



Projeto: Obtenção de bacteriocinas e hidrolisados proteicos com potencial antimicrobiano a partir de bactérias do gênero *Bacillus* sp.

Aluna: Ana Beatriz Fabeni

Orientadora: Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Resumo do projeto

A tendência dos consumidores atuais na busca por produtos livres de aditivos e conservantes químicos desperta a necessidade de realizar estudos para encontrar bons substitutos naturais com atividade antimicrobiana. Peptídeos antimicrobianos podem ser obtidos por fermentação de bactérias lácticas ou por algumas espécies de *Bacillus* ou por meio da hidrólise enzimática de proteínas vegetais e animais utilizando proteases. Linhagens de *B. licheniformis* e *B. subtilis* além de produzir bacteriocinas ou peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas, também produzem proteases que podem ser utilizadas na obtenção dos hidrolisados proteicos. Os peptídeos antimicrobianos possuem grande potencial para aplicação em alimentos como conservantes naturais. Devido à pandemia e restrição às atividades presenciais no laboratório não foi possível realizar as atividades experimentais. Foram realizadas atividades à distância como a participação dos seminários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos e revisão de literatura sobre a produção de bacteriocinas por linhagens de *Bacillus* sp, mecanismos de ação das bacteriocinas e estudos de obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos com atividade antimicrobiana usando proteases.

Palavras-chave: *bacteriocina, hidrolisados proteicos, proteases.*

Objetivos

1. Geral

Estudo da produção de proteases e bacteriocinas de *Bacillus* sp., obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos de proteínas de ervilha e soja usando proteases, e avaliação da atividade antimicrobiana.

2. Específicos

- Estudo da produção de bacteriocinas de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e *Bacillus subtilis* e avaliação da atividade antimicrobiana
- Produção de proteases de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e *Bacillus subtilis*;
- Obtenção de hidrolisados proteicos de ervilha e soja utilizando proteases de *Bacillus licheniformis* LBA 46 e *Bacillus subtilis* e proteases comerciais;
- Avaliação das atividades antimicrobianas das bacteriocinas e hidrolisados produzidos contra bactérias e fungos patogênicos de origem alimentar.

Introdução

Agentes antimicrobianos como os antibióticos, desinfetantes e conservantes são amplamente utilizados no controle ou morte de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes. Porém o uso exagerado dessas substâncias pode acarretar na resistência dos micro-organismos, sendo considerada uma grande preocupação para as organizações de saúde (ZHOU *et al.*, 2015; ABUSHAHEEN *et al.*, 2020). Desta forma pesquisas têm sido realizadas visando a descoberta de novas substâncias com potencial antimicrobiano, bem como a compreensão dos diferentes mecanismos de ação que possam estar associados (KHAMENEH *et al.*, 2016).

Devido às exigências dos consumidores por produtos livres de conservantes, seguros e com qualidade elevada, as substâncias naturais que apresentam potencial preventivo vêm sendo pesquisadas em substituição aos produtos sintéticos e semi-sintéticos (RIZZELLO *et al.*, 2015). Entre as substâncias

naturais, peptídeos bioativos podem ser obtidos de proteínas de fontes animais e vegetais, por meio de hidrólise enzimática, utilizando proteases comerciais ou produzidas por micro-organismos (HOU *et al.*, 2017; PINA-PÉREZ; FERRÚS PÉREZ, 2018). O uso de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos como conservantes naturais em alimentos têm sido descritos na literatura.

Uma classe de peptídeos bioativos, são as bacteriocinas, compostos antimicrobianos produzidos por fermentação de algumas bactérias, como as dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e alguns tipos de *Bacillus* (MARTINEZ *et al.*, 2013; FAGUNDES *et al.*, 2017; PEI *et al.*, 2020; QIAO *et al.*, 2020). Essas substâncias são excretadas por alguns micro-organismos para o meio de cultivo e podem ser coletadas para posterior purificação e aplicação. Embora existam inúmeras bacteriocinas, sua aplicação em alimentos ainda é limitada, pois nem todas têm seu uso permitido pela ANVISA e FDA. Bacteriocinas de algumas espécies de *Bacillus* podem ser conservantes alimentares promissores, uma vez que seu amplo espectro inibitório e sua estabilidade superam as limitações das bacteriocinas das bactérias lácticas (LEE & CHANG, 2018).

Revisão Bibliográfica

1. Bacteriocinas de *Bacillus* sp.

Diversos estudos mostram o uso de bactérias do gênero *Bacillus* como agentes de biocontrole ou produtores de substâncias antimicrobianas. As bactérias do gênero tendem a exibir a capacidade de ocupar nichos distintos de forma eficiente e apresentar uma grande versatilidade fisiológica, com destaque para a espécie *Bacillus subtilis* (FILHO, FERRO, PINHO, 2010). Linhagens de *Bacillus amyloliquefaciens* (LISBOA *et al.*, 2006), *Bacillus cereus* (BIZANI *et al.*, 2005; NACLERIO *et al.*, 1993), *Bacillus licheniformis* (CLADERA-OLIVEIRA *et al.*, 2004) e *Bacillus thuringiensis* (CHERIF *et al.*, 2001) foram descritas como produtoras de peptídeos apresentando um amplo espectro de atividade antimicrobiana e com uso potencial como bioconservantes em alimentos. No entanto, algumas linhagens de *Bacillus* sp podem produzir toxinas e esses metabólitos devem ser testados. Linhagens de *Bacillus subtilis* foram descritas como produtoras de peptídeos com atividade antimicrobiana como a subtilosina, subtilina, sublancina, surfactina, bacilisina, bacilisocina, iturinas e TasA (TAMEHIRO *et al.*, 2002).

2. Características, modo de ação e aplicações de bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos bioativos capazes de inibir ou controlar o crescimento de outras bactérias, como as patogênicas que promovem decomposição, sendo que as células produtoras são imunes às suas próprias bacteriocinas. A síntese de bacteriocinas pode ocorrer em todas as fases de crescimento da bactéria. Muitas vezes são produzidas em condições de estresse ou competição, como o aumento populacional, crescimento de espécies diferentes e a escassez de nutrientes, podendo ser afetada pela fonte de carbono, nitrogênio e fosfato presentes no meio, ou até mesmo por alguns inibidores (RILEY, 2011; SAVADOGO *et al.*, 2006). Diversos micro-organismos produtores de bacteriocinas são descritos na literatura como bactérias ácido lácticas e também *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Bacillus* sp.

Em geral, as bacteriocinas apresentam alta resistência ao calor e ao pH baixo, e alta sensibilidade às enzimas proteolíticas humanas tornando-as relativamente seguras ao consumo e, em consequência, uma boa alternativa para os conservantes alimentícios (PAULA *et al.*, 2014). Normalmente apresentam baixa massa molecular (não ultrapassando 10 KDa), são moléculas catiônicas e anfipáticas (ZACHAROF; LOVITT, 2012). Diversas bacteriocinas já foram caracterizadas, entre elas lactocinas, lactococinas, plantaricinas, pediocinas, enterocinas, nisina. A nisina, por exemplo, possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, como, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus* spp., *Microcococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp., por isso tem sido utilizada como um bom conservante alimentar (CHEIGH *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2017). Porém, a classificação das bacteriocinas ainda é bastante controversa, podendo ser classificadas quanto à estrutura, propriedades físico-químicas, número de peptídeos que compõem sua atividade, modo de ação (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

A maioria das bacteriocinas age por meio da interação com lipídeos aniônicos da membrana plasmática das bactérias alvo, sendo que estas são geralmente Gram-positivas, uma vez que possuem

lipídeos na membrana. A bacteriocina permeabiliza a membrana por meio da formação de poros dissipando a força próton motora, envolvida em vários processos da membrana citoplasmática, e inibindo o transporte de aminoácidos na bactéria alvo. As bacteriocinas que atuam sobre bactérias Gram-negativas agem transpondo a membrana externa da parede celular para alcançar a membrana plasmática, onde são capazes de interferir na síntese de DNA, RNA e proteínas (ZACHAROF; LOVITT, 2012; GUILHELMELLI et al., 2013; COTTER *et al.*, 2013).

3. Hidrolisados proteicos e peptídeos com atividade antimicrobiana

Hidrolisados proteicos têm sido obtidos a partir de fontes de proteína vegetal ou animal usando proteases de diferentes fontes e especificidade. A aplicação de proteases apresenta vantagens como maior controle do processo e melhora nas propriedades funcionais. Considerando que os hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos apresentam diferenças na composição, sequência de aminoácidos e no tamanho molecular, a fonte de proteína inicial, escolha adequada da protease em relação a fonte e especificidade ou modo de ação, as condições do processo e grau de hidrólise são fatores importantes para obtenção de peptídeos bioativos, visto que influencia suas características funcionais (KIM; PARK; RHEE, 1990, KIM et al., 2007, ZAVAREZE *et al.*, 2009, PUTRA *et al.*, 2018). Os hidrolisados proteicos e peptídeos diferenciam-se pela massa molecular, composição e sequência de aminoácidos (PUTRA *et al.*, 2018), características que podem influenciar em algumas de suas bioatividades, como antioxidantes e antimicrobianas (AGUILAR *et al.*, 2019; AGUILAR *et al.*, 2020; RODRIGUES NETA & CASTRO, 2020).

Peptídeos antimicrobianos podem ser obtidos a partir da hidrólise de proteínas de leguminosas. FRANCO et al. (2006) isolaram o peptídeo Cp-tionina de hidrolisado de proteínas do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), que apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativa (*Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*). Cruz (2017) descreveu a hidrólise de proteínas do soro de queijo bovino utilizando Alcalase®, para obtenção, purificação e avaliação das propriedades biológicas de peptídeos bioativos. Os peptídeos com hidrofiliabilidade intermediária apresentaram maior atividade antibacteriana para as bactérias testadas (*Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*). O autor observou também que somente os peptídeos de hidrofiliabilidade intermediária foram capazes de ter algum efeito sobre o fungo testado. Salami *et al.* (2010) observaram que os peptídeos menores mostraram maior atividade antimicrobiana e sugeriram que estes se ligam mais facilmente aos lipídeos da membrana celular das bactérias.

Estudos sobre a aplicação de hidrolisados proteicos e peptídeos antimicrobianos em alimentos, como substitutos dos conservantes sintéticos, como o propionato de cálcio, têm sido descritos na literatura. Rizzello *et al.* (2017) aplicaram hidrolisados de ervilha, feijão fava e lentilha como ingredientes para a fabricação de um pão de trigo e conseguiram estender sua vida de prateleira em até 21 dias, sem alterar as características reológicas e sensoriais. Já Luz *et al.* (2020) utilizaram peptídeos bioativos obtidos da hidrólise das proteínas do soro de leite caprino com atividade contra diversos fungos do gênero *Penicillium* como ingrediente na formulação de pão sírio e prolongaram o tempo de prateleira do produto.

4. Proteases e lise enzimática de micro-organismos

Proteases podem atuar como enzimas que lisam a parede celular de bactérias, e são essenciais no desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, visto que essas geralmente são acumuladas no interior das células, e para sua utilização, devem ser extraídas da bactéria que a produz (BHAGWAT *et al.*, 2020). As proteases de *Bacillus licheniformis* podem ser usadas para a lise de *Xanthomonas campestris*, facilitando a obtenção de goma xantana do meio fermentado (CONTESINI, 2014).

Antimicrobianos convencionais, como antibióticos de amplo espectro, têm apresentado problemas como falta de especificidade contra agentes microbianos, desenvolvimento de resistência e ineficiência em eliminar biofilmes (BHAGWAT *et al.*, 2020). Por outro lado, as enzimas que lisam paredes celulares são altamente seletivas pois são capazes de reconhecer e agir sobre seu alvo de forma eficiente (FISCHETTI, 2018). Ademais, possuem vantagens como baixa probabilidade de gerar resistência, eficiência contra biofilmes e ação mais rápida e potente, quando comparada aos antibióticos comuns (HADDAD KASHANI, *et al.*, 2018).

Referências Bibliográficas

- ABUSHAHEEN, M. A, MUZAHEED, A. J. FATANI et al., Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance, **Disease-a-Month**, <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- AGUILAR, J. G. DOS S.; DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production of antioxidant peptides from pea protein using protease from *Bacillus licheniformis* LBA 46. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 435–443, 2020.
- AGUILAR, J. G. DOS S.; GRANATO CASON, V.; DE CASTRO, R. J. S. Improving antioxidant activity of black bean protein by hydrolysis with protease combinations. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 34–46, 2019.
- BHAGWAT, A.; MIXON, M.; COLLINS, C. H. et al. Opportunities for broadening the application of cell wall lytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 9019-9040, 2020.
- BIZANI, D. et al., Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **International Microbiology**, Barcelona, v.8, p.125- 131, 2005.
- CHEIGH, C.; CHOI, H.; PARK, H.; KIM, S.; KOOK, M.; KIM, T.; HWANG, J.; PYUN, Y. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* a164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, v. 95, p. 225–235, 2002.
- CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFONCCHIO, D.; CHERIF, H.; BEN SLAMA, K.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7, a new strain isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, p.234-247, 2001.
- CLADERA-OLIVEIRA, 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.
- CONTESINI, F. J. **Produção, caracterização e aplicação de proteases de Bacillus sp.** São Paulo: Brasil, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Tese de Doutorado, 2014.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, London, n. 11, p. 95-105, 2013.
- CRUZ, C. Z. P. **Imobilização de Alcalase em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos.** 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 55; 72-77p. 2017.
- FAGUNDES, P. C. et al. Genetic and biochemical characterization of hyicin 3682, the first bacteriocin reported for *Staphylococcus hyicus*. **Microbiological Research**, v. 198, n. 1, p. 36–46, 2017.
- FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- FISCHETTI, V. A. Development of phage lysins as novel therapeutics: a historical perspective. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 310, 2018.
- FRANCO, O.L.; MURAD, A.M.; LEITE, J.R.; MENDES, P.A.; PRATES, M.V.; BLOCH, C. JR. Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. **Febs J.**, v.273, n.15, p.3489-3497, 2006.
- GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, L. S.; SILVA-PEREIRA, I.; KYAW, C. M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 1-12, 2013.
- HADDAD KASHANI, H., SCHMELCHER, M., SABZALIPOOR, H. et al. Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: current status of research and novel delivery strategies. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, 2018.
- HOU, Y. et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 24, p. 1–13, 2017.
- KHAMENEH, B. et al. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, n. 1, p. 32–42, 2016.
- KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A. et al. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4033-4042, 2007.
- KIM, S.; PARK, P.; RHEE, K. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, ACS Publications, 38, 651-656, 1990.
- LEE, S. G.; CHANG, H. C. Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 8–15, 2018.
- LISBOA, M.P.; BONATTO, D.; BIZANI, D.; HENRIQUES, J.A.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Brazilian Atlantic forest. **Industrial Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.9, p.111-118, 2006.
- LUZ, C. et al. Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, n. 1, p. 108717, 2020.

MARTINEZ, F. A. C. et al. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 1, p. 482–488, 2013.

NACLERIO, G. et al. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.12, p.4313-4316, 1993.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais da bacteriocinas. **Brazilian Journal and Food Technology**, Campinas – SP, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

PAULA, A. T.; CENEVIVA, A. B. J.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G.M.; CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X.; PENNA, A. L. B. Leuconostoc mesenteroides SJRP55: A bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, p.186–197, 2014.

PEI, J. et al. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. **Food Control**, v. 110, n. 1, p. 106923, 2020.

PINA-PÉREZ, M. C.; FERRÚS PÉREZ, M. A. Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 72, n. 1, p. 114–124, 2018.

PUTRA, S. N. K. M.; ISHAK, N. H.; SARBON, N. M. Preparation and characterization of physicochemical properties of golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) protein hydrolysate as affected by different proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 123–128, 2018.

QIAO, X. et al. Purification, characterization and mode of action of enterocin, a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* TJUQ1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, n. 1, p. 151–159, 2020.

RILEY, M. A. Bacteriocin mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. (Eds.). **Prokaryotic antimicrobial peptides**. London: Springer, 2011. p. 13-26.

RIZZELLO, C. G. et al. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. **Food Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 72–82, 2017.

RIZZELLO, C. G. et al. Long-term fungal inhibition by *Pisum sativum* flour hydrolysate during storage of wheat flour bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 12, p. 4695–4206, 2015.

RODRIGUES NETA, I. M.; DE CASTRO, R. J. S. Enzyme-assisted extraction of biocomponents of lentils (*Lens culinaris* L.): Effect of process parameters on the recovery of compounds with antioxidant properties. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 1, p. 15–23, 2020.

SALAMI, M. et al. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3297-3302, 2010.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria: a minireview. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 5, p. 678-683, 2006.

SHI, C.; ZHANG, X.; ZHAO, X.; MENG, R.; LIU, Z.; CHEN, X.; GUO, N. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **Journal Food Control**, v. 71 p. 10-16, 2017.

TAMEHIRO, N. et al. Bacilosin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.46, n.2, p.315-320, 2002.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. **Asia-Pacific Chemical Biological and Environmental Engineering Society**, Hong Kong, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M. et al. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.

ZHOU, G. et al. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 21711–21733, 2015.