

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR *Leuconostoc spp. 99*

GRACIELE DAIANA FUNCK¹; JULIANA DE LIMA MARQUES²; CARLA POHL SEHN³; CLAUDIO EDUARDO DOS SANTOS CRUXEN⁴; VLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel - gracifunck@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – UFPel - ju_marques@hotmail.com

³Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA - carlasehn@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – UFPel - cbrcruxen@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – UFPel - silvawp@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – UFPel - angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos passaram a serem vistos como sinônimos de bem-estar, redução de riscos de doenças, assim como meio para uma melhor qualidade de vida. Há uma tendência geral e aumento do consumo daqueles alimentos que tenham sido submetidos a tratamentos tecnológicos menos drásticos, preparados com poucos, ou mesmo sem aditivos sintéticos e com baixo teor de ácidos, açúcares, sais e gorduras (CASABURI et al., 2016).

Apesar das diversas tecnologias para a conservação de alimentos já disponíveis, ainda é um desafio para os pesquisadores encontrar uma substância conservadora que apresente baixa toxicidade e mantenha as características sensoriais desejáveis em alimentos. Com isso, fica evidente a necessidade de se desenvolver alternativas de conservação para que, aliadas às tecnologias existentes, possibilite disponibilizar alimentos de qualidade e seguros à população. Para isto, os bioconservantes são uma alternativa bastante promissora.

A bioconservação é uma técnica utilizada para estender a vida útil dos alimentos e aumentar a sua segurança por meio da aplicação de uma microbiota protetora ou de seus metabólitos (ROSS et al., 2002). A fermentação por bactérias ácido-láticas (BAL) é uma forma de bioconservação utilizada há muito tempo. O principal efeito bioprotetor de BAL é a taxa de acidificação que promove uma ação antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias deteriorantes e patogênicas (LEROY et al., 2006). Além dos ácidos orgânicos, BAL produzem outras substâncias inibitórias, como bacteriocinas.

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antimicrobianas sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular, que apresentam ação antimicrobiana sobre diversos micro-organismos (JACK et al., 1995). As bacteriocinas de BAL oferecem muitas propriedades desejáveis que as tornam adequadas para a utilização na conservação de alimentos: são geralmente conhecidas como substâncias seguras, não são ativas ou citotóxicas em células eucarióticas, são inativadas por enzimas digestivas (proteases), tendo pouca influência sobre a microbiota intestinal, são normalmente tolerantes ao pH baixo e ao aquecimento, tem espectro antimicrobiano contra muitas bactérias patogênicas e deteriorantes, apresentam modo de ação bactericida e/ou bacteriostático, normalmente seu alvo é a membrana citoplasmática, não apresentam resistência a antibióticos e seus determinantes genéticos são geralmente codificados em plasmídeos, facilitando a manipulação genética (GÁLVEZ et al., 2007).

Sabe-se que os alimentos industrializados disponíveis no mercado passam por diversos tipos de tratamentos durante sua fabricação. Portanto, para que uma

bacteriocina possa ser aplicada e mantenha seu efeito protetor, esta deve resistir aos diversos processos aos quais os alimentos são submetidos, como por exemplo, tratamento térmico, refrigeração, congelamento, baixo pH e, ainda, a outras substâncias químicas que possam estar presentes no alimento ou ser utilizadas no processo de obtenção destas.

Portanto, objetivou-se avaliar a estabilidade de um sobrenadante livre de células (SLC) contendo substâncias de origem proteica (bacteriocinas) produzidas por um isolado de *Leuconostoc* spp. 99 proveniente de presunto cozido quanto a estabilidade térmica, a refrigeração, ao congelamento, a diferentes pH e a diferentes substâncias químicas.

2. METODOLOGIA

Para obtenção do SLC, uma alíquota da cultura de *Leuconostoc* spp. 99 de 24 h contendo 10^7 células/mL foi adicionada à 35 mL de caldo MRS. A seguir, procedeu-se a incubação por 18 h a 35 °C em incubadora com agitação orbital sob agitação constante (100 oscilações por minuto). Após este período, a cultura foi centrifugada a 6.800 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e seu pH neutralizado com NaOH 1 M. Um tratamento térmico a 80 °C por 10 minutos foi realizado para eliminar proteases extracelulares e H₂O₂. A seguir, o SLC foi esterilizado por membrana (0,22 µm) e armazenado a - 20 °C para posterior realização dos testes (BISCOLA et al., 2013).

Para avaliar a estabilidade ao tratamento térmico, alíquotas de 200 µl do SLC foram submetidas as temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C em banho-maria por 30 minutos e 121 °C por 10 e 20 minutos em autoclave. A estabilidade a refrigeração e ao congelamento do SLC foi avaliada utilizando alíquotas de 200 µl que foram incubadas por dois meses as temperaturas de 4 °C e - 20 °C, respectivamente. Alíquotas de 200 µl do SLC foram incubadas com 200 µl de solução tampão de pH entre 2 e 10 a 35 °C por 2 h em banho-maria para avaliar a estabilidade aos diferentes pH. A ação dos agentes químicos sob a estabilidade da substância antimicrobiana foi analisada pela adição de 10 % (v/v ou m/v) de Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114, SDS, ureia e cloreto de sódio (NaCl) a alíquotas de 1 mL de SLC. Os mesmos foram incubados a 37 °C por 30 min (FAVARO et al., 2014).

Após os tratamentos, a atividade remanescente foi testada de acordo com a técnica de difusão em ágar como descrito por LEWUS E MONTVILLE (1991), utilizando *L. monocytogenes* Scott A como linhagem de referência. Como controle, SLC sem tratamento foi utilizado para posterior cálculo da atividade antimicrobiana residual. As placas foram incubadas por 18 h a 35 °C. Os halos foram medidos em milímetros. O experimento foi realizado em duplicata. A fórmula utilizada para calcular a atividade residual em porcentagem foi:

$$A.R. (\%) = \frac{HT \times 100}{HC}$$

Sendo: HT = Halo do sobrenadante após tratamento (mm)

HC = Halo do controle (mm)

A.R. = Atividade Residual

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O SLC manteve sua atividade antimicrobiana estável até 90 °C (100 %). A atividade residual aos 100 °C, 121 °C por 10 minutos e 20 minutos foi de 96,43 %, 89,29 % e 82,14 %, respectivamente. A estabilidade ao tratamento térmico é uma característica das bacteriocinas provenientes da classe II. PAULA et al. (2014) observaram em seu trabalho que a atividade antimicrobiana de uma bacteriocina produzida por *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi mantida em temperaturas até 100 °C por 2 h, tendo um decréscimo após tratamento a 121 °C por 20 minutos. XIRAPHI et al. (2008) verificaram a estabilidade térmica do SLC da bacteriocina de *L. mesenteroides* E131 e observaram que esta é bastante estável, uma diminuição da atividade (40 %) foi detectada apenas quando foi submetida as temperaturas de 90 e 100 °C.

Nas duas primeiras semanas de armazenamento, tanto o SLC refrigerado como o congelado, mantiveram sua máxima atividade antimicrobiana. Da terceira a quinta semana, houve uma diminuição na atividade (3,57 %) para os dois sobrenadantes. Na sexta, sétima e oitava semana de armazenamento, o sobrenadante congelado reduziu sua atividade em 10,8 % e o refrigerado em 14,4 %. XIRAPHI et al. (2008) observaram que o SLC proveniente de um isolado de *L. mesenteroides* teve uma redução de 60 % na sua atividade após seis semanas de armazenamento a 4 °C. Quando este SLC foi submetido ao congelamento a – 20 °C pelo mesmo período, a redução da atividade antimicrobiana foi apenas de 20 %.

O SLC teve uma redução de 7,2 % na atividade quando submetido aos pH 7 e 8. Nos pH 2, 3, 4, 5, 6 e 9, a redução foi de 10,7 % e em pH 10 de 14,3 %. A estabilidade a baixos pH é muito importante para que as bacteriocinas possam ser aplicadas em alimentos, principalmente em fermentados, nos quais prevalecem as condições ácidas, o que pode ser observado neste estudo. PAULA et al. (2014) e XIRAPHI et al. (2008) também observaram estabilidade a baixos pH quando estes testaram bacteriocinas provenientes de linhagens de *Leuconostoc* spp..

O SLC quando submetido ao tratamento com Tween 80, Triton X-100 e Triton X-114, manteve sua atividade máxima. O tratamento com Tween 20 reduziu a atividade do SLC em 5 % e os tratamentos com SDS, Uréia e NaCl reduziram a sua atividade em 10 %. PAULA et al. (2014) trataram uma bacteriocina proveniente de um isolado de *L. mesenteroides* SJRP55 com os mesmos agentes químicos testados neste trabalho e observaram que a bacteriocina teve sua atividade mantida após estes tratamentos.

4. CONCLUSÕES

Podemos concluir que o SLC produzido pelo isolado *Leuconostoc* spp. 99 foi estável a todas às condições submetidas. Este resultado é importante para a aplicação deste SLC como antimicrobiano em alimentos ácidos ou que sofrerão tratamento térmico. Ainda, a estabilidade a refrigeração, ao congelamento e aos agentes químicos é necessária para processos de obtenção e armazenamento desta substância antimicrobiana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISCOLA, V.; TODOROV, S. D.; CAPUANO, V. S. C.; ABRIQUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B. D. G. M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, England, v. 93, n. 3, p.607–613, 2013.
- CASABURI, A.; DI MARTINO, V.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, L.; VILLANI, F.. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. **Food Control**, England, v. 59, p. 31–45, 2016.
- GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B.. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 31, n. 120, p. 51–70, 2007.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B.. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, United States, v. 59, n. 2, p.171–200, 1995.
- LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L.. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 13, n. 106, p.270–285, 2006.
- LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J.. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 13, p.145–150, 1991.
- MORI, M. T. S. S.. **Aplicação de nisina em envoltório celulósico para mortadela.** 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Engenharia Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá 14 de Tecnologia, São Caetano do Sul.
- PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CHOISET, Y.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.; DOUSSET, X.; PENNA, A. L. B.. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Water Buffalo Mozzarella Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, United States, v. 6, n. 3-4, p.186-197, 2014.
- ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C.. Preservation and fermentation: Past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 79, p.3–16, 2002.
- XIRAPHI, N.; GEORGALAKI, M.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; TSAKALIDOU, E.; DROSONIS, E. H.. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, Netherlands, v. 80, p.194–203, 2008.