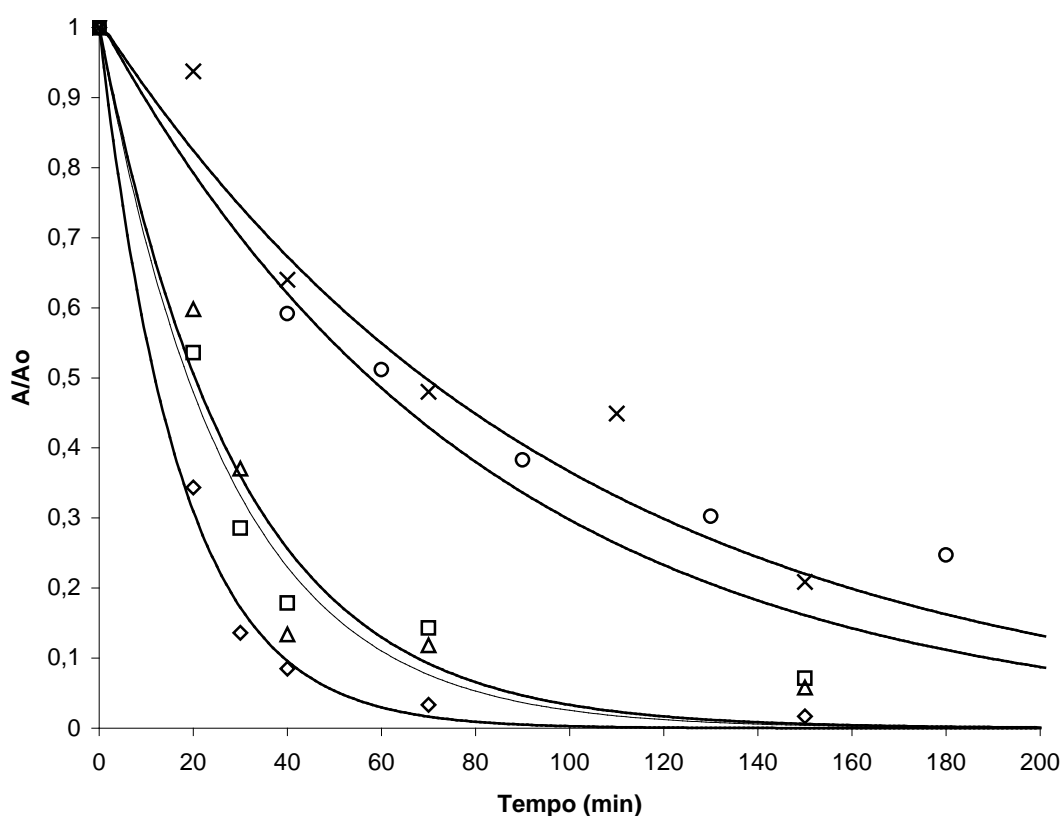
**Figura 2.** Dependência da distribuição de Weibull coeficiente b em função da função log-logística da bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10mM pH 7,0.. A equação de regressão foi determinada como  $b(T) = \log_e (1 + \exp(-0,02132 (T - 205,643)))$ ;  $R^2 = 0,10$ .

A falta ajuste para os dados experimentais padrão de Weibull indica que o modelo de primeira ordem é o modelo mais adequado para explicar a inativação térmica para a bacteriocina P34 nas condições estudadas.

## 5.2 Análise cinética de inativação térmica em solução tampão pH

7,0

Os resultados obtidos para inativação térmica de 90, 100, 110, 115 e 120 °C para a bacteriocina P34 em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 são mostrados na Figura 3. Um comportamento exponencial pode ser observado, e os dados experimentais se ajustam bem às curvas de tendência do modelo de primeira ordem. Como esperado, a atividade antimicrobiana diminuiu com o aumento do tempo de aquecimento, bem como em altas temperaturas.



**Figura 3.** Inativação térmica do peptídeo P34 a 90 (o), 100 (x), 110 (Δ), 115 (□), 120 °C Os desvios padrão foram sempre menores que 8%.

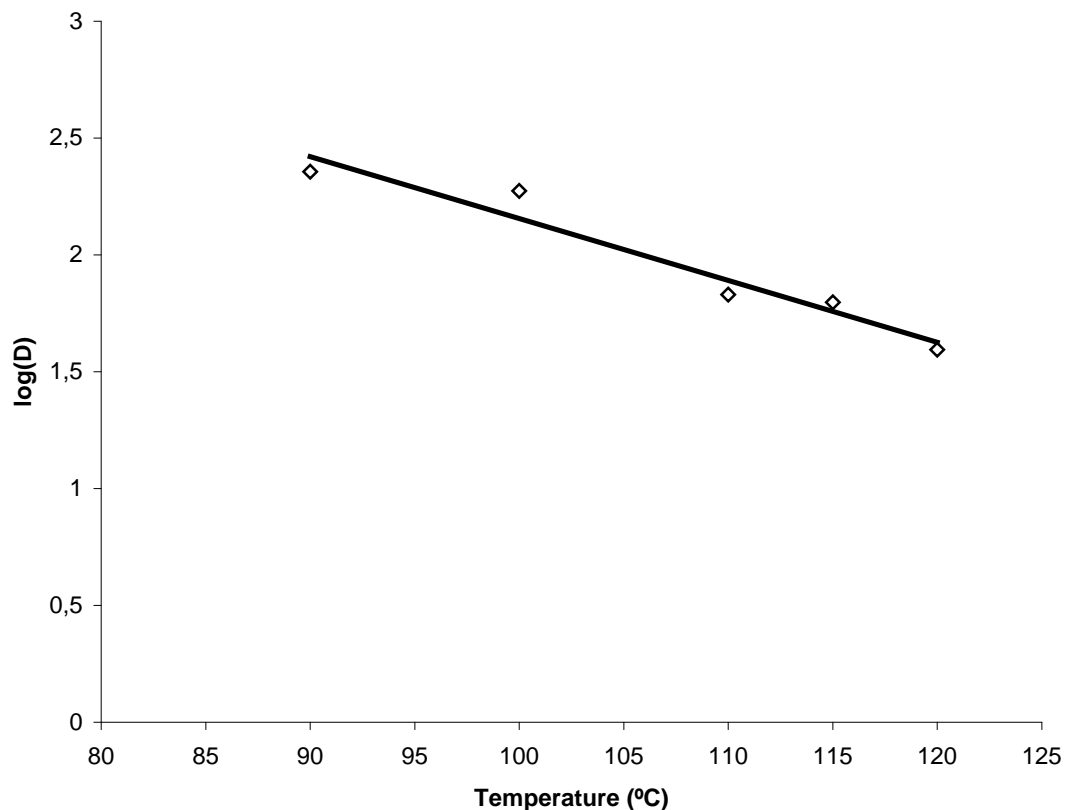
A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para valores  $k$ ,  $D$  e  $z$  para bacteriocina P34 para os tratamentos de calor entre 90 e 120 °C.

**Tabela 3.** Os parâmetros cinéticos de inativação térmica do peptídeo P34 em solução tampão fosfato 10mM pH 7,0.

Temperatura (°C)	$k$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_{1/2}$ (min)	$D$ (min)	$z$ (°C)
120	0,0586±0,001	0,9955	11,83	39,30	37,74
115	0,0368±0,002	0,9722	18,86	62,66	
110	0,0340±0,001	0,9595	20,37	67,66	
100	0,0123±0,001	0,8979	56,58	187,97	
90	0,0102±0,001	0,9583	68,29	226,86	

\*Desvio padrão de regressão (intervalo de confiança de 95%).

A constante da velocidade de inativação térmica aumenta com o aumento da temperatura. Os valores  $D$  diminuíram com o aumento da temperatura, indicando, como esperado, mais rápida inativação em temperaturas mais elevadas. Pode-se observar que os valores  $D$  estão entre 39 e 226 minutos para temperaturas entre 120 e 90 °C. O efeito da temperatura sobre os valores de  $D$  é mostrado na Figura 4, e o valor de  $z$  calculado para a faixa de temperatura estudada (90-120 °C) foi de aproximadamente 38 °C (Tabela 3).



**Figura 4.** Variação do tempo de redução decimal (D) em função da temperatura de inativação da bacteriocina P34.

O valor  $z$  para o peptídeo P34 em solução tampão fosfato 10mM pH 7,0 foi obtido pela análise do gráfico da Figura 4. Os valores  $z$  de degradação de nutrientes (25-45 °C) são geralmente maiores do que a inativação microbiana (7-12 °C) (AWUAH *et al.*, 2007). De fato, as diferenças entre os valores  $D$  e  $z$  de microorganismos e os nutrientes são exploradas para otimizar processos térmicos e pode ser analisado também para manter a atividade antimicrobiana após o tratamento. Valores  $D$  e  $z$  obtidos para bacteriocina P34 indicam que a bacteriocina pode ser utilizada em condições de pasteurização HTST (altas temperaturas por curtos tempos) ou mesmo em condições de esterilização de

alimentos enlatados, 121 °C por até 20 minutos (MONTEVILLE e MATTHEWS, 2008), mantendo parte de sua atividade antimicrobiana. Bacteriocina P34 pode ter ligações dissulfeto intramolecular na estrutura (MOTTA *et al.*, 2007a), o que está em concordância com o fato de ser um composto inibitório termoestável.

### **5.3 Análise cinética de inativação térmica em condições de estresse**

Aplicações biotecnológicas de proteínas bioativas são altamente dependentes de parâmetros tais como pH, concentração de sal e estabilidade térmica em altas temperaturas (BASU *et al.*, 2008; GOUDA *et al.*, 2003; SCHOKKER e VAN BOEKEL, 1999). Quando as células são expostas a uma combinação de fatores antimicrobianos, a intensidade do dano pode ser maior, dado que alguns dos fatores antimicrobianos podem atuar no mesmo alvo celular. A reparação de danos múltiplos também pode exigir custos de energia muito maior, levando ao esgotamento de energia e morte celular. Portanto, as probabilidades de sobrevivência e proliferação de células confrontadas com obstáculos múltiplos são muito baixas. Além disso, a sinergia entre os diferentes fatores antimicrobianos pode permitir o uso de doses mais baixas em relação à sua aplicação individual (GALVÉZ *et al.*, 2007). Vessoni Penna e Moraes (2002) verificaram que o valor de *D* de *Bacillus cereus* em leite foi reduzida na presença de nisina em até 40% a temperaturas na faixa de 80-100 °C. Neste sentido, técnicas combinadas para reduzir a aplicação de calor em alimentos vêm ganhando maior atenção. Bacteriocinas têm sido utilizadas em tecnologia de obstáculos, que combina diferentes métodos para inibir o crescimento microbiano (CLEVELAND *et al.*, 2001).



A combinação da bacteriocina P34 com outros obstáculos, tais como adição de sal, tratamento térmico e diminuição de pH deve receber destaque a ser adotado como alternativa para conservação de alimentos com redução de perdas de fatores de qualidade. Portanto, a estimativa dos parâmetros cinéticos e da influência de aditivos, tais como redução de pH e adição de sal, ajudam a compreender o seu comportamento durante o processamento térmico, que é muito importante para a sua aplicação na indústria de alimentos.

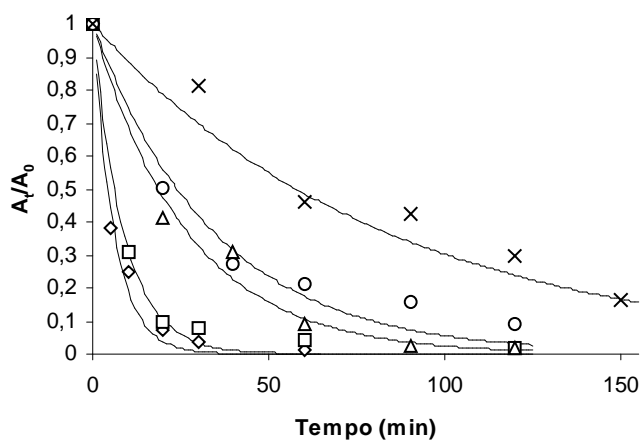
Com isso, a influência da redução do pH e da adição cloreto de sódio (NaCl) na cinética de inativação térmica do peptídeo P34 também foi avaliada. Alíquotas da bacteriocina P34 em pH 4,5 e 6,0 ou com adição de 1% e 5% de sal (em pH 7,0) foram tratadas termicamente por até 300 minutos em temperatura entre 90 a 120 °C e a atividade residual foi determinada.

Foram realizados testes controle dos meios, como descrito na seção 3.3, sem a presença do peptídeo P34, para averiguar se a inibição da cultura indicadora não seria devido ao baixo pH do meio ou à presença de NaCl. Não foi verificada atividade antimicrobiana pelos controles (dados não mostrados), indicando que os halos de inibição dos testes com o peptídeo P34 foram devido à presença da bacteriocina.

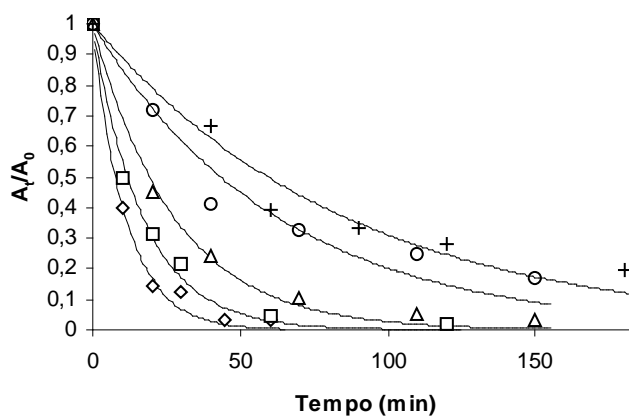
Também foram realizados testes controle dos grupos de experimento em temperatura ambiente, para verificar se a perda de atividade antimicrobiana do peptídeo P34 não seria afetada pelo seu tempo de exposição ao meio modificado. Não foi verificada perda atividade antimicrobiana pelos controles (dados não mostrados), indicando que a inativação da bacteriocina foi devido a sua exposição ao calor.

A inativação da atividade antimicrobiana do peptídeo P34 em meio modificado (ácido ou em presença de NaCl) apresentou comportamento exponencial, como mostrado na Figura 5 e ainda mostrou bom ajuste à equação de primeira ordem como mostram os valores de  $R^2$  mostrados na Tabela 4. Nesta Figura, os símbolos referem-se à média dos valores experimentais, enquanto que as linhas correspondem aos valores experimentais ajustados a Eq. (1).

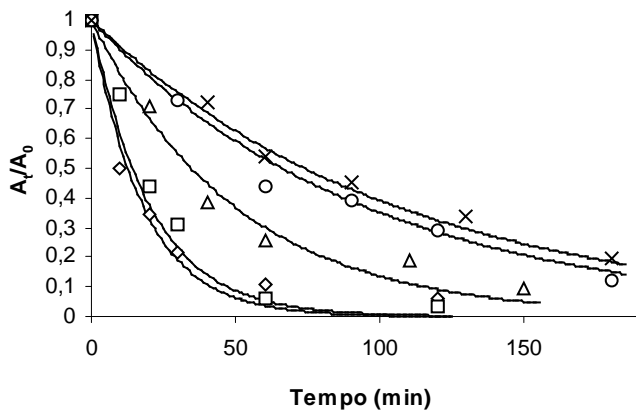
A



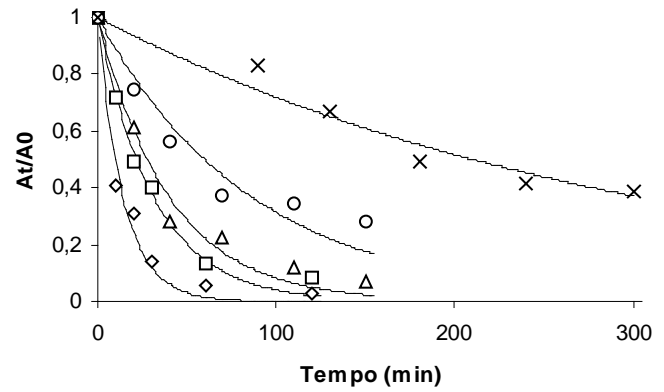
B



C



D



**Figura 5.** Inativação térmica da bacteriocina P34 modelada pela equação de reação de primeira ordem a 90 (x), 100 (o), 110 (Δ), 115 (□), 120 °C (◇). (A) em pH 4,5, 0% de NaCl, (B) em pH 6,0, 0% de NaCl, (C) em pH 7,0 e 1% de NaCl, (D) em pH 7,0, 5% de NaCl.

Como esperado, a taxa de inativação da atividade antimicrobiana aumentou com o tempo de aquecimento. Os parâmetros cinéticos de inativação térmica do peptídeo P34 em diferentes condições de estresse estão mostrados na Tabela 4.

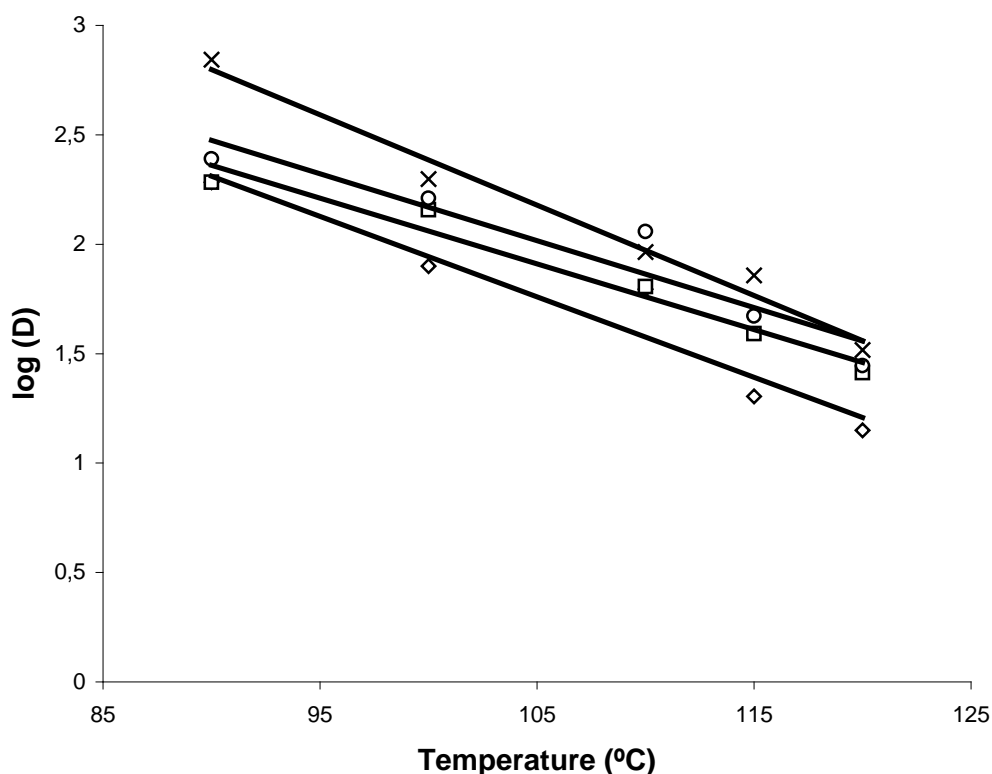
**Tabela 4.** Parâmetros cinéticos de inativação térmica da bacteriocina P34 em diferentes condições de pH e de sal.

pH	NaCl (%)	T (°C)	$k^*$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_{1/2}$ (min)	$D$ (min)	$z$ (°C)
7,0	0,0	120	0,0586±0,001 <sup>a</sup>	0,996	11,83	39,30	37,74
		115	0,0368±0,002 <sup>a</sup>	0,972	18,86	62,66	
		110	0,0340±0,001 <sup>a</sup>	0,959	20,37	67,66	
		100	0,0123±0,001 <sup>a</sup>	0,898	56,58	187,97	
		90	0,0102±0,001 <sup>a</sup>	0,958	68,29	226,86	
	1,0	120	0,0825±0,002 <sup>b</sup>	0,992	8,40	27,91	37,31
		115	0,0489±0,003 <sup>b</sup>	0,990	14,18	47,09	
		110	0,0200±0,002 <sup>b</sup>	0,972	34,37	114,18	
		100	0,0105±0,001 <sup>a</sup>	0,905	48,82	162,18	
		90	0,0094±0,001 <sup>a</sup>	0,979	73,89	245,45	
	5,0	120	0,0700±0,005 <sup>ab</sup>	0,977	9,90	32,89	24,20
		115	0,0320±0,001 <sup>a</sup>	0,991	21,66	71,96	
		110	0,0250±0,005 <sup>bc</sup>	0,976	27,73	92,10	
		100	0,0116±0,004 <sup>ab</sup>	0,932	59,75	198,50	
		90	0,0033±0,004 <sup>b</sup>	0,958	210,05	697,75	
6,0	0,0	120	0,0895±0,002 <sup>b</sup>	0,993	7,79	25,87	33,33
		115	0,0589±0,011 <sup>b</sup>	0,991	11,75	39,03	
		110	0,0363±0,010 <sup>ac</sup>	0,994	19,25	63,96	
		100	0,0160±0,001 <sup>ac</sup>	0,952	43,32	143,91	
		90	0,0117±0,002 <sup>a</sup>	0,956	57,86	191,01	
4,5		120	0,1632±0,001 <sup>c</sup>	0,988	4,25	14,13	27,17
		115	0,1137±0,003 <sup>c</sup>	0,994	6,08	20,20	
		110	0,0372±0,001 <sup>c</sup>	0,984	18,73	62,23	
		100	0,0290±0,002 <sup>c</sup>	0,970	23,90	79,40	
		90	0,0120±0,007 <sup>a</sup>	0,897	57,52	192,05	

\*Desvio padrão de regressão (intervalo de confiança de 95%).

<sup>a,b,c</sup> diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para cada temperatura entre os grupos de experimento.

O efeito da temperatura sobre os valores de  $D$  é mostrado na Figura 6, da qual foram calculados os valores  $z$  para a faixa de temperatura estudada (90-120 °C) e mostrados na Tabela 4.



**Figura 6.** Variação do tempo de redução decimal ( $D$ ) em função da temperatura para inativação da bacteriocina P34. (◇) em pH 4,5, 0% de NaCl; (□) em pH 6,0, 0% de NaCl; (o) em pH 7,0, 1% de NaCl; (x) at pH 7,0, 5% de NaCl.

Os resultados para pH 7,0 sem adição de sal são os mesmos mostrados na Tabela 3. Os resultados para a combinação da bacteriocina P34 com salinização e acidificação e processamento térmico mostram que em menores valores de pH menor foi a estabilidade da bacteriocina. Em pH 4,5 os valores  $k$  são maiores significativamente ( $p < 0,05$ ) para a faixa de temperatura 120-100

°C, em relação ao seu comportamento em solução tampão pH 7,0. Para os experimentos com pH 6,0, a inativação foi mais rápida de forma significativa ( $p < 0,05$ ) para as temperaturas 120 e 115°C, em relação ao seu comportamento em solução tampão pH 7,0.

Os valores  $k$  em pH 4,5 variaram entre 0,163 e 0,012  $\text{min}^{-1}$  e em pH 6,0 que variaram entre 0,089 e 0,012  $\text{min}^{-1}$ . Os valores  $D$  em pH 4,5 variaram de 14 a 191 minutos, enquanto em pH 6,0 o parâmetro cinético variou entre 26 e 192 minutos. Estes valores são inferiores aos encontrados em pH 7,0, o qual variou 39-226 min e 0,0586-0,0102  $\text{min}^{-1}$  para valores  $D$  e  $k$ , respectivamente. Os resultados sugerem que o meio ácido altera a molécula do peptídeo tornando-o mais suscetível à inativação quando em presença de altas temperaturas.

A termoestabilidade do peptídeo P34 diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) devido à adição de 1% cloreto de sódio nas duas maiores temperaturas estudadas e aumentou a estabilidade ( $p < 0,05$ ) a 110 °C. A meia-vida da bacteriocina diminuiu 3,4 minutos com a adição de 1% de sal a 120 °C (em comparação à solução tampão pH 7,0 sem adição de NaCl). A 115 °C o valor  $D$  diminuiu de 62,66 minutos para 47,09 minutos. Este fato concorda com o descrito por Lee e colaboradores (1993), pois cloreto de sódio pode induzir mudanças conformacionais de bacteriocinas, facilitando a inativação do peptídeo devido ao tratamento térmico.

Evento similar aconteceu com a adição de 5% de cloreto de sódio ao peptídeo P34 em pH 7,0. Para as temperaturas 110 e 90 °C o peptídeo teve sua estabilidade térmica aumentada ( $p < 0,05$ ) em comparação ao experimento

sem sal. Para as demais temperaturas não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao teste padrão (sem adição de sal). Os valores  $k$  variaram de 0,07 a 0,0033  $\text{min}^{-1}$ , enquanto os tempos de meia-vida variaram de 9,90 a 210 minutos.

O valor  $z$  diminuiu 11,7% quando o pH foi reduzido de 7,0 para 6,0, e diminuiu em 28% quando o pH foi reduzido para 4,5. A adição desta quantidade de sal diminuiu o valor  $z$  de 37,74 °C para 37,1 °C.

A atividade da nisina foi antagonizada pela baixa concentração de NaCl (BOUTTEFROY *et al.*, 2000). A adição de NaCl também diminuiu a atividade antilisterial de acidocina (a 10-20  $\text{g l}^{-1}$ ; CHUMCHALOVÁ *et al.*, 1998), actocina (entre 50-70  $\text{g l}^{-1}$ ; VIGNOLO *et al.*, 1998), leucocina (a 25  $\text{g l}^{-1}$  NaCl; HORNBAEK *et al.*, 2006), e pediocina (menos 65  $\text{g l}^{-1}$  NaCl; JYDEGAARD *et al.*, 2000).

A 90 °C a adição de 5% de NaCl aumentou significativamente a estabilidade do peptídeo P34. O efeito protetor do cloreto de sódio pode ser devido à interferência de interações iônicas entre as moléculas da bacteriocina (BHUNIA *et al.*, 1991; THOMAS e WIMPENNY, 1996). Assim como para os experimentos com diminuição de pH, o valor  $z$  da bacteriocina diminuiu com a adição de 5% de cloreto de sódio. O valor  $z$  diminuiu de 37,74 para 24,2 °C devido à adição de 5% de cloreto de sódio.

Maiores valores de redução decimal foram encontrados para inativação térmica de lisozima com concentrações crescentes de cloreto de sódio. A análise calorimetria diferencial de desnaturação de lisozima indicaram maior estabilidade térmica da substância com cloreto de sódio em concentrações de

0,1 M à 1,0 mol l<sup>-1</sup>, sugerindo que interações hidrofóbicas contribuem para uma maior estabilidade (MYERS, 1990; MAKKI e DURANCE, 1996).

O que foi verificado neste trabalho é que a presença de cloreto de sódio torna o peptídeo menos estável em altas temperaturas de processamento, e aumenta sua estabilidade em temperaturas mais baixas. Em meios acidificados, o peptídeo P34 também tem diminuído sua resistência térmica. Isso ocorre, possivelmente, devido à mudança na conformação da molécula que as condições de estresse podem gerar na sua estrutura. Porém, em ambos os casos, os dados cinéticos da bacteriocina indicam que ela pode ser utilizada em condições de pasteurização e esterilização, mantendo parte de sua atividade antimicrobiana após o tratamento térmico.

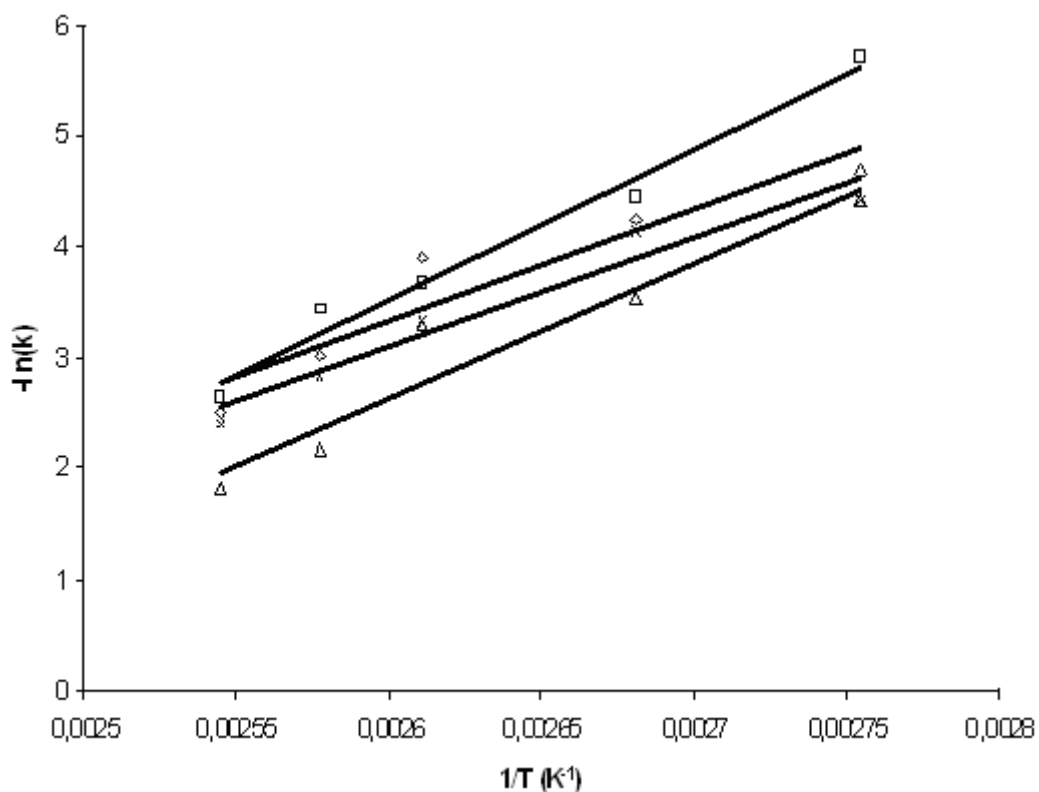
#### **5.4 Análise termodinâmica de inativação térmica em diferentes condições**

Para determinar o potencial industrial de bacteriocinas, é essencial para compreender as suas relações de estabilidade da estrutura. Portanto, a estimativa dos parâmetros termodinâmicos ajuda a compreender o mecanismo provável de desnaturação, que é muito importante nos processos que utilizam calor.

A representação do logaritmo da taxa de inativação contra o recíproco da temperatura permite calcular a energia de ativação ( $E_a$ ), comparando a equação dos dados experimentais com a equação de Arrhenius (Eq. (3)). Com isso, a partir da Figura 7, foi possível obter os valores de  $E_a$  para cada condição em que foi estudada a inativação da bacteriocina P34. O valor da  $E_a$



para o peptídeo P34 em solução tampão 10 mM pH 7,0 foi obtido pela análise de regressão da Figura 2.



**Figure 7.** Gráfico da plotagem das constantes de inativação em função da temperatura de para a equação de para a bacteriocina P34. ( $\Delta$ ) em pH 4,5 com 0% NaCl; (x) em 6,0 com 0% NaCl; ( $\diamond$ ) em pH 7,0, com 1% de NaCl; ( $\square$ ) em pH 7,0 com 5% de NaCl.

Valores de  $E_a$  para a bacteriocina P34 em diferentes condições de pH e de concentração salina são mostrados na Tabela 5. A energia de ativação pode ser vista como a barreira de energia que as moléculas precisam atravessar a fim de poder reagir. A proporção de moléculas capazes de reagir aumenta com a temperatura, o que explica qualitativamente o efeito da temperatura sobre as taxas de inativação (VAN BOEKEL, 2008). Para bacteriocina P34 em solução

tampão fosfato 10 mM pH 7,0 foi necessária a absorção 72 kJ do meio externo para iniciar sua inativação em temperaturas entre 90 e 120 °C. Cereína 8A, uma bacteriocina relativamente termoestável, necessitou de 105,7 kJ para começar a sua inativação em uma faixa de temperatura entre 70-82 °C (LAPPE *et al.*, 2009b).

**Tabela 5.** Valores de energia de ativação ( $E_a$ ) térmica da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 em diferentes condições de solução.

NaCl (%)	pH	$E_a$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
0,0	4,5	100,00
	6,0	81,48
	7,0	
1,0		82,78
5,0		112,72

A  $E_a$  aumentou com a redução do pH da solução. A  $E_a$  para a bacteriocina em pH neutro foi de 72,00 kJ mol<sup>-1</sup>, 81,48 kJ mol<sup>-1</sup> em pH 6,0 e 100,00 kJ mol<sup>-1</sup> a 4,5. Bacteriocina P34 na presença de 1% de cloreto de sódio apresentou uma energia de ativação de 82,78 kJ mol<sup>-1</sup> e aumentou para 112,72 kJ mol<sup>-1</sup> quando a concentração salina foi elevada para 5%. Isso sugere que para a inativação da bacteriocina, a substância antimicrobiana necessita absorção de menos energia para iniciar sua inativação em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Uma alta energia de ativação indica forte dependência da temperatura, e que a reação acontece de forma muito lenta em baixas temperaturas, mas relativamente rápida em altas temperaturas (VAN BOEKEL, 2008).

Inativação é conhecida por ser um processo em que a estrutura secundária, terciária ou quaternária de uma proteína é alterada sem romper ligações covalentes (NAIDU e PANDA, 2003). As mudanças na entalpia e entropia, para a inativação térmica de bacteriocina P34 em diferentes condições de solução, que foram calculadas utilizando a teoria de transição de estado, e são apresentados na Tabela 6.

Como a  $\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta S^\ddagger$  são variações de entalpia e entropia de inativação, respectivamente, esses parâmetros também fornecem uma medida do número de ligações não covalentes rompidas e a desordem associada a formação do estado de transição da proteína (ORTEGA *et al.*, 2004).

**Tabela 6.** Valores dos parâmetros termodinâmicos de inativação térmica da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 em diferentes condições.

NaCl (%)	pH	Temperatura (K)	$\Delta H^\#$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\#$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\#$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
0,0	4,5	393	96,74	103,04	-16,04
		388	96,78	102,84	-15,62
		383	96,82	105,06	-21,50
		373	96,90	102,99	-16,31
		363	96,99	102,80	-16,03
	6,0	393	78,21	105,02	-68,20
		388	78,26	104,96	-68,84
		383	78,30	105,14	-70,09
		373	78,38	104,83	-70,91
		363	78,46	102,80	-67,06
	7,0	393	68,82	106,43	-95,69
		388	68,87	106,54	-97,10
		383	68,91	105,37	-95,21
		373	68,99	105,71	-98,44
		363	69,07	103,36	-94,45
1,0	7,0	393	69,36	106,56	-94,66
		388	69,41	106,35	-95,21
		383	69,45	107,01	-98,08
		373	69,53	106,13	-98,13
		363	69,61	103,54	-93,46
5,0	7,0	393	109,45	105,80	9,29
		388	109,49	106,94	6,59
		383	109,53	106,30	8,44
		373	109,62	105,83	10,16
		363	109,70	106,70	8,27

Os valores de  $\Delta G^\#$  de inativação para todas as condições testadas na solução da bacteriocina, mostradas na tabela 5, são bastante próximos e da ordem de grandeza esperada para a desnaturação de proteína (BUSTO *et al.*, 1999; ORTEGA *et al.*, 2004). O desdobramento da molécula do peptídeo P34 parece ser um passo determinante para a inativação térmica irreversível nas condições testadas.

Valores termodinâmicos em pequenos intervalos de temperaturas são de difícil análise. A redução de pH aumentou os valores de  $\Delta S^\#$  e  $\Delta H^\#$  para a análise da mesma temperatura (Tabela 6). A 120 °C,  $\Delta S^\#$  para a bacteriocina P34 em pH 7,0 foi de  $-95,69 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  e ocorreu um aumento para  $-68,20 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  e  $-16,04 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  quando o pH foi reduzido para 6,0 e 4,5, respectivamente. Já a 100 °C, por exemplo, os valores de  $\Delta H^\#$  aumentaram quando o pH da solução foi reduzido, variando de  $68,99 \text{ kJ mol}^{-1}$  em pH 7,0,  $78,38 \text{ kJ mol}^{-1}$  em pH 6,0 e  $96,90 \text{ kJ mol}^{-1}$  em pH 4,5.

Tem sido relatado que a o desdobramento de enzimas pode ser confirmado por um aumento da entropia ou desordem de inativação. O aumento na  $\Delta S^\#$  indica também um aumento no número de moléculas da bacteriocina P34 no estado de transição, o que também resulta em menores valores de  $\Delta G^\#$  (USTOK *et al.*, 2009). Em geral, a entropia de ativação tem um papel dominante na inativação térmica de proteínas em soluções aquosas (BROMBERG *et al.*, 2008).

Os valores negativos de  $\Delta S^\#$  podem ser explicados pela possível agregação parcial da molécula desdobrada, a qual predomina durante a exposição da proteína a altas temperaturas (DANNENBERG e KESSLER,

1988). Em um estudo realizado por Bhatti *et al.* (2006) foi observado que a abertura da estrutura da enzima invertase produzida por *Fusarium solani* foi confirmada pelo aumento da entropia ou da desordem de inativação.

A desnaturação de proteínas como a albumina do ovo de galinha (NOHARA *et al.*, 1999) e lactoglobulina de leite em baixas temperaturas e na presença de uréia (ADAMS, 1991) mostra uma  $\Delta S^\ddagger$  negativa, visto que o arranjo das moléculas da água aumenta nas proximidades dos resíduos de aminoácidos apolares, que são expostos durante seu desdobramento (TAMS e WELINDER, 1998). Este arranjo da água em torno de resíduos hidrofóbicos é interrompido em temperaturas mais elevadas (THONGSOOK e BARRETT, 2005).

Os alimentos são instáveis, do ponto de vista termodinâmico, o que significa que eles têm a tendência a mudar a partir de um estado de baixa entropia e alta entalpia para o estado de alta entropia e baixa entalpia (VAN BOEKEL, 2008). A desnaturação protéica é acompanhada pela ruptura de muitas ligações não-covalentes relativamente fracas que forma a estrutura dobrada e resulta em um sistema menos organizado. O aumento da entropia de ativação compensa a alta barreira de inativação, o que faz com que a energia livre de Gibbs seja suficientemente baixa e o processo de inativação ocorra relativamente rápido (BROMBERG *et al.*, 2008).

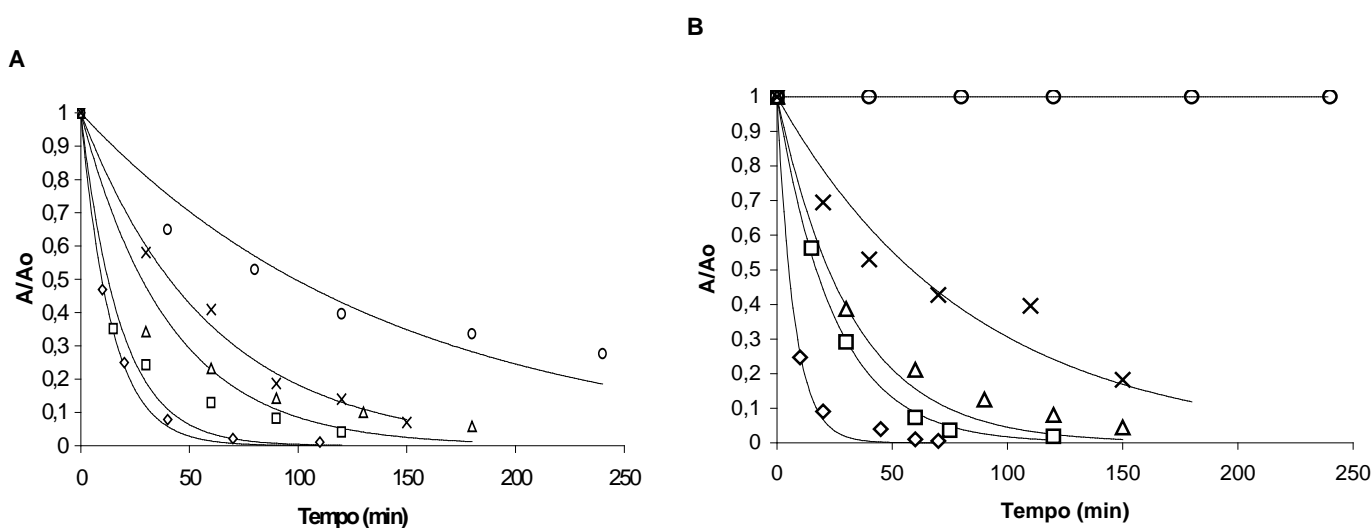
### **5.5 Análise cinética e termodinâmica de inativação térmica em leite**

Modelos adequados de cinética de destruição térmica são essenciais para a concepção de novos processos assumindo um alimento seguro com

máxima retenção de fatores de qualidade (LENZ e LUND, 1980; VAN BOEKEL, 1996). O conhecimento sobre a cinética de inativação térmica de peptídeos antimicrobianos em sistemas alimentares é um passo essencial para atingir este objetivo.

Neste sentido, foi avaliada a estabilidade térmica do peptídeo P34 em leite desnatado e integral. Para isso, ao peptídeo P34 em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 foram adicionados 0,1 mg ml<sup>-1</sup> de leite em pó desnatado ou integral.

O comportamento da atividade antimicrobiana residual em função do tempo de processamento térmico está mostrado na Figura 8, para o leite em pó desnatado (A) e integral (B).



**Figura 8.** Atividades residuais da bacteriocina P34 modelada pela equação de reação de primeira ordem a 90 (o), 100 (x), 110 (Δ), 115 (□), 120 °C (◇). (A) leite desnatado em pó; (B) de leite integral em pó. Os desvios padrão foram sempre menores que 6%.

A inibição do peptídeo P34 em leite segue uma reação de primeira ordem como mostra os valores de  $R^2$  da Tabela 7 e a Figura 8. Os dados em tampão são os mesmos mostrados na Tabela 3.

Nos testes de estabilidade térmica do peptídeo P34 em leite houve escurecimento visual do meio, indicando a formação de produtos da reação de Maillard (PRM) durante o experimento, visto a presença de açúcares redutores e aminoácidos no meio. Os PRM possuem atividade antimicrobiana (EINARSON, 1987; RURIÁN-HENARES e MORALES, 2008). Com isso, foram realizados testes controle de atividade antimicrobiana, como descritos na seção 3.3, dos leites sem a presença do peptídeo P34, após processamento térmico. Não foi verificada atividade antimicrobiana pelos controles, indicando que os halos de inibição dos testes com o peptídeo P34 foram devido à presença da bacteriocina (dados não mostrados).

Em temperatura ambiente, não foi verificada a perda de atividade do peptídeo P34 durante o tempo de experimento (3 horas) para ambos os leites testados (dados não mostrados). Com isso a inibição da bacteriocina acontece devido ao tratamento térmico aplicado nos testes.



**Tabela 7.** Parâmetros cinéticos de inibição do peptídeo P34 em leite desnatado e integral.

Meio	T (°C)	R <sup>2</sup>	k* (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)	D (min)	z (°C)
Tampão	120	0,996	0,0586±0,001 <sup>a</sup>	11,83	39,29	37,74
	115	0,972	0,0368±0,002 <sup>a</sup>	18,84	62,57	
	110	0,959	0,0340±0,001 <sup>a</sup>	20,39	67,72	
	100	0,898	0,0123±0,001 <sup>a</sup>	56,35	187,20	
	90	0,958	0,0102±0,001 <sup>a</sup>	67,96	225,74	
Leite Desnatado	120	0,998	0,0714±0,003 <sup>b</sup>	9,71	32,26	30,21
	115	0,959	0,0405±0,001 <sup>b</sup>	12,54	41,67	
	110	0,963	0,0276±0,007 <sup>a</sup>	28,15	93,52	
	100	0,994	0,0170±0,001 <sup>a</sup>	40,80	135,53	
	90	0,93	0,0070±0,003 <sup>a</sup>	98,66	327,72	
Leite Integral	120	0,997	0,1346±0,030 <sup>c</sup>	5,15	17,11	20,49
	115	0,999	0,0553±0,001 <sup>c</sup>	17,09	56,77	
	110	0,92	0,0329±0,002 <sup>a</sup>	21,04	69,88	
	100	0,917	0,0119±0,007 <sup>a</sup>	58,51	194,38	
	90	0,999	0,0000	α	α	

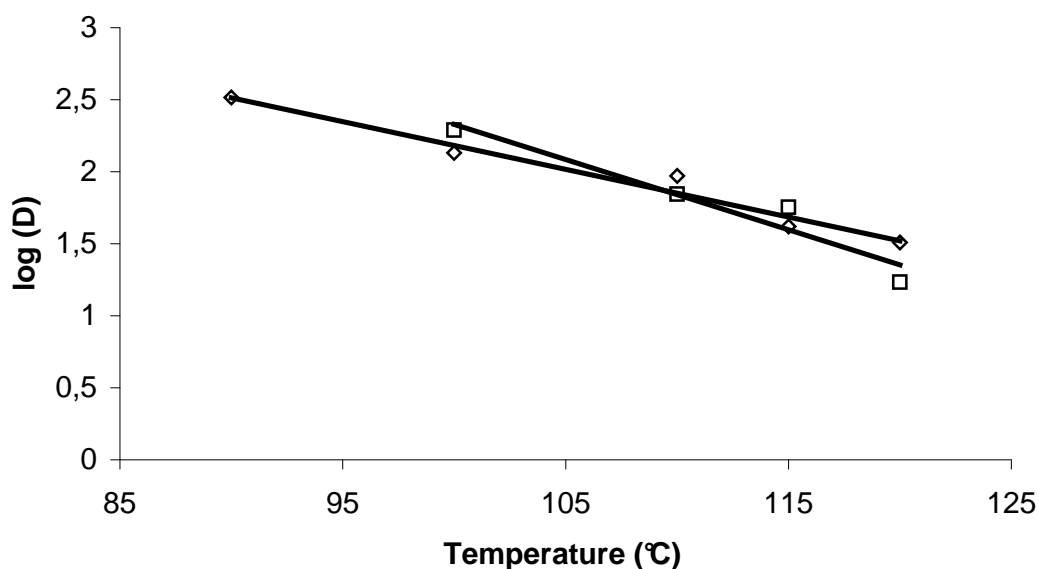
\*Desvio padrão de regressão (intervalo de confiança de 95%).

<sup>a,b,c</sup> difetença significativa ( $p < 0,05$ ) para cada temperatura entre os grupos de experimento.

A 120, 115 e 100 °C, em presença de sólidos lácteos não-godurosos, a bacteriocina P34 foi inibida mais rapidamente ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao seu comportamento somente em solução tampão. Os valores *D* diminuíram com o aumento da temperatura, como esperado, variando de 32 a 328 minutos. O valor *z* calculado a partir da Figura 9 foi de 30,21 °C. A diminuição da estabilidade é devida, provavelmente, a, além da sua inativação devido à ação do calor, a sua reação com açúcares presentes no leite através da reação de Maillard, aumentando a inibição da atividade antimicrobiana. Com isso,

possivelmente a inibição da bacteriocina foi mais rápida devido a ambos acontecimentos no sistema.

Para os testes realizados com leite integral para as duas temperaturas mais elevadas testadas, o peptídeo P34 foi inibido mais rapidamente ( $p < 0,05$ ) em comparação aos testes realizados em leite desnatado. Os valores de meia-vida variaram entre 9,71 a 58,51 minutos na faixa de temperatura de 120-100 °C. O valor z calculado foi de 20,5 °C.



**Figura 9.** Variação do tempo de redução decimal ( $D$ ) em função da temperatura para inativação da bacteriocina P34. (◇) em leite desnatado; (□) em leite integral.

A análise da Figura 9 e da Figura 10 (adequação dos valores de  $\ln(k)$  em função da temperatura pela equação de Arrhenius) permite verificar que há a inversão da estabilidade do peptídeo P34 nos diferentes leites em temperatura ao redor de 110 °C. Entre 120 e 110 °C o peptídeo é inibido mais

rapidamente em leite integral do que em leite desnatado. Porém entre 110 e 90 °C, em leite integral, a bacteriocina tem sua estabilidade aumentada. Isto sugere que, em processamento a 90 °C, a presença de gordura teve efeito protetor, mantendo 100% da atividade residual da bacteriocina.

Os glóbulos de gordura no leite são cercados por uma complexa membrana, que apresenta várias camadas distintas que são estabelecidas durante sua síntese na célula mamária. Esta membrana é comumente referida como membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL). A membrana consiste de misturas complexas de proteínas, fosfolipídios, glicoproteínas, triglicérides, colesterol e outros componentes de menor importância, sendo bastante afetada pelo processamento do leite como, por exemplo, aquecimento, resfriamento, homogeneização, a evaporação (MCPHERSON e KITCHEN, 1983; WALSTRA, 1995; EVERS, 2004; SINGH, 2006).

Tem sido reportada a influência de temperatura na adsorção de proteínas do leite à MGGL (YE *et al.*, 2004). Porém, o mecanismo exato como as proteínas interagem com a MGGL não está completamente claro, podendo ser devido à quebra da MGGL durante o aquecimento, deixando aberturas através das quais as proteínas podem ser adsorvidas pela gordura exposta (DALGLEISH e BANKS, 1991). Recentemente, Ye e colaboradores (2004) verificaram que a adsorção dessas proteínas com os glóbulos de gordura do leite aumenta com o aumento da temperatura e do tempo de processamento na faixa de temperatura estudada (65-95 °C).

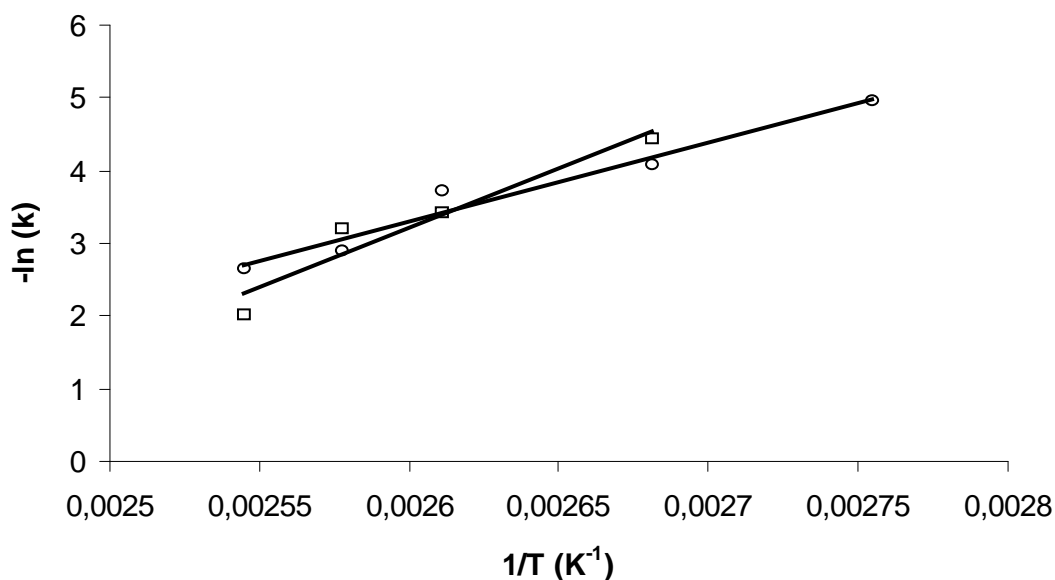
As bacteriocinas podem ser adsorvidas pela matriz gordurosa de alimentos, inibindo sua atividade antimicrobiana (DAESCHEL, 1993; MURRAY e RICHARD, 1997; GÄNZLE *et al.*, 1999; AASEN *et al.*, 2003). Em temperaturas na faixa de 120-115 °C, o peptídeo P34 em leite integral perdeu mais rapidamente ( $p < 0,05$ ) sua atividade antimicrobiana quando comparada ao seu comportamento de inibição em leite desnatado. Em altas temperaturas, possivelmente, houve ampla dissociação da MGGL, expondo grande parte da porção lipídica do glóbulo de gordura, aumentando a interação do peptídeo à gordura e conseqüentemente acelerando a inibição da sua atividade antimicrobiana. Em menores temperaturas de processamento, os resultados sugerem que a MGGL não sofreu dissociação suficiente para que a gordura fosse exposta ao peptídeo P34 para inibir sua atividade biológica.

No presente trabalho não foi observado a perda de atividade do peptídeo P34 em leite integral a 90 °C. Como houve perda de atividade contínua do peptídeo em leite desnatado a 90 °C, os dados indicam que a gordura protege o peptídeo da ação do calor. Com isso, os dados sugerem que houve pequena dissociação da MGGL, insuficiente para a exposição da fração lipídica à bacteriocina, não havendo interação entre elas e conseqüentemente não inibindo a atividade antimicrobiana do peptídeo P34.

Os resultados ainda sugerem que a 90 °C a gordura do leite protege a bacteriocina P34 tanto da sua inativação térmica quanto da sua reação com açúcares do leite, evitando a formação de reação de Maillard (PRM). A presença de glóbulos de gordura no leite retarda a formação de PRM, devido ao isolamento térmico conferido pelo componente lipídico e conseqüentemente

menor transferência de calor no meio (PELLEGRINO, 1994; VAN BOEKEL, 1998).

Os dados experimentais mostram que as constantes de inativação se relacionam com a temperatura de processo de forma satisfatória através da equação de Arrhenius (Figura 10). A partir da análise desse gráfico é possível o cálculo das  $E_a$  de inibição do peptídeo P34 em leite integral e desnatado, e com esses dados seus parâmetros termodinâmicos em ambos tipos de leite.



**Figura 10.** Variação das constantes de inativação em função da temperatura da bacteriocina P34 segundo a equação de Arrhenius. (o) em leite desnatado; (□) em leite integral.

Para bacteriocina P34 em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0 foi necessária a absorção 72 kJ do meio externo para iniciar sua inativação em temperaturas entre 90 e 120 °C. Em leite desnatado a energia foi aumentada para 90 kJ e em leite integral para 136 kJ. Isso sugere que para a inibição da

bacteriocina, o peptídeo necessita absorção de menos energia para começar sua inativação em solução tampão, apesar de sua estabilidade ser maior. Em presença de sólidos lácteos, a bacteriocina P34 necessita absorver mais energia para iniciar sua reação, porém é inibida mais rapidamente. Acontecimento similar foi verificado para os testes realizados com a redução do pH do meio de inativação.

A Tabela 8 mostra os parâmetros termodinâmicos de inativação térmica do peptídeo antimicrobiano em leite desnatado e integral. Os resultados para os parâmetros termodinâmicos em tampão são os mesmos mostrados na Tabela 6. Tanto em leite desnatado quanto no integral houve aumento nos valores de  $\Delta H^\ddagger$ , e redução dos valores de  $\Delta G^\ddagger$ . Houve grande aumento nos valores de  $\Delta S^\ddagger$  em leite desnatado e em leite integral indicando um aumento no número de moléculas da bacteriocina P34 no estado de transição (USTOK *et al.*, 2009).

**Tabela 8.** Valores dos parâmetros termodinâmicos de inativação térmica da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 em leite desnatado e integral.

Meio	Ea (kJ mol <sup>-1</sup> )	T (K)	ΔH <sup>#</sup> (kJ mol <sup>-1</sup> )	ΔG <sup>#</sup> (kJ mol <sup>-1</sup> )	ΔS <sup>#</sup> (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
Tampão	72	393	68,82	106,43	-95,69
		388	68,87	106,54	-97,10
		383	68,91	105,37	-95,21
		373	68,99	105,71	-98,44
		363	69,07	103,36	-94,45
Leite Desnatado	90	393	86,94	105,73	-4,78
		388	86,98	105,16	-4,69
		383	87,02	106,34	-5,04
		373	87,11	104,63	-4,70
		363	87,19	104,41	-4,74
Leite Integral	136	393	133,04	103,66	7,48
		388	133,08	106,16	6,94
		383	133,13	105,41	7,24
		373	133,21	105,75	7,36
		363	133,29	-	-

Valores de  $\Delta G^{\#}$  de inativação da bacteriocina P34 em leite desnatado e integral estão bastante próximas e são da ordem de grandeza esperada para a desnaturação de proteína (BUSTO *et al.*, 1999; ORTEGA *et al.*, 2004). Portanto, o desdobramento da molécula do peptídeo P34 em leite desnatado e integral, assim como nos outros testes realizados, pode ser o passo determinante para a inativação térmica irreversível nas condições testadas.

É necessário ressaltar que a inativação térmica foi estudada para o peptídeo P34 em solução tampão e que seu comportamento pode ser alterado

quando avaliado em processos industriais de maior escala ou em alimentos mais complexos. Ainda, sua estabilidade ao longo do tempo, após o processamento térmico, não foi avaliada. Alguns peptídeos antimicrobianos podem ser inativados por enzimas endógenas ou ligação a componentes da matriz alimentar reduzindo sua biodisponibilidade ao longo da vida-de-prateleira do produto. O conhecimento sobre a cinética e termodinâmica de inativação térmica de peptídeos antimicrobianos é um passo essencial para justificar sua segura utilização em alimentos. Mais estudos sobre cinética de inativação térmica de peptídeos antimicrobianos, em grandes escalas, com equipamentos industriais de processamento térmico ou em quantidades de bacteriocina equivalentes às aquelas utilizadas em alimentos, são necessários para a correta aplicação dessa técnica em processos industriais de alimentos.



## 6. CONCLUSÃO

A inativação térmica do peptídeo P34 segue uma reação de primeira ordem. O desdobramento da molécula do peptídeo P34 pode ser o passo determinante para a inativação térmica irreversível. A redução de pH diminui a estabilidade térmica do peptídeo P34, em comparação ao seu comportamento em solução tampão pH 7,0. Em pH 4,5, a estabilidade foi ainda menor do que em pH 6,0. A adição de cloreto de sódio reduz a resistência térmica do peptídeo em altas temperaturas, porém apresenta efeito protetor contra o processamento térmico nas menores temperaturas estudadas, comparado com seu comportamento em solução tampão pH 7,0. Os valores  $D$  e  $z$  calculados para a bacteriocina indicam que ela pode ser utilizada em condições de esterilização de alguns alimentos enlatados ou de pasteurização.

A presença de sólidos lácteos tem papel importante na estabilidade térmica da bacteriocina P34 em alimentos. Em leite a interação entre o peptídeo e açúcares, proteínas e gordura do produto age de forma negativa na estabilidade do peptídeo P34. Em temperaturas acima de 110°C, a gordura reduziu a estabilidade térmica do peptídeo P34, enquanto em temperaturas abaixo, o peptídeo foi protegido pela presença do lipídeo.

Mais estudos são necessários para o melhor aproveitamento dos benefícios da combinação de tratamentos antimicrobianos, visando reduzir a

intensidade e os custos de tratamentos industriais ao longo da cadeia alimentar, além de averiguar sua biodisponibilidade no alimento ao longo de sua vida-de-prateleira.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASEN, I. M.; MARKUSSEN, S.; MORETRO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, Amsteram, v. 87, p.35–43, 2003.

ADAMS, J.B. Review: Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs. **International Journal of Food Science and Technology**, Malden, v.26, p.1-20, 1991.

ALIFAX, R.; CHEVALIER, R. Etude de la nisinase produite par *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Dairy Research**, Nova lorque, v.29, p.233– 240, 1962.

ANANOU, S.; BAÑOS, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. **Food Control**, Oxford, v.21, p. 478–486, 2010.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; VESSONI PENNA, T.C. Nisin biotechnological production and application: A review. **Trends in Food Science and Technology**, Londres, v.20, p. 146-154, 2009.

AWUAH, G.B.; RAMASWAMY, H.S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v.46, p.584-602, 2007.

BARI, M.L.; UKUKU, D.O.; KAWASAKI, T.; INATSU, Y.; ISSHIKI, K; KAWAMOTO, S. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, Phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, p.1381-1387, 2005.

BASU, S.; GHOSH, A.; BERA, A.; SAHA, M.N.; CHATTOPADHYAY, D.; CHAKRABARTI, K. Thermodynamic characterization of a highly thermoactive extracellular pectate lyase from a new isolate *Bacillus pumilus* DKS1. **Bioresource Technology**, Oxford, v.99, p.8088–8094, 2008.

BEARD, B.M.; SHELDON, B.W.; FOEGEDING, P.M. Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverages supplemented with nisin. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, p.484–491, 1999.

BELFIORE, C.; CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. **Food Microbiology**, Londres, v.24, p.223–229, 2007.

BHATTI, H.N.A.M.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M.A. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 54, p.4617–4623, 2006.

BHUNIA, A.K.; JOHNSON, M.C.; RAY, B.; KALCHAYANAND, N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.70, p.25–33, 1991.

BIZANI, D.; DOMINGUEZ, A.P.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Letters of Applied Microbiology**, Malden, v.41, p.269–273, 2005.

BIZANI, D.; MORRISY, J.A.C.; DOMINGUEZ, A.P.M.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.229–233, 2008

BLACK, E. P.; KELLY, A. L.; FITZGERALD, G. F. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v.6, p.286–292, 2005.

BLASCO, R.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A.; RODRIGO, M. Ascorbic acid degradation kinetics in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer. **LWT- Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 37, p.171–175, 2004.

BOUTTEFROY, A., MANSOUR, M., LINDER, M. AND MILLIERE, J.-B. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. **Internationnal Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 54, p.109-115, 2000.

BROMBERG, A.; MARX, S.; FRISHMAN, G. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1784, p.961-966, 2008.

BUSTO, M.D.; APENTEN, R.K.O.; ROBINSON, D.S.; WU, Z.; CASEY, R.; HUGHES, R.K. Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermostability. **Food Chemistry**, Oxford, v.65, p.323-329, 1999.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, Oxford, v.79, p.483–499, 2008.

CHEN, C.S.; WU, M.C. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. **Journal Food Science**, Malden, v.63, p.747-750, 1998.

CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, H.; BEN SLAMA, K.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, p.243-247, 2001.

CHUMCHALOVÁ, J., JOSEPHSEN, J. AND PLOCKOVÁ, J.M. The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO<sub>3</sub> and lysozyme. **Internationnal Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p.33-38, 1998.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, p.251–256, 2004.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; MOTTA, A.S.; SOUTO, A.A.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. **Canadian Journal of Microbiology**, Toronto, v.52, pp. 533-539, 2006.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L.; Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.71, p.1–20, 2001.

CORRADINI, M.G.; PELEG, M. A model of non-isothermal degradation of nutrients, pigments and enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.84, p.217-226, 2004.

CORRADINI, M.G.; PELEG, M. A Weibullian model for microbial injury and mortality. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.119, p.319-328, 2007.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v.3, n.10 , p.777-788, 2005.

DAESCHEL, M.A. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: **Hoover, D.G., Steenson, L.R.** (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, San Diego, p.63–91, 1993.

DALGLEISH, D.G.; BANKS, J.M. The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk. **Milchwissenschaft**, Dielsweg, v.46, p.75 – 8, 1991.

DANNENBERG F.; KESSLER, H.I.G. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins. **Journal Food Science**, Malden, v.53, p.258–263, 1988.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, Oxford, v.16, p.1058–1071, 2006.

DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.69, p.193–202, 1996.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Oxford, v.14, p.273-285, 2004.

EINARSSON, H. The effect pH and temperature on the antibacterial effect of Maillard reaction products. **LWT- Food Science and Technology**, Amsterdam, v.20, p.51–55, 1987.

EVERS, J.M. The milk fat globule membrane—compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. **International Dairy Journal**, Oxford, v.14, p.661–674, 2004.

FANG, T.J.; LIN, L.-W. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on raw pork treated with modified atmosphere packaging and nisin. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei, v.2, p.189–200, 1994.

HORNBAEK, T., BROCKHOFF, P.B., SIEGUMFELDT, H.; BUDDE, B.B. Two subpopulations of *Listeria monocytogenes* occur at subinhibitory concentrations of leucocin 4010 and nisin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, p.1631-1638, 2006.

HURVICH, C.M.; TSAI, C.L. Regression and time series model selection in small samples. **Biometrika**, Oxford, v.76, p.297-307, 1989.

FIMLAND, G.; JOHNSEN, L.; DALHUS, B.; NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class lia bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure and mode of action. **Journal of Peptides Science**, West Sussex, v. 11, n.11, p. 688-696, 2005

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L; OMAR, N. B.; Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.120, p.51–70, 2007.

GÄNZLE, M.G.; WEBER, S.; HAMMES, W.P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, p.207–217, 1999.



GARDE, S.; ÁVILA, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Londres, v.96, p.165– 172, 2004.

GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 5, p. 577-592, 2002.

GOUDA, M.D.; SINGH, S.A.; RAO, A.G.A.; THAKUR, M.S.; KARANTH, N.G. Thermal Inactivation of Glucose Oxidase, Mechanism and Stabilization Using Additives. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, n.27, p.24324–24333, 2003.

GRANDE, M.J.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; BEN OMAR, N.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A. . Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, p.185–194, 2006.

JYDEGAARD, A.-M.; GRAVESEN, A.; KNØCHEL, S. Growth condition-related response of *Listeria monocytogenes* 412 to bacteriocin inactivation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.31, p.68-72, 2000.

KAWAI, Y.; ISHII, Y.; ARAKAWA, K.; UEMURA, K.; SAITOH, B.; NISHIMURA, J.; KITAZAWA, H.; YAMAZAKI, Y.; TATENO, Y.; ITOH, T.; SAITO, T. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n. 5, p. 2906-2911, 2004.

KIMURA, H.; SASHIHARA, T.; MATSUSAKI, H.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of

fermented rice bran. **Annals New York Academy of Sciences**, NEW YORK, v.864, 1998.

KALCHAYANAND N, DUNNE CP, SIKES A, RAY B. Inactivation of bacterial spores by combined action of hydrostatic pressure and bacteriocins in roast beef. **Journal of Food Safety**, Malden, v.23, n.4, p.219-231, 2003

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, Amsterdam, v.12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

LAI, A.C.; TRAN, S.; SIMMONDS, R. S. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.215, n.1, p.133-138, 2002.

LAPPE, R.; MOTTA, A.S.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Salmonella Enteritidis* by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.135, n.3, p.312-316, 2009a.

LAPPE, R.; DOMINGUEZ, A.P.M.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.91, p.223-227, 2009b.

LEE, S.; IWATA, T.; OYAGI, H. Effects of salts on conformational change of basic amphipathic peptides from  $\beta$ -structure to  $\alpha$ -helix in the presence of phospholipid liposomes and their channel-forming ability. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1151, p.75–82, 1993.

LEE, S.S.; MANTOVANI, H.C.; RUSSELL, J.B. The binding and degradation of nisin by mixed ruminal bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v.42, p.339-345, 2002

LENZ, M.K.; LUND, D.B. Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components. **Food Technology**, Chicago, v.34, p.51-55, **1980**.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.100, p.141– 152, 2005

LISBOA, M.P.; BONATTO, D.; BIZANI, D; HENRIQUES, J.A.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.9, p.111–118, 2006.

LUDI KHUYZE, L.; OOMS, V.; WEEMAES, C.; HENDRICKX, M. Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea L. Cv. Italica*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, n.47, p.1794-1800, 1999.

MAKKI, F.; DURANCE, T. D. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. **Food Research International**, Amsterdam, v.29, n.7, p.635-645, 1996.

MALHEIROS, P.S.; DAROIT, D.J.; SILVEIRA, N.P.; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, Londres, v.27, p.175–178, 2010.

MAYR-HARTING, A.; HEDJES, A.J.; BERKELEY, C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Ed.). **Methods in microbiology**, New York, Academic Press, 7, 1972.

MAZZOTTA, A.S.; CRANDALL, A.D.; MONTVILLE, T.J. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.2654–2659, 1997.

MCPHERSON, A.V.; KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: the bovine milk fat globule membrane—its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. **Journal of Dairy Research**, Nova Iorque, v.1983, n.50, p.107– 133, 1983.

MESSENS, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.72, p.31– 43, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5mg/kg. **Diário Oficial**, Brasília, 23 jan. 1996, Seção 1.

MONTVILLE, T. J., & MATTHEWS, K. R. (2008). **Food Microbiology An Introduction**. 2<sup>nd</sup> edition, ASM Press, Washington, DC.

MORGAN, S.M.; ROSS, R.P.; BERESFORD, T.; HILL, C. Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v.88, p.414–420, 2000.

MOTTA, A.S.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.307-310, 2004.

MOTTA, A.S. Produção, purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por uma linhagem de *Bacillus* sp. P34. 2006. Tese

(Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MOTTA, A.S.; CANNAVAN, F.S.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. **Archives Microbiology**, Nova Iorque, v.188, p.367–375, 2007a.

MOTTA, A.S.; LORENZINI, D.M.; BRANDELLI, A. Purification and Partial Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Novel *Bacillus* sp. Isolated from the Amazon Basin. **Current Microbiology**, Nova Iorque, v.54, p.282–286, 2007b.

MOTTA, A.S.; FLORES, F.S.; SOUTO, A.A.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.93, p.275–284, 2008.

MURRAY, M.; RICHARD, J.A. Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5 °C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, p.1534– 1540, 1997.

MYERS, C. D. Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. In **Thermal Analysis of Foods**, ed. V. R. Harwalkar and C.-Y. Ma, Elsevier Applied Science, London, p. 16, 1990.

NAIDU, G.S.N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v.16, p.57-67, 2003.

NAIM, F.; ZAREIFARD, M.R.; ZHU, S.; HUIZING, R.H.; GRABOWSKI, S.; MARCOTTE, M. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: From kinetics to process validation. **Food Microbiology**, Londres, v.25, p.936-941, 2008.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v.11, p.120-127, 2008.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HOLO, H. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.198, n.4, p.189–1198, 2007.

NIETO-LOZANO, J.C.; REGUERA-USEROS, J.I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M.C.; SACRISTÁN-PÉREZ-MINAYO, G.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.J.; TORRE, A.H. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. **Food Control**, Oxford, v.21, p.679–685, 2010.

NILSSON, L., HUSS, H.H., GRAM, L., Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.38, p.217–227, 1997.

NILSSON, L.; CHEN, Y.; CHIKINDAS, M.L.; HUSS, H.H.; GRAM, L.; MONTVILLE, T.J. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.769–774, 2000.

NOHARA, D.; MIZUTANI, A.; SAKAI, T. Kinetic Study on Thermal Denaturation of Hen Involving Precipitation Egg-White Lysozyme. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.87, p.199-205, 1999.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, Oxford,,v.88, p.209-217, 2004

PELEG, M.; PENCHINA, C.M. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. **Critical Reviews of Food Science**, Oxford, v. 40, p.159-172, 2000.

PELEG, M.; COLE, M.B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical Reviews of Food Science**, Oxford, v.38, p.353-380, 1998.

PELLEGRINO, L. Influence of fat content on some heatinduced changes in milk and cream. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v.48, p.71-80, 1994.

PENNA, T. C. V.; MORAES, D. A. The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, p.415–418, 2002.

PEDERSEN, P.B.; BJØRNVAD, M.E.; RASMUSSEN, M.D.; PETERSEN, J.N. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* spp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Washington, v.36, p.155–161, 2002.

QUADROS, D.F. Avaliação da bacteriocina P34 no crescimento de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal de frango. 66p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

REEVES, P. The bacteriocins. *Bacteriological Reviews*. Baltimore, v.29, p.25-45, 1965.

REEVES, P. The bacteriocins. In: KLEINZELLER, A.; SPRINGER, G. F.; WITTMANN, H. G. (Ed.). **Molecular Biology Biochemistry and Biophysics**. New York: Springer-Verlag, 1972, p. 115.

RIZVI, A.F.; TONG, C.H. Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. **Journal of Food Science**, Malden, v.62, p.1-7, 1997.

RURIÁN-HENARES, J.A.; MORALES, F.J. Antimicrobial Activity of Melanoidins against *Escherichia coli* Is Mediated by a Membrane-Damage Mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, p.2357–2362, 2008.

SCHOKKER, E.P.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. Kinetic modeling of enzyme inactivation: kinetics of heat inactivation at 90-110°C of extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, p.4740-4747, 1997.

SCHOKKER, E.P., & VAN BOEKEL, M.A.J.S. Kinetics of Thermal Inactivation of the Extracellular Proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F: Influence of pH, Calcium, and Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, p.1681-1686, 1999.

SHALINI, G.R.; SHIVHARE, U.S.; BASU, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.85, p.147-153, 2008.



SHLEVIN, E.; SAGUY, S.; MAHRER, Y.; KATAN, J. Modeling the survival of two soilborne pathogens under dry structural solarization. **Phytopathology**, Saint Paul, v.93, p.1247-1253, 2003.

SINGH, H. The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Londres, v.11 p.154 – 163, 2006.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, Oxford, v.18, p.329–343, 2008

STUMBO, C.R. *Thermobacteriology in Food Processing*, 2<sup>nd</sup> edn; Academic Press: New York, NY, 1973.

SZABO, E.A.; CAHILL, M.E. The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA™ 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p.21–31, 1998.

TAMS, J.W.; WELINDER, K.G. Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.421, p.234-236, 1998.

TEREBIZNIK, M.R.; JAGUS, R.J.; CERRUTTI, P.; DE HUERGO, M.S.; PILOSOFF, A.M. Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, p.741–746, 2000.

THONGSOOK, T.; BARRETT, D.M. Heat Inactivation and reactivation of broccoli peroxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, p.3215-3222, 2005.

THOMAS, L.V.; WIMPENNY; J.W.T. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2006–2012, 1996.

USTOK, F.I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, Washington, v.119, n.3, p.1114-1120, 2009.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. **Journal of Food Science**, Malden, v.61, p.477-485, 1996.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. ***Effect of heating on Maillard reactions in milk.*** **Food Chemistry**, Oxford, v.62, n.4, p. 403414, 1998.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.74, p.139-159, 2002.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. Kinetic modeling of food quality: A critical Review. **Critical Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v.7, p.144-158, 2008.

VAN DEN HOUT, R.; MEERDINK, G.; VAN'T RIET, K. Modeling of the inactivation kinetics of the trypsin inhibitors in soy flour. **Journal of Science and Food Agriculture**, W Sussex, v.79, p.63-70, 1999.

VAUCHER, R.A.; MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Evaluation or the in vitro cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. **Cell Biology International**, Londres, v.34, p.317-323, 2010.

VESSONI PENNA, T. C.; MORAES, D. The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, n.2, p.415-418, 2002.

VIGNOLO, G., FADDA, S., KAIRUZ, M.N., R., HOLGADO, A.P. AND OLIVER, G. Effects of curing additives on the control of *Listeria monocytogenes* by lactocin 705 in meat slurry. **Food Microbiology**, Oxford, v.15, p.259-264, 1998.

WALSTRA, P. Physical chemistry of milk fat globules. In: Fox PF, editor. *Advanced dairy chemistry Lipids*, vol. 2. London' Chapman & Hall, p. 101, 1995.

WANDLING, L. R.; SHELDON, B. W.; FOEGEDING, P.M. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, p.492–498, 1999.

WEEMAES, C.A.; LUDI KHUYZE, L.R.; VAN DEN BROECK, I.; HENDRICKX, M. Kinetics of combined pressure–temperature inactivation of avocado polyphenol oxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova Jersey, v.60, p.292-300, 1998.

WEIBULL, W. A statistical distribution of wide applicability. **Journal of Applied Mechanism**, California, v. 18, p.293-297, 1951.

WIRJANTORO, T. I.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S.; WILLIAMS, G. C.; DELVES-BROUGHTON, J. The effect of nisin on the keeping quality of reduced heat-treated milks. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, p.213–219, 2001.

YE, A.; SINGH, H; TAYLOR, M.W.; ANEMA, S. Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. **Lait**, Les Ulis Cedex, v.84, p.69– 83, 2004.

## ANEXO

**“Kinetic modeling of the thermal inactivation of bacterion-like inhibitory substance P34”**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washignton, v.58, p.3147-3152, 2010.

## Kinetic Modeling of the Thermal Inactivation of Bacteriocin-Like Inhibitory Substance P34

VOLTAIRE SANT'ANNA, MICHELE UTPOTT, FLORENCIA CLADERA-OLIVERA, AND  
 ADRIANO BRANDELLI\*

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, Brazil

Optimization of thermal processes relies on adequate degradation kinetic models to warrant food safety and quality. The knowledge on thermal inactivation kinetics of antimicrobial peptides is necessary to allow for their adequate use as natural biopreservatives in the food industry. In this work, thermal inactivation of the previously characterized bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) P34 was kinetically investigated within the temperature range of 90–120 °C. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 was used as the indicator microorganism for antimicrobial activity. Applicability of various inactivation models available in the literature was critically evaluated. The first-order model provided the best description of the kinetics of inactivation over the selected temperatures, with  $k$  values between 0.059 and 0.010 min<sup>-1</sup>.  $D$  and  $k$  values decreased and increased, respectively, with increasing temperature, indicating a faster inactivation at higher temperatures. Results suggest that BLIS P34 is thermostable, with a  $z$  value of 37.74 °C and  $E_a$  of 72 kJ mol<sup>-1</sup>.

**KEYWORDS:** Kinetic modeling; thermal inactivation; bacteriocin-like inhibitory substance P34; thermodynamic activation parameters

### INTRODUCTION

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria that are active against other bacteria, in either the same species (narrow spectrum) or across genera (broad spectrum), and as defense peptides, cell-signaling mechanisms can also be involved (*1*). Their proteinaceous nature implies a putative degradation in the gastrointestinal tract of man and animals, suggesting that some bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) or purified bacteriocins could be used as natural preservatives in foods (*2, 3*). Those produced by LAB are largely studied with the perspective to search for safe and food-grade preservatives of biological origin (*4*). Nisin is the most well-characterized bacteriocin, and its use in food is permitted in more than 40 countries (*3*).

The genus *Bacillus* includes a variety of industrially important species and has a history of safe use in both the food and pharmaceutical industry (*5*). Despite the intensive work on bacteriocins produced by LAB, several bacteriocins or bacteriocin-like inhibitory substances (BLISs) have been described for *Bacillus* species, including BLIS P40, cerein 8A, and thuricin 7 (*6–8*), presenting a broad spectrum of antibacterial activity. *Bacillus* sp. P34, an isolate from the Amazon basin, produces a BLIS that displays antibacterial activity against important food-borne pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes*

and *Bacillus cereus*. This antimicrobial substance maintains its activity within a broad range of pH and presents thermal stability (*9*), which addresses the potential for use in heat-treated foods.

It is often suggested that bacteriocins should not be used as the primary processing step or barrier to prevent the growth or survival of pathogens but rather that they could provide an additional hurdle to reduce the likelihood of food-borne disease (*10*). The combination of heat treatment with bacteriocins is an interesting technique to obtain safe food with minimal destruction of food components, such as flavor, color, or nutrients, during processing. Nisin has been used in combination with heat to inactivate important food pathogens and spoilage microorganisms (*11, 12*).

Thermal processing continues as the most widely used method employed for food preservation and shelf-life extension (*13*). However, excessive heating may produce considerable losses in the quality and, particularly, in the sensory properties of foods. Thermal processing methods emphasize the achievement of commercial sterility while minimizing changes in nutritional value and eating quality (*14*). In this context, recent developments in food processing have aimed at technologies that may result in minimal damage to nutrients and sensory components by reducing heating times and optimizing heating temperatures (*13*). Therefore, the combination of antimicrobial peptides with heat treatment must receive great emphasis to be adopted as an alternative to food conservation, reducing losses of bioactive components.

\*To whom correspondence should be addressed: ICTA, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, Brazil. Fax: +5551-3308-7048. E-mail: abrand@ufrgs.br.

Mathematical models consist of equations that provide an output based on set input data. It is a concise way to express the physical behavior in mathematical terms. The purpose of inactivation mathematical modeling is to assess the effect of different heat treatments on residual activity without performing numerous trial runs (15). Inactivation modeling has been described for microorganisms, food compounds, and enzymes (12, 16, 17). Considering that inactivation usually proceeds through a network of reactions including denaturation, aggregation, coagulation, and chemical decomposition, the kinetic models are based on different mechanisms: first-order, consecutive reactions, and parallel reactions (Table 1).

Modeling of thermal inactivation of antimicrobial peptides has not been found in the literature. In a recent experimental study, kinetic and thermodynamic parameters were determined for thermal inactivation of the bacteriocin cerein 8A, following a first-order model (18). This study was therefore undertaken to determine the best heat inactivation model for BLIS P34. On this basis, temperature dependence and thermodynamic parameters for thermal inactivation were determined.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial Strains and Media.** The producer strain was *Bacillus* sp. P34, isolated from fish (*Leporinus* sp.) of the Brazilian Amazon basin (9). The indicator strain was *L. monocytogenes* ATCC 7644. Strains were maintained in brain heart infusion (BHI) medium (Oxoid, Basingstoke, U.K.) containing 20% (v/v) glycerol at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The cultivation of strains was performed aerobically.

**Production of the Antimicrobial Substance.** The BLIS produced by *Bacillus* sp. P34 was isolated as described elsewhere (9). *Bacillus* sp. P34 was cultivated aerobically in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of BHI broth at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 180 rpm for 24 h. Cells were harvested by centrifugation at 10000g for 15 min at  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and the resulting supernatant was filtered through cellulose membranes (pore diameter of  $2.2 \times 10^{-4}$  mm; Millipore, Bedford, MA). The culture filtrate was submitted to precipitation with ammonium sulfate to 20% saturation. The resulting pellet was suspended in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0, applied to a gel filtration column (Sephadex G-100, Pharmacia Biotech, Uppsala), and eluted with 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. Fractions with antimicrobial activity were stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until used for the antimicrobial assay.

**Antimicrobial Activity Assay.** The antimicrobial activity was detected by the agar disk diffusion assay (19). Aliquots of 0.02 mL were applied to 6 mm cellulose discs onto agar plates previously inoculated with a swab submerged in a suspension of *L. monocytogenes* ATCC 7644, which corresponded to a 0.5 McFarland turbidity standard solution ( $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). Plates were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The bacteriocin titer was determined by the modified serial 2-fold dilution method (19). The reciprocal value of the highest dilution where an inhibition zone was observed was taken as activity units  $\text{mL}^{-1}$  (AU  $\text{mL}^{-1}$ ).

**Thermal Inactivation.** Thermal inactivation of BLIS P34 was determined as described elsewhere (18). Bacteriocin solutions (1.0 mL) were heated in sealed tubes (thickness of 1 mm, internal diameter of 7 mm, and length of 3 cm) at 90, 100, 110, 115, and  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in a thermostatically controlled dry bath (Accublock, Labnet International, Inc., Woodbridge, NJ). Tubes were withdrawn at each time interval, immediately immersed in an ice bath, and antimicrobial activity was determined as described above. The activity after 1 min of heating time ( $t = 0$ ) was considered to be the initial activity, thereby eliminating the effects of heating. Assays were performed in duplicate. Residual antimicrobial activity with respect to processing time at different processing temperatures was fit to several models (Table 1) using nonlinear regression (Statistica 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK).

**Kinetic Analysis.** Several models available in the literature to describe thermal inactivation are presented in Table 1. In the model equations,  $A$  represents antimicrobial activity (AU  $\text{mL}^{-1}$ ) at time  $t$  (min),  $A_0$  is the initial activity (AU  $\text{mL}^{-1}$ ), and  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) is the reaction rate constant at a given temperature. First-order kinetics (eq 3) have been reported to

describe thermal inactivation of cerein 8A (18) and several enzymes (20, 21). The temperature dependence parameters for the first-order model are given by the Arrhenius equation, which describes the relationship of the thermal inactivation rate ( $k$ ) and temperature

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (1)$$

where  $A$  is the Arrhenius constant,  $E_a$  is the activation energy,  $R$  is the universal gas constant, and  $T$  is the absolute temperature.

For enzymes, there are kinetic equations that suggest that their activity loss could be described by the summation of two exponential decays, one for the hypothesized heat-labile enzyme and the other for the hypothesized heat-stable enzyme (eqs 5–7). These models were tested to check if BLIS P34 has a labile and resistant heat fraction.  $A_L$  and  $A_R$  are the residual activities for the labile and resistant heat fractions, respectively.  $k_L$  and  $k_R$  are the first-order reaction rate constants for the labile and resistant heat fractions, respectively. The coefficient  $a$  represents the active fraction of the thermal-labile group in relation to the total activity (22, 23). Fractional conversion refers to a first-order inactivation process and takes into account the non-zero enzyme activity upon prolonged heating because of the presence of an extremely heat-resistant fraction (24).  $n$  is the order of the reaction in  $n$ th-order model.

The Weibull distribution pattern (25) is based on the assumption that, under the conditions examined, the momentary rate of thermal sensitivity to heat is only a factor of the transient heating intensity and residual activity but not the rate at which the residual activity has been reached (26). Equation 4 represents the cumulative form of the Weibull distribution. The Weibull rate parameter  $b$  is characteristic of each reaction and emulates the thermal reaction rate. Its temperature dependence can be expressed by a log–logistic equation (27), according to eq 2

$$b(T) = \log_e\{1 + \exp[k'(T - T_c)]\} \quad (2)$$

where  $T_c$  marks the temperature level where inactivation starts to accelerate and  $k'$  is the slope of  $b(T)$ .

**Table 1.** Kinetic Equations Used To Analyze Inactivation of BLIS P34

equation	model	equation	reference
3	first order	$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt)$	20
4	Weibull distribution	$\frac{A}{A_0} = \exp(-bt^n)$	25
5	$n$ th order	$\frac{A}{A_0} = \{A_0^{1-n} + (n-1)kt\}^{1/(1-n)}$	21
6	two fraction	$\frac{A}{A_0} = a \exp(-k_L t) + (1-a) \exp(-k_R t)$	22
7	fractional conversion	$\frac{A}{A_0} = A_r + (A_0 - A_r) \exp(-kt)$	24

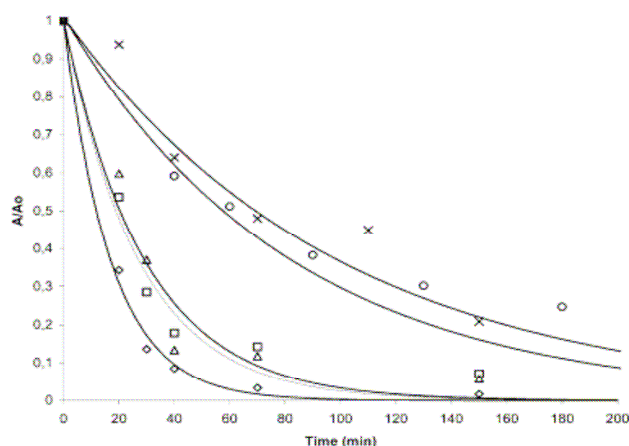
**Comparison of Kinetic Models.** For a comparison of fits obtained with nonlinear regression, statistical and physical criteria were considered. Statistical criteria include the coefficient of determination ( $r^2$ ),  $\chi^2$ , and Akaike information criterion (AIC) (28).

$\chi^2$  was used to compare models of thermal inactivation of enzymes (27, 29) and is given by

$$\chi^2 = \frac{\sum (a_{\text{measured}} - a_{\text{predicted}})^2}{(n-p)} \quad (8)$$

When models with different numbers of parameters are compared, the residual sum of squares does not give enough information to discriminate between these models. The minimum-corrected AIC produces ranking of parsimonious models when the number of experimental





**Figure 1.** Thermal inactivation of BLIS P34 at 90 °C (○), 100 °C (×), 110 °C (△), 115 °C (□), and 120 °C (◇). Data presented are average values of two independent experiments. The standard deviations were always lower than 8%. Data were fitted to a first-order model.

data are small or when the number of fitted parameters are a moderate to large fraction of the number of data. This optimization criterion compares models by their sum of squares, corrected for the number of parameters (28).

AIC is the comparing statistical method of thermal inactivation for enzymes (29,30) and is defined as (30)

$$AIC = n \ln \left( \frac{\sum (\hat{a}_{\text{measured}} - \hat{a}_{\text{predicted}})^2}{n} \right) + \frac{n(n+p)}{n-p-2} \quad (9)$$

where  $n$  is the number of observations and  $p$  is the number of parameters.

The model with the lowest  $\chi^2$  and AIC and higher  $r^2$  for the residual antimicrobial activity is the best choice from a statistical point of view. Estimation of negative parameters is a criterion to reject the inactivation model.

## RESULTS AND DISCUSSION

BLIS P34 was previously reported as inhibitory to a broad range of indicator strains, including pathogenic and spoilage organisms, such as *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and clinical isolates of *Aeromonas hydrophila*, and was stable for up to 100 °C and within a wide range of pH values (9). In this study, isothermal inactivation treatments of peptide P34 were evaluated, and residual activities were fitted for different thermal inactivation models. The results obtained for thermal inactivation at 90, 100, 110, 115, and 120 °C are shown in Figure 1, where an exponential behavior can be observed. As expected, antimicrobial activity decreased as the heating time increased, as well as at higher temperatures. Mass spectrometry analysis showed that BLIS P34 has a molecular mass of 1456 Da (31), and these results resemble the heat stability of some small antimicrobial peptides from *Bacillus* (32).

Several thermal inactivation kinetic equations were tested to fit the experimental data. Models that suggest that there is a labile and resistant fraction were also tested. The  $n$ th-order (eq 5) inactivation did not yield good  $r^2$  values at high temperatures, and the AIC and  $\chi^2$  values obtained were quite higher compared to other models (Table 2). For the two-fraction model (eq 6), results showed that inactivation rate parameters for both fractions were the same, indicating single-step inactivation of the antimicrobial peptide. The fractional conversion (eq 7) model cannot explain the inactivation of BLIS P34, because parameter values obtained on the statistical analysis were negative. Thus,

these models were rejected for modeling thermal inactivation of BLIS P34.

Discussion and validation of the applicability and usefulness of the Weibull distribution model have been recently published (33–35). It has been proposed to explain thermal inactivation of enzymes (17) and microorganisms (36); therefore, the Weibull distribution was tested for its applicability to the experimental data of BLIS P34 inactivation. First-order and Weibull distribution models gave a good fit for the data, with very similar  $r^2$ ,  $\chi^2$ , and AIC values. The  $r^2$  values for the first-order model ranged from 0.899 to 0.995 (model fitted to the data is shown in Figure 1), while the  $r^2$  values for the Weibull distribution model ranged from 0.898 to 0.997. The AIC values for first-order were lower than those for the Weibull pattern, ranging from –31 to –15 and from –24 and –11, respectively. The  $\chi^2$  ranged from 0.0006 to 0.0095 for the first-order model and from 0.0002 to 0.012 for the Weibull pattern, indicating a similar fit for both models. The values obtained for the criteria analyzed were very similar for both models, which does not allow for reliable choosing between them. Thus, dependence temperature parameters obtained for first-order ( $k$  values) and Weibull distribution ( $b$  values) models were fitted for Arrhenius (eq 1) and log–logistic (eq 2) equations, respectively. The  $r^2$  for the Arrhenius equation gave a good fit to the data, with a value of 0.94 (Figure 2). For Weibull model parameters, the log–logistic equation had a very low  $r^2$  value (0.10), as shown in Figure 3. This poor fit for the Weibull pattern to the experimental data indicates that the first-order model is the best model to explain the thermal inactivation for BLIS P34.

In heat processing, it is common to characterize first-order reactions in terms of  $D$  and  $z$  values (thermal death time concepts). The decimal reduction time ( $D$  value) is the time needed for a 10-fold reduction of the initial activity at a given temperature. It is obtained by plotting the antimicrobial activity values on a log scale against the corresponding inactivation times. The  $z$  value is the temperature needed to reduce the  $D$  value one log unit and is obtained by plotting the  $D$  values on a log scale against the corresponding temperatures (37).

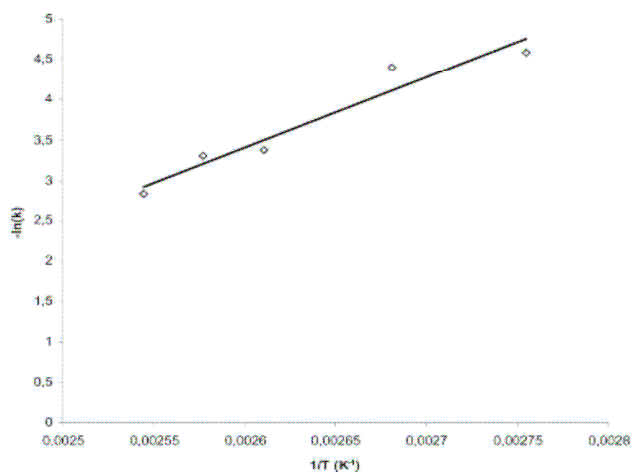
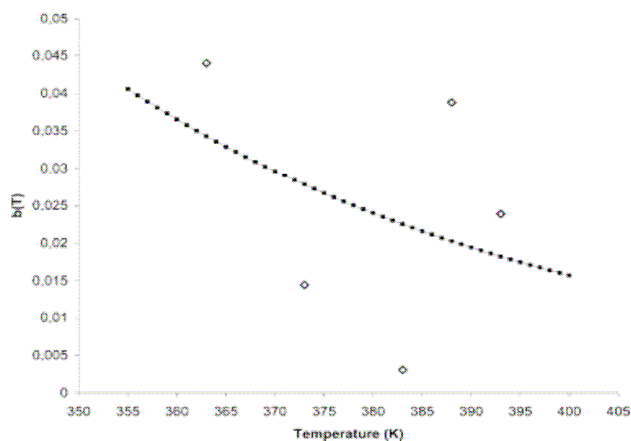
Table 3 shows results obtained for  $k$ ,  $D$ , and  $z$  values for BLIS P34 for heat treatments between 90 and 120 °C. The rate constant increased with the higher heating temperatures, and  $D$  values decreased with increasing temperature, indicating a faster inactivation at higher temperatures. It can be observed that  $D$  values are between 39 and 226 min at temperatures between 90 and 120 °C. The effect of the temperature on  $D$  values is shown in Figure 4, and the calculated  $z$  value for the range of temperatures studied (90–120 °C) was approximately 38 °C (Table 3).

The  $z$  values for cooking and nutrient degradation (25–45 °C) are generally greater than that for microbial inactivation (7–12 °C) (13). In fact, differences between the  $D$  and  $z$  values of microorganisms and nutrients are exploited to optimize thermal processes and can be exploited also to maintain antimicrobial activity after treatment.  $D$  and  $z$  values obtained for BLIS P34 indicate that it can be used in conditions of high-temperature short-time (HTST) pasteurization (often 72 °C for 15 s) or even in conditions of canned food sterilization, maintaining part of its antimicrobial activity.

To determine the industrial potential of bacteriocins, it is essential to understand their structure–stability relationships. Therefore, estimation of thermodynamic parameters helps to understand the probable mechanism of denaturation, which is very important in heat processes. The logarithm representation of the inactivation rate against the reciprocal temperature allows us to calculate the activation energy ( $E_a$ ), comparing the experimental data equation to the Arrhenius equation (eq 1). Activation

**Table 2.** Summary of Performance of Selected Models To Describe Inactivation of BLIS P34

model (equation)	$\rho^2$	$\chi^2$	AIC	remarks
first order (3)	[0.899; 0.995]	[0.0006; 0.0095]	[-31; -15]	accepted
Weibull distribution (4)	[0.898; 0.997]	[0.0002; 0.012]	[-29; -11]	poor fit for dependence temperature parameters; rejected
<i>n</i> th order (5)	[0.47; 0.99]	[0.0002; 0.126]	[-32; 37]	low values for $\rho^2$ and high for AIC and SE; rejected
two fraction (6)	[0.959; 0.995]	[0.0006; 0.0147]	[-24; 24]	$k_L = k_R$ ; rejected
fractional conversion (7)	[0.908; 0.998]	[0.0002; 0.014]	[-31; 24]	negative parameters estimates; rejected

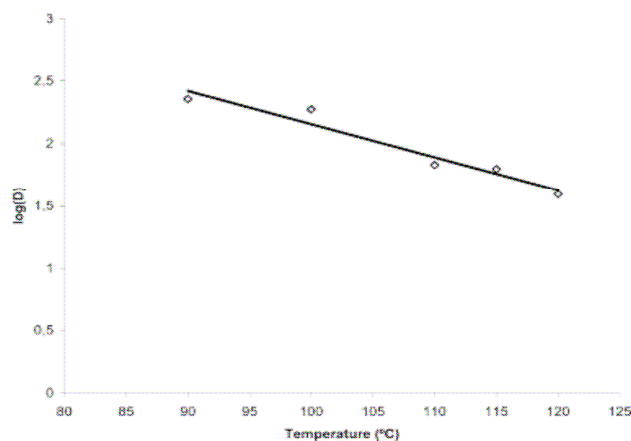
**Figure 2.** Arrhenius plot of inactivation rates of BLIS P34. The regression equation was determined as  $y = -8671.1x + 191.135$  ( $r^2 = 0.938$ ).**Figure 3.** Dependence of the Weibull distribution coefficient  $b$  as a function of the log-logistic function. The regression equation was determined as  $b(T) = \ln(1 + \exp(-0.02132(T - 205.643)))$  ( $r^2 = 0.10$ ).

enthalpy ( $\Delta H^\ddagger$ ), free energy of inactivation ( $\Delta G^\ddagger$ ), and activation entropy ( $\Delta S^\ddagger$ ) can be calculated as described elsewhere (18). Inactivation is known to be a process where the secondary, tertiary, or quaternary structure of a protein changes without breaking covalent bonds (38). The changes in enthalpy and entropy, for the thermal inactivation of BLIS P34, which have been calculated using the transition-state theory, are presented in Table 4. Because the  $\Delta H^\ddagger$  and  $\Delta S^\ddagger$  are heat and entropy change, respectively, these two parameters also provide a measure of the number of noncovalent bonds broken and the net enzyme/solvent disorder change associated with the formation of the transition state (39).

**Table 3.** Kinetic Parameters of Thermal Inactivation of BLIS P34

temperature ( $^\circ\text{C}$ )	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\rho^2$	$t_{1/2}$ (min)	$D$ (min)	$z$ ( $^\circ\text{C}$ )
120	$0.0586 \pm 0.001^a$	0.9955	11.83	39.30	
115	$0.0368 \pm 0.002$	0.9722	18.86	62.66	
110	$0.0340 \pm 0.001$	0.9595	20.37	67.66	37.74
100	$0.0123 \pm 0.003$	0.8979	56.58	187.97	
90	$0.0102 \pm 0.001$	0.9583	68.29	226.86	

<sup>a</sup> Standard error of regression (95% confidence interval).

**Figure 4.** Variation of the decimal reduction time ( $D$ ) with temperature for BLIS P34. The regression equation was determined as  $y = -0.0265x + 4.81$  ( $r^2 = 0.944$ ).**Table 4.** Thermodynamic Parameter Values of Thermal Inactivation of BLIS P34 Activity

temperature (K)	$\Delta H^\ddagger$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta G^\ddagger$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\ddagger$ ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )
393	68.82	106.43	-95.69
388	68.87	106.54	-97.10
383	68.91	105.37	-95.21
373	68.99	105.71	-98.44
363	69.07	103.36	-94.45

The activation energy can be seen as the energy barrier that molecules need to cross to be able to react. The proportion of molecules able to do that increases with temperature, which qualitatively explains the effect of temperature on rates (15). For BLIS P34, it was necessary to absorb 72 kJ from the external medium to start its inactivation at temperatures between 90 and 120  $^\circ\text{C}$ . Cerein 8A, a relatively thermostable bacteriocin, needs 105.7 kJ to begin its inactivation (70–82  $^\circ\text{C}$ ) (18). Foods are unstable in a thermodynamic sense, which means that they have the tendency to change from a low-entropy, high-enthalpy state to a high-entropy, low-enthalpy state (15). The denaturation of many proteins, such as chicken egg albumin (40) and lactoglobulin, at low temperatures and in the presence of urea (41) shows



a negative  $\Delta S^\ddagger$  because water ordering increases in the vicinity of nonpolar amino acids, which are exposed during unfolding (42). This ordering of water around hydrophobic residues is disrupted at higher temperatures (43). The negative entropy of activation ( $\Delta S^\ddagger$ ) observed for invertase suggested that there was negligible disorderness at that of  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus wentii* (44). Protein unfolding is accompanied by the disruption of many relatively weak noncovalent bonds that form the folded structure and results in a less organized system. The increase of the activation entropy compensates for the high inactivation barrier, which causes the Gibbs free energy to be low enough and the inactivation process to occur relatively fast. The activation energies evaluated for immobilized enzymes in the solid matrix samples are much lower than those obtained in the aqueous solutions. In general, activation entropy has a dominant role in protein thermal inactivation in aqueous solutions (45). BLIS P34 may have intramolecular disulfide bonds in the structure (9). This agrees with the fact that the inhibitory compound was thermostable.

Antimicrobial peptides may be used in combination with heat to obtain safe food with minimal destruction of food components, such as flavor, color, or nutrients, during processing. Adequate kinetic models of thermal destruction are essential to design new processes assuming a safe food product and giving a maximum retention of quality factors (46, 47). However, it is necessary to point out that thermal inactivation was studied for BLIS P34 in buffer solution, and in a food system, this substance could be more stable because of the protective effect of food proteins or could react with other food compounds during heat processing. Some antimicrobial peptides may be inactivated by endogenous food enzymes or binding to components of the food matrix, which has been described for nisin, sakacin P, and lactoferricin B (3, 48, 49). In this concern, the knowledge about kinetics and thermodynamics of heat inactivation of antimicrobial peptides is an essential step to warrant their safe use.

In conclusion, the thermal residual activity curve indicates partial loss of the antimicrobial activity of BLIS P34 at high temperatures. A successful modeling will enable the processors to modulate their process to achieve desirable antimicrobial activity in the end of the thermal process. The first-order function can therefore be recommended to describe the heat inactivation kinetics of BLIS P34, provided that it satisfies the statistical and physical criteria of implementation.

On the basis of an isothermal experiment in the temperature range of 90–120 °C and using the Arrhenius equation, the thermal inactivation of BLIS P34 is satisfactorily explained by the first-order model.  $D$ ,  $z$ , and  $k$  values calculated by nonlinear regression indicate that peptide P34 is a thermostable substance with a  $z$  value of 38 °C and  $E_a$  of 72 kJ mol<sup>-1</sup>. More studies about kinetics of thermal inactivation of antimicrobial peptides are necessary to allow for their proper use as natural biopreservatives in the food industry.

#### LITERATURE CITED

- Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 777–788.
- Eckner, K. Bacteriocins and food application. *Dairy Food Environ. Sanit.* **1992**, *12*, 204–209.
- Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F.; Chikindas, M. L. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 1–20.
- O'Sullivan, L.; Ross, R. P.; Hill, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* **2002**, *84*, 593–604.
- Pedersen, P. B.; Bjørnvad, M. E.; Rasmussen, M. D.; Petersen, J. N. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* spp. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *36*, 155–161.
- Cladera-Olivera, F.; Caron, G. R.; Brandelli, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett. Appl. Microbiol.* **2004**, *38*, 251–256.
- Bizani, D.; Dominguez, A. P. M.; Brandelli, A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Lett. Appl. Microbiol.* **2005**, *41*, 269–273.
- Cherif, A.; Ouzari, H.; Daffonchio, D.; Cherif, H.; Ben Slama, K.; Hassen, A.; Jaoua, S.; Boudabous, A. Thuricin 7: A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *32*, 243–247.
- Motta, A. S.; Cannavan, F. S.; Tsai, S. M.; Brandelli, A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Arch. Microbiol.* **2007**, *188*, 367–375.
- Deegan, L. H.; Cotter, P. D.; Hilla, C.; Ross, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1058–1071.
- Boziaris, I. S.; Humpheson, L.; Adams, M. R. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *43*, 7–13.
- Naim, F.; Zareifard, M. R.; Zhu, S.; Huizing, R. H.; Grabowski, S.; Marcotte, M. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: From kinetics to process validation. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 936–941.
- Awuah, G. B.; Ramaswamy, H. S.; Economides, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chem. Eng. Process* **2007**, *46*, 584–602.
- Polydera, A. C.; Stoforos, N. G.; Taoukis, P. S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *J. Food Eng.* **2003**, *60*, 21–29.
- Van Boekel, M. A. J. S. Kinetic modeling of food quality: A critical review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2008**, *7*, 144–158.
- Blasco, R.; Esteve, M. J.; Frígola, A.; Rodrigo, M. Ascorbic acid degradation kinetics in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2004**, *37*, 171–175.
- Shalini, G. R.; Shivhare, U. S.; Basu, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. *J. Food Eng.* **2008**, *85*, 147–153.
- Lappe, R.; Cladera-Olivera, F.; Dominguez, A. P. M.; Brandelli, A. Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A. *J. Food Eng.* **2009**, *91*, 223–227.
- Motta, A. S.; Brandelli, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 63–71.
- Bailey, J. E.; Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed.; McGraw-Hill: New York, 1986.
- Ludikhuyze, L.; Ooms, V.; Weemaes, C.; Hendrickx, M. Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. Cv. Italica). *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1794–1800.
- Chen, C. S.; Wu, M. C. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 747–750.
- Weemaes, C. A.; Ludikhuyze, L. R.; van den Broeck, I.; Hendrickx, M. Kinetics of combined pressure–temperature inactivation of avocado polyphenol oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 292–300.
- Rizvi, A. F.; Tong, C. H. Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 1–7.
- Weibull, W. A statistical distribution of wide applicability. *J. Appl. Mech.* **1951**, *18*, 293–297.
- Peleg, M.; Penchina, C. M. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Crit. Rev. Food Sci.* **2000**, *40*, 159–172.
- Corradini, M. G.; Peleg, M. A model of non-isothermal degradation of nutrients, pigments and enzymes. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *84*, 217–226.

- (28) Hurvich, C. M.; Tsai, C. L. Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika* **1989**, *76*, 297–307.
- (29) Schokker, E. P.; Van Boekel, M. A. J. S. Kinetic modeling of enzyme inactivation: Kinetics of heat inactivation at 90–110 °C of extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4740–4747.
- (30) Van den Hout, R.; Meerdink, G.; van't Riet, K. Modeling of the inactivation kinetics of the trypsin inhibitors in soy flour. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 63–70.
- (31) Motta, A. S.; Lorenzini, D.; Brandelli, A. Purification and partial characterization of an antibacterial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. strain isolated from Amazon basin. *Curr. Microbiol.* **2007**, *54*, 282–286.
- (32) Wu, S.; Jia, S.; Sun, D.; Chen, M.; Chen, X.; Zhong, J.; Huan, L. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Curr. Microbiol.* **2005**, *51*, 292–296.
- (33) Peleg, M.; Cole, M. B. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. Food Sci.* **1998**, *38*, 353–380.
- (34) van Boekel, M. A. J. S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *74*, 139–159.
- (35) Shlevin, E.; Saguy, S.; Mahrer, Y.; Katan, J. Modeling the survival of two soilborne pathogens under dry structural solarization. *Phytopathology* **2003**, *93*, 1247–1253.
- (36) Corradini, M. G.; Peleg, M. A Weibullian model for microbial injury and mortality. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 319–328.
- (37) Stumbo, C. R. *Thermobacteriology in Food Processing*, 2nd ed.; Academic Press: New York, 1973.
- (38) Naidu, G. S. N.; Panda, T. Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *16*, 57–67.
- (39) Ortega, N.; de Diego, S.; Perez-Mateos, M.; Busto, M. D. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chem.* **2004**, *88*, 209–217.
- (40) Nohara, D.; Mizutani, A.; Sakai, T. Kinetic study on thermal denaturation of hen involving precipitation egg-white lysozyme. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 199–205.
- (41) Adams, J. B. Review: Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1991**, *26*, 1–20.
- (42) Tams, J. W.; Welinder, K. G. Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. *FEBS Lett.* **1998**, *421*, 234–236.
- (43) Thongsook, T.; Barrett, D. M. Heat inactivation and reactivation of broccoli peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3215–3222.
- (44) Joffe, F. M.; Ball, C. O. Kinetics and energetics of thermal inactivation and the regeneration rates of a peroxidase system. *J. Food Sci.* **1962**, *27*, 587–592.
- (45) Bromberg, A.; Marx, S.; Frishman, G. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 961–966.
- (46) Lenz, M. K.; Lund, D. B. Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components. *Food Technol.* **1980**, *34*, 51–55.
- (47) Van Boekel, M. A. J. S. Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 477–485.
- (48) Aasen, I. M.; Markussen, S.; Moretro, T.; Katla, T.; Axelsson, L.; Naterstad, K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *87*, 35–43.
- (49) Bellamy, W.; Takase, M.; Wakabayashi, H.; Kawase, K.; Tomita, M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *73*, 472–479.

---

Received for review October 15, 2009. Revised manuscript received December 22, 2009. Accepted January 22, 2010. Authors thank the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.