

Bacteriocinas produzidas por bactéria ácido láctica isoladas de leite cru e aplicação em filme biodegradável de amido

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk and application to biodegradable starch film

RESUMO

Bruno Seben de Almeida
brualm@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Luciana Furlaneto Maia
lumaia_2007@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

A conservação dos alimentos é uma questão sempre atual, e é crescente a busca por alternativas mais naturais, uma vez que a maioria dos produtos alimentícios industrializados se utilizam de conservantes químicos artificiais. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos com ação comprovada como conservantes microbiológicos naturais. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bacteriocinas provenientes de leite cru e avaliar a atividade bacteriocinogênica de enterocina em filmes biodegradáveis. O isolado identificado como *Enterococcus sp* MF5 foi quem melhor apresentou resultados contra bactérias Gram positivas e negativas. O filme biodegradável foi preparado com amido de milho nas concentrações de 2%, 4% e 6%. A atividade antimicrobiana da bacteriocina incorporada no filme foi realizado pela técnica *spot on lawn*, contra a bactéria teste *Listeria monocytogenes*. Como resultado foi obtido que independente do porcentual de amido utilizado, houve difusão da enterocina incorporada no filme biodegradável, apresentando assim um potencial de aplicação na conservação de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Bacteriocinas. Aditivos. Amido de Milho.

Bruno Seben de Almeida, brualm@alunos.utfpr.edu.br, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Luciana Furlaneto Maia lumaia_2007@hotmail.com, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Food conservation is an ever-present issue, and the search for more natural alternatives is growing, as most industrialized food products use artificial chemical preservatives. Bacteriocins are antimicrobial peptides with proven action as natural microbiological preservatives. The objective of this work was to isolate and characterize bacteriocins from raw milk and to evaluate the bacteriocinogenic activity of enterocin in biodegradable films. The isolate identified as *Enterococcus sp* MF5 presented the best results against Gram positive and negative bacteria. The biodegradable film was prepared with corn starch at concentrations of 2%, 4% and 6%. The antimicrobial activity of the bacteriocin incorporated in the film was performed by spot on lawn technique against the test bacteria *Listeria monocytogenes*. As a result, it was obtained that, regardless of the starch percentage used, there was diffusion of enterocin incorporated in the biodegradable film, thus presenting a potential application in food preservation.

KEYWORDS: Bacteriocin. Additives. Corn starch

INTRODUÇÃO

Cada vez mais o consumidor vem se tornando mais atento à lista de ingredientes de alimentos em busca de aditivos químicos e substâncias prejudiciais à saúde. Torna-se então um chamado unânime à indústria da área para buscar alternativas naturais e mais saudáveis do que as tradicionais, sem é claro perder as características de segurança e qualidade do produto (KAVISOGLU e ÇOSKUN, 2016).

Uma alternativa natural aos já usuais conservantes químicos na indústria de alimentos são a bacteriocinas. Elas são metabolitos primários de bactérias, peptídeos sintetizados nos ribossomos que inibem o crescimento de muitas bactérias Gram-positivas, incluindo vários agentes patogênicos como a *Listeria monocytogenes* (SCHUELER, 2017). A legislação brasileira já prevê a adição da bacteriocina Nisina como conservante de alimentos. (BRASIL, 1996)

Do amplo grupo das bacteriocinas, pode-se destacar as enterocinas que são as bacteriocinas produzidas por algumas bactérias do gênero *Enterococcus*. Essa classe de bacteriocina é catiônica, resistente a ampla faixa de pH e temperatura e é destruída pelas proteases na digestão, tornando a sua aplicação viável como conservante de alimentos (TOSONI, 2019).

As bacteriocinas podem ser utilizadas nos alimentos de duas formas: pela inoculação do isolado bacteriocinogênico como uma cultura bioprotetora; ou pela adição de bacteriocina produzida e concentrada (SCHUELER, 2017).

Outra forma de conservação de alimentos muito utilizada é a da película protetora, uma espécie de atmosfera modificada, que ajuda a preservar o alimento de impacto e minimizando a perda de umidade, além de dar características agradáveis aos olhos do consumidor. Essa película protetora pode ser comestível, feita de geleificações de amido como o amido de milho. Essa película é aplicada em camada sobre o alimento e passa por processo de secagem. (SANTOS et al., 2011)

Esse tipo de conservação é muito viável em comparação a outras formas de conservação, como embalagens, por serem biodegradáveis e comestíveis, oferecendo menor impacto ambiental e facilidade ao consumidor (Ibidem).

A viabilidade da união das duas tecnologias de conservação de alimentos, a película protetora, ou biofilme comestível, com a bacteriocina já foi constatada por Souza et al. (2017), utilizando-se de biofilme de gelatina e bacteriocina produzida por bactérias do gênero *Lactobacillus*. Os autores apresentaram a ação da bacteriocina incorporada à película protetora como um promissor conservante natural.

O presente trabalho visou isolar bacteriocinas provenientes de Bactérias Ácido-láticas (BALs) e demonstrar a viabilidade do uso dessa bacteriocina em filme biodegradável de amido de milho em diferentes concentrações com amostra de bacteriocinas (enterocina), como agente de inibição do crescimento de bactérias isoladas de *Listeria monocytogenes*.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi conduzido utilizando amostras de leite produzidos na região norte do estado do Paraná-Brasil. para o isolamento das BAL seguiu o protocolo descrito por Harrigan, (1998), com modificações. Vinte e cinco ml de cada amostra foram depositadas em frascos contendo 225ml de solução peptonada 0,1%, seguido de diluições seriadas e plaqueamento em ágar *Man Rogosa Sharp* (MRS) (Himedia). As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

A atividade antagonista foi determinada pela técnica da sementeira, descrita por Ogaki et al (2016). Foram selecionadas 9 colônias de BAL e semeados em ágar MRS e incubado a 37°C por 24. posteriormente, foi adicionado clorofórmio nas tampas das placas, deixando agir por 40 minutos; em seguida o clorofórmio residual foi removido mantendo as placas abertas. As placas receberam uma sobrecamada de meio MRS soft ágar (0,7%) contendo cada linhagem indicadora em uma concentração de 106 UFC/ml, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os microrganismos testes utilizados foram *Listeria monocytogenes* CDC 4555, *Listeria innocua* CLIP 12612, *Escherichia coli* enterotoxigênica bac 49 It e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

Os isolados de BAL que apresentaram atividade antagônica para uma das bactérias teste foram identificados através de testes fenotípicos e genotípicos por Tosoni (2019).

Para obtenção da bacteriocina, utilizou-se o isolado identificado *E. durans* MF5. Cultura deste isolado incubada sob agitação 180rpm a 37°C por 24 h. Decorrido este tempo, a cultura foi centrifugada por 10min a 8.000rpm em temperatura ambiente para a precipitação das células. O sobrenadante então teve seu pH regulado para 6,5 utilizando se um potenciômetro calibrado e solução de NaOH 0,5N para a correção, o mesmo então foi esterilizado por filtração em filtros de 0,22µm de porosidade, obtendo assim o Sobrenadante livre de célula (CFS).

Para o teste de ensaio antagônico da enterocina, 20 mL de MH (*MuellerHinton*/Himedia) soft ágar foi inoculado com a bactéria indicadora *L. innocua* na concentração final correspondente à escala 4 de *McFarland* (12 x 10⁸ células/mL). Este inóculo foi transferido para uma placa de Petri, e após a solidificação foram feitos 3 poços de aproximadamente 5mm de diâmetro. Em cada poço, foi adicionado 45µL do CFS neutralizado.

O preparo do filme biodegradável de amido de milho foi realizado na concentração de 2, 4 e 6%. O amido foi pesado assepticamente e hidratado em água estéril. A mistura foi levada ao aquecimento por 5 minutos em placa de aquecimento com agitação magnética para promover a gelatinização do amido. Após a geleificação (transparência do amido) foi acrescentado 2/3 (v/v) de CFS.

Para o teste de atividade antimicrobiana foram preparadas placas de meio BHI 0,8% ágar inoculadas da cultura de *L. monocytogenes* na concentração de 106 UFC. No meio de cultura já solidificado foram feitos poços com o auxílio de ponteira descartável estéril de 1ml.

Em cada poço foi acrescentado o volume de 100µl, sendo o primeiro correspondente ao controle (somente amido geleificado), e as concentrações de filme contendo enterocina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, e o halo de inibição foi observado e medido com o auxílio de uma régua milimetrada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram testadas 9 colônias provenientes do isolamento a partir de leite cru. Uma colônia destacou-se por inibir todos os microrganismos testados, sendo identificada como *Enterococcus durans* MF5 (Figura 1 A).

No teste de antagonismo da enterocina (bacteriocina) isolada do meio, os resultados se mantiveram (Figura 1B). Ainda, Tosoni (2019) comprovou que se tratava de um peptídeo.

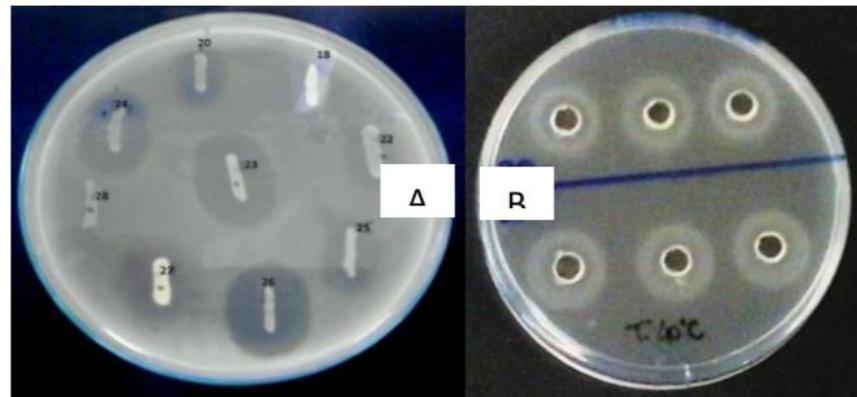


Figura 1 – (A) teste spot on lawn para antagonismo contra bactérias teste. Destaque para o halo de inibição ao redor dos isolados de BAL. (B) teste do poço difusão contendo enterocina. Destaque para o halo de inibição formado ao redor do poço.

Fonte: Autoria própria (2019)

O potencial antimicrobiano da mistura de CFS de bactérias produtoras de bacteriocinas com biofilme comestível de amido de milho foi analisado pela medição dos halos de inibição. Como é possível observar na figura 2, na área do controle negativo (filme de amido puro) não há nenhuma inibição, porém na área com o CFS puro é notório o halo inibitório, assim como nas misturas com amido nas diferentes concentrações.

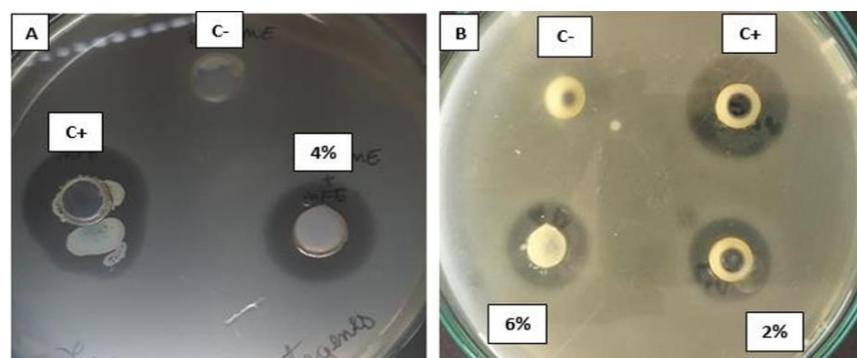


Figura 2 – Teste de antagonismo de filme de amido contendo enterocina contra *Listeria monocytogenes*. (A) Primeira placa com controle negativo [C-], controle positivo [C+] e mistura de CFS e biofilme 4% de amido [4%]; (B) Segunda placa com controles positivo [C+] e negativo [C-] e mistura de CFS e biofilme 2% e 6% de amido [2% e 6%].

Fonte: Autoria própria (2019)

Os diâmetros dos halos inibitórios foram medidos com os poços das ponteiros, que por sua vez medem 9mm de diâmetro. A medida total e descontada o buraco dos poços é apresentado no quadro 1.

Quadro 1 – Medição dos halos inibitórios no teste de antagonismo

Amostra	Diâmetro do halo contando o poço (mm)	Diâmetro do halo descontado do poço (mm)
Enterocina pura	24	15
Filme puro (4% amido)	0	0
Enterocina+filme (2% amido)	19	10
Enterocina+filme (4% amido)	20	11
Enterocina+filme (6% amido)	18	9

Fonte: A autoria própria (2019).

Pelos resultados obtidos, podemos verificar que mesmo a enterocina pura tendo uma ação mais eficaz no antagonismo contra a bactéria teste, quando a mesma é adicionada à solução de filme de amido ainda apresenta resultados significativos.

Destaca-se a ação inibitória da amostra de Enterocina+filme a 4% de amido, pois com uma média concentração de amido permite uma boa gelatinização, garantindo uma textura desejável para um revestimento comestível e ainda apresentou um maior halo de inibição (20mm de diâmetro) se comparada com a amostra de outras misturas de enterocina e biofilme (19 e 18mm).

Os bons resultados de inibição de enterocina contra uma bactéria teste G+, como a *Listeria monocytogenes* - usada no presente trabalho - já foram constatados por Souza et al. (2017) em teste com *Sataphylococcus aureus* com filmes bioativos à base de gelatina.

A concentração de 4% de filme de amido foi citada como excelente para o revestimento comestível de frutos e vegetais como a manga por Santos et al. (2011), visando a manutenção das características físico-químicas e sensoriais do alimento.

CONCLUSÃO

Os resultados de isolamento de bactérias produtoras de enterocina a partir de leite cru mostrou resultados significativos. A enterocina isolado foi eficiente contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. O filme comestível de amido de milho na concentração 4% misturado à enterocina chamada MF5 mostrou ser eficiente, inibindo o crescimento da bactéria patógena *Listeria monocytogenes* e apresentando potencial de redução de perdas de massa e características físico-químicas do alimento por inferência da bibliografia.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, à Fundação Araucária e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Saúde, PORTARIA DETEN/MS Nº. 29, DE 22 DE JANEIRO DE 1996

KAVISOGLU, Serap e Çoşkun, Fatma. (2016). Determination Of The Level Of Knowledge Of Consumers About Food Additives. IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. 10. 53-56. 10.9790/2402-1008015356.

dos SANTOS, Ana Elisa O., de ASSIS, Joston S., BERBERT, Pedro A., dos SANTOS, Otanael O., BATISTA, Patrício F., GRAVINA, Geraldo de A., Influência de biofilmes de fécula de mandioca e amido de milho na qualidade pós-colheita de mangas 'Tommy Atkins'. Revista Brasileira de Ciências vol. 6, núm. 3, julio-septiembre, 2011, pp. 508-513 : Disponível em:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119021236020>> . Acesso em: 15 de jul. 2019.

SCHUELER, Janaina. Produção de enterocina utilizando soro de leite parcialmente desmineralizado e água de maceração de milho como substrato. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Brasil, 2019.

SOUZA, Nathieli, MORAES , Caroline C., SOUZA, Nathieli, CONTESSA, Camila R., GONÇALO, Guilherme B., MANERA, Ana Paula, MOUR, Catarina M. Produção de filmes bioativos através da adição de bacteriocina. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v.9, n.3, 2017. Disponível em: <<http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/29433/14948>>. Acesso em: 15 de jul. 2019.

TOSONI, Natara. Potencial antibacteriano de enterocinas em células planctônicas e em biofilme de Salmonella Typhimurium e sorotipos de Escherichia coli. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Brasil, 2019.