

POTENCIAL BACTERIOCINOGÊNICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE PRESUNTO COZIDO

JULIANA DE LIMA MARQUES¹; GUILHERME DA SILVA DANNENBERG²;
GRACIELE DAIANA FUNCK²; CLAUDIO EDUARDO DOS SANTOS CRUXEN²;
WLADIMIR PADILHA DA SILVA²; ÂNGELA MARIA FIORENTINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – ju_marques@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gui.dannenberg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gracifunck@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – cbrcruzen@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas de saúde pública que tem preocupado os consumidores é a emergência de micro-organismos resistentes aos antibióticos convencionais e o uso de aditivos químicos para conservação de alimentos processados. Neste contexto, a aplicação de um conjunto de técnicas e de processos que empregam organismos vivos ou substâncias providas destes, chamada de bioconservação, tem sido utilizada. O uso desta permite melhorar a qualidade do produto, controlar os processos e aumentar a vida útil e a segurança alimentar em todas as suas vertentes (CORBO et al., 2009). As bactérias ácido lácticas (BAL) têm participação importante na bioconservação de alimentos, ressaltando que algumas destas ainda são capazes de inibir o crescimento de determinados micro-organismos patogênicos que podem estar presentes nos alimentos (HERREROS et al., 2005).

As bacteriocinas são os peptídeos antimicrobianos sintetizados pelas BAL que podem reduzir essa microbiota indesejável (HANCOCK; SCOTT, 2000; ZASLOFF, 2002). A síntese de bacteriocinas no metabolismo bacteriano é maior no final da fase exponencial/início da fase estacionária e o seu declínio ocorre devido à degradação proteolítica (THOMAS et al., 2000).

A aplicação das bacteriocinas como bioconservantes nos alimentos pode se dar de duas formas: inoculação das BAL no alimento e consequente produção de bacteriocinas; e aplicação de bacteriocinas purificadas no produto (SCHILLINGER et al., 1996). Para a obtenção de sucesso na aplicação desses peptídeos, deve-se avaliar suas propriedades, como: estabilidade à temperatura, pH e espectro de ação. Visando à comercialização, é necessária a avaliação das bacteriocinas em relação aos principais fatores que serão encontrados nos alimentos, assim como os aspectos que proporcionarão sua produção otimizada, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial do alimento (NAVARRO et al., 2000).

BROMBERG et al. (2006) isolaram BAL bacteriocinogênicas de produtos cárneos e derivados, e detectaram resultados positivos da bacteriocina sintetizada por *Lactobacillus lactis* ssp. *hordniae* na redução e inibição de *L. monocytogenes*. Neste sentido, as bacteriocinas produzidas por BAL em produtos cárneos, como *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* spp. podem apresentar um potencial ainda maior como conservantes em alimentos. Atualmente, a única bacteriocina que é permitido o uso comercial em alimentos é a nisina, produzida pelo *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. No entanto, só é aplicada em queijos e superfície externa de salsichas (FORSYTHE, 2002).

Assim, os micro-organismos recomendados para uso como biconservadores são aqueles isolados da microbiota natural de produtos, pois tendem a ter capacidade metabólica mais bem adaptada a qualidade do produto.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi verificar o potencial bacteriocinogênico de isolados de BAL provenientes de presuntos cozidos comercializados em Pelotas/RS.

2. METODOLOGIA

Para confirmação do potencial bacteriocinogênico, os isolados (70) foram semeados em tubos contendo caldo MRS (*de Man, Rogosa e Sharpe*, Acumedia®) e incubados em aerobiose a 25°C por 24h. Após esse período, foram semeadas, de cada isolado, três alíquotas de 2µL em duas placas contendo 10mL de ágar MRS modificado (com 0,5% de dextrose) e incubadas em aerobiose a 25°C por 24h. Transcorrido esse período, foi adicionada uma sobrecamada de 8mL de BHI (*Brain Heart Infusion*, Acumedia®) semi-sólido (0,8% de ágar) com, aproximadamente, 10⁵UFC.mL⁻¹ de *Listeria monocytogenes* Scott A.

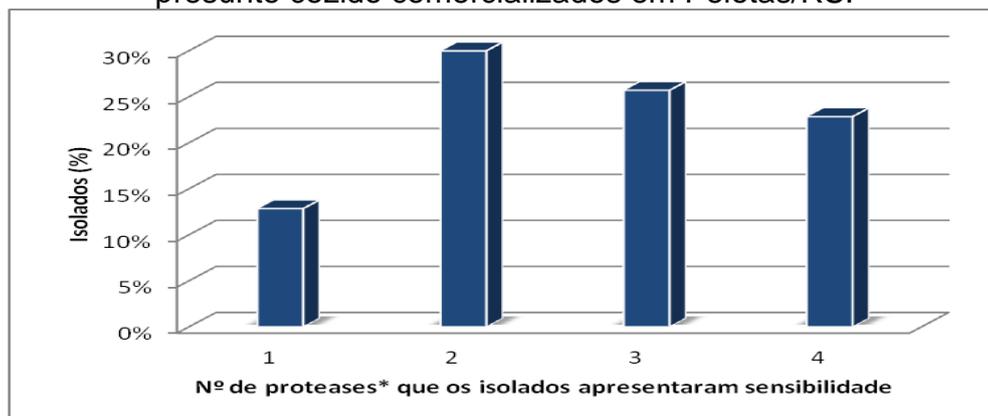
As placas ficaram expostas durante 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foram feitas cavidades de 3mm de diâmetro no ágar com 0,5cm de distância entre os crescimentos e acrescentados 20µL de solução de duas enzimas por placa. As enzimas utilizadas foram: pepsina (mucosa de estômago de suíno), quimotripsina (pâncreas bovino), proteinase K (*Tritirachium album*), e tripsina (pâncreas bovino). Como controle negativo, foram utilizados 20µL de água destilada estéril. As placas foram incubadas a 30°C por 24h.

A confirmação da produção de bacteriocinas pelos isolados se deu através da sensibilidade da substância produzida frente a uma ou mais enzimas testadas. A ausência de zona de inibição na região onde as soluções foram inoculadas indicou sensibilidade da cultura à solução e confirmou a natureza proteica da substância inibidora.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que dos 70 isolados submetidos ao teste, 9 (13%) apresentaram sensibilidade a uma das proteases, 21 (30%) à duas proteases, 18 (26%) à três proteases e 16 (23%) à quatro proteases (Fig. 1). Vale ainda salientar que 6 (9%) isolados não apresentaram sensibilidade a nenhuma das enzimas proteolíticas que foram testadas.

Figura 1. Potencial bacteriocinogênico de 70 isolados de BAL provenientes de presunto cozido comercializados em Pelotas/RS.



*enzimas: pepsina, proteinase K, quimotripsina e tripsina

Entretanto, quando há sensibilidade da substância antimicrobiana a uma protease, já ocorre inativação da substância, sendo possível inferir que a ausência de inibição do micro-organismo patogênico na presença de proteases caracteriza o composto produzido como uma bacteriocina (MONTVILLE; KAISER, 1993).

ARAUZ et al. (2009) ressaltam a necessidade de testar mais enzimas proteolíticas, já que a sensibilidade a mais de uma protease sugere a produção de mais de uma bacteriocina por cepa testada. Isso se dá pelo fato de que cada bacteriocina apresenta diferentes peptídeos em sua estrutura, e conseqüentemente sensibilidade a diferentes proteases. Com isso, avaliando somente o perfil de sensibilidade às proteases não se pode afirmar qual bacteriocina é sintetizada pelo isolado, pois como os resultados do presente estudo evidenciaram, os isolados podem ser sensíveis a uma ou mais enzimas proteolíticas e serem classificados como bacteriocinas diferentes.

Uma pesquisa desenvolvida por DAL BELLO (2010) detectou 9,8% dos isolados com potencial bacteriocinogênico frente a bactérias patogênicas ao isolar BAL de produtos cárneos. SCHITTLER (2012) ao desenvolver uma pesquisa em que isolou BAL de leite *in natura* da região oeste de Santa Catarina, verificou que 9% dos isolados apresentaram atividade bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes*.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que 64 isolados (91%) apresentam potencial bacteriocinogênico, pois apresentaram sensibilidade, a uma ou mais, proteases testadas. Testes complementares são necessários, para aplicação em produtos cárneos como bioconservantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BELLO, B. D.; RANTSIOUA, K.; BELLIO, A.; ZEPPAA, G.; AMBROSOLIA, R.; CIVERAB, T.; COCOLINA, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of autochthonous populations. **LWT. Food Science and Technology**, v.43, p.1151-1159, 2010.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.135-144, 2006.

CORBO, R. M; BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; D'AMATO, D.; SPERANZA, B; SINIGAGLIA, M. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 223–241, 2009.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. **A Flora Microbiana dos Alimentos: Alimentos fermentados** (eds Tondo. E. C.). Artmed Editora. pp. 132-147, 2002.

HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.97, p. 8856-8861, 2000.

HERREROS, M.; SANDOVAL, H.; GONZALEZ, L.; CASTRO, J.; TORNADIJO; M. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**, v.22, p. 455–459, 2005.

MONTVILLE, T.J.; KAISER, A. Antilisterial proteins classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins, In: HOOVER, D.G.; STEENSON L.R. (ed.), Bacteriocins of lactic and bacteria. New York, **Academic Press**, p. 1-22, 1993.

NAVARO, L.; ZARAZAGA, M.; SÁENZ, J.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. **Journal of Applied Microbiology**. 88: 44-51, 2000.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in food science and technology**, v.71, p.58-64, 1996.

SCHITTLER, L. B. T. **Isolamento e Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite in natura da região oeste de Santa Catarina**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

THOMAS, L. V.; CLARKSON, M. R., DELVES-BROUGHTON. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**. v.69, p.37–44, 2000.

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