

# DESENVOLVIMENTO DE BIOCONSERVANTE NATURAL PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

K. Q. BUCHOLDZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CENTRO UNIVERSITÁRIO TUPY (UNISOCIESC), Departamento de Engenharia Química  
E-mail para contato: karine,bucholdz@sociesc.org.br

**RESUMO** – Os ingredientes vegetais e cereais entram em contato direto com desafios ambientais com possíveis contaminações microbiológicas durante o plantio, colheita, produção, armazenagem e no próprio transporte. Com isso, existe a necessidade de desenvolver alternativas de conservação para que seja possível disponibilizar produtos mais seguros sob o ponto de vista microbiológico. O presente estudo teve como objetivo desenvolver um bioconservante capaz de inibir o crescimento de *Salmomella* spp. em Farelo de Soja destinado à alimentação animal. A ideia em questão é a produção de bacteriocinas, ou seja, peptídeos ou proteínas biologicamente ativas que possuem ação bactericida e/ou bacteriostática. Foram utilizadas cepas mistas de *Lactobacillus* na fermentação do melaço de soja. Verificou-se que a quantidade mínima necessária para inibição da *S. choleraesuis* foi de 0,2% e para inibição da *S. mbandaka* foi de 0,4%. O bioconservante desenvolvido apresentou grande potencial para utilização em alimentos.

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos é um grande problema devido às altas taxas de morbidade. Desta forma, existe a necessidade de desenvolver alternativas naturais para a conservação de alimentos. Hoje em dia, a presença de *Salmonella* spp. é uma das mais importantes barreiras sanitárias em exportações, pois implica na rejeição do produto pelo cliente e possível rescisão de contratos.

De acordo com Jack et al. (1995) praticamente todas as bactérias têm a capacidade para a produção de substâncias durante o seu crescimento “in vitro” que seja inibitório para si ou para outras bactérias. Estas substâncias exercem efeito bactericida ou bacteriostático.

Industrialmente, as bacteriocinas e outros antimicrobianos são naturalmente muito atraentes devido ao apelo de segurança. As bactérias lácticas interferem na multiplicação de bactérias patogênicas através de vários mecanismos. A produção de bacteriocinas tem sido evidenciada em bactérias lácticas associadas com alimentos, envolvendo *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. (De Martinis et al. 2002, Rosa et al. 2002).

O conhecimento e o uso desses fatores combinados em um alimento formam a teoria de obstáculos, que permite o controle do prazo de validade, a estabilidade microbiológica, bem como a prevenção da multiplicação e/ou produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes (De Martinis et al., 2002).

No presente estudo foi realizada a incorporação de melaço de soja fermentado por bactérias láticas pré selecionadas e a sua aplicação nas formas líquida e em pó para preservação do Farelo de Soja para avaliação do efeito inibidor contra a *Salmonella* spp.

## **1.1. Ingredientes para Alimentação Animal e Contaminação**

Ingredientes vegetais são altamente suscetíveis à contaminação por microrganismos durante o plantio, colheita, produção, armazenamento e transporte. Hoje em dia, é inegável a necessidade de monitoramento da presença de microrganismos em ingredientes para rações. Proteínas obtidas a partir de indústrias de óleos vegetais em são mais suscetíveis à contaminação por *Salmonella* spp. (Morita et al, 2003; European Food Safety Authority, 2006).

## **1.2. *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. é um microrganismo anaeróbico facultativo, gram-negativo que pertence à família Enterobacteriaceae. A sua temperatura ótima de crescimento é 37°C, pH entre 4,5 e 9,5, e atividade de água acima de 0,93. Produz ácido e gás a partir de glucose e outros carboidratos e não utilizam lactose e sacarose. É oxidase negativa e catalase positiva, capaz de usar citrato como única fonte de carbono para seu desenvolvimento. Na maioria dos casos, produz H<sub>2</sub>S, descarboxila lisina e ornitina e não hidrolisa a ureia (D'Aoust, 2001). É um microrganismo que pode causar doenças em seres humanos e animais (Pelczar et al, 1981; Nascimento et al, 2000) e é um dos mais estudados (Nascimento et al, 2000). Causam graves problemas para a agricultura industrial e para a saúde pública (Andrade et al, 1995; Tessari, 2003).

## **1.3. *Bacteriocinas***

Em meados de 1925, André Gratia apresentou um estudo sobre o potencial de inibição do crescimento de *Escherichia coli* em outras cepas da mesma espécie (Jack et al, 1995). Após a revelação de que a obtenção destes compostos não era limitada ao grupo coliforme, sugeriu-se o termo "bacteriocinas" para proteínas antimicrobianas produzidas por microrganismos gram-negativas e gram-positivas (Nascimento et al., 2008). Se utilizado em alimentos, as bacteriocinas podem ajudar a reduzir o uso de produtos químicos conservantes e/ou a intensidade de calor e outros métodos físicos, satisfazendo as necessidades dos clientes. Nos últimos anos, um intenso esforço que você tem-se feito para desenvolver aplicações de bacteriocinas em alimentos (Todorov, 2009).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cepas

As cepas utilizadas no presente estudo foram adquiridas da Fundação Andre Tosello, com exceção da cepa de *Salmonella mbandaka* que foi isolada do ambiente de uma indústria de Farelo de Soja. A Tabela 1 demonstra a temperatura de crescimento de cada cepa utilizada.

Tabela 1 – Cepas e temperaturas utilizadas neste trabalho

Cepas de Micorganismos	T (°C)
<i>Lactobacillus salivarius</i>	37
<i>Lactobacillus reuteri</i>	37
<i>Lactobacillus plantarum</i>	30
<i>Lactobacillus agilis</i>	30
<i>Lactobacillus plantarum</i> (8014)	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	37
<i>Lactobacillus fermentum</i>	37
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i>	37
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>mbandaka</i>	37

Essas cepas de *Lactobacillus* foram utilizadas porque algumas pesquisas têm demonstrado que estas espécies são capazes de produzir bacteriocinas, inibindo as bactérias Gram-negativas, tais como: o patógeno *Salmonella* spp.

A parede celular da *Salmonella* é composta por uma camada de peptidoglicano e três outros componentes externos; lipoproteína, lipopolissacarídeo e membrana externa. A membrana exterior de bactérias Gram-negativas é o componente que confere maior resistência contra a ação de bacteriocinas.

### 2.2 Preparação do Inoculo

Os inóculos foram preparados reativando as cepas em meio de cultura específico e armazenados em microtubos contendo glicerol para preservação. Testes diretos (placas de Petri) e indiretos (espectrofotometria) foram realizados com cada cepa para verificar seu potencial de inibição contra as cepas de *Salmonella* ssp. utilizadas.

## 2.3 Padronização do Substrato

O substrato foi preparado com melaço de soja diluído em água destilada até 5 e 10°Brix e enriquecido com extrato de levedura, acetato de sódio, citrato de amônia, fosfato de amônia e tween 80. Após padronização do substrato, o mesmo foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Para o preparo do bioconservante em pó, o substrato utilizado foi adicionado de 10% de farelo de soja.

## 2.4 Processo de Fermentação e obtenção do Bioconservante

A fermentação foi realizada em incubador refrigerado (shaker), contendo o substrato padronizado e a cepa de *Lactobacillus* também padronizada conforme escala Mac Farland ( $10^6$  UFC/mL). Para cada cepa foi realizada uma fermentação. As condições de fermentação foram de 24 horas com agitação a 110rpm e temperatura específica de cada cepa. Amostras foram coletadas assepticamente a cada 8 horas de fermentação para monitoramento do pH e viabilidade das células.

Para purificação e concentração das bacteriocinas, as amostras foram centrifugadas, neutralizadas com NaOH 1N para pH 7,0, evaporadas a 40°C em rotavapor e ultrafiltradas em membranas de 5000Da and 10000Da (1:10). Após concentração, as amostras foram esterilizadas em membrana 0.22 µm para remoção de qualquer microrganismo, restando apenas as bacteriocinas conforme demonstra a figura 1.

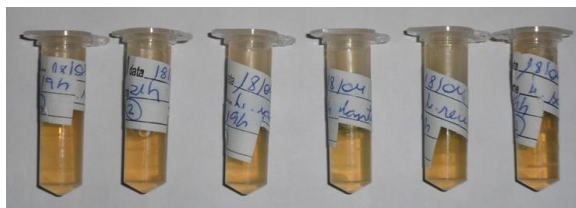


Figura 1 – Sobrenadantes neutralizados (sem células) fermentado por cepas de *Lactobacillus*

O material obtido resultante da fermentação do melaço de soja adicionado de farelo de soja foi neutralizado e seco a 40°C em estufa durante 72 horas, após secagem o mesmo foi moído, onde obteve-se o bioconservante em pó conforme mostra a figura 2.



Figura 2 – Material fermentado por cepas de *Lactobacillus*, neutralizado e seco

Os produtos obtidos, foram testadas através do método de difusão em disco contra cepas de *Salmonella* spp.

A natureza das bacteriocinas produzidas neste estudo foi determinada pela verificação da sua sensibilidade às enzimas tripsina, quimiotripsina e papaína pelo método de difusão em disco.

## **2.5 Teste de Inibição da *Salmonella* spp. em Farelo de Soja**

O farelo de soja 46%, 48% e 62% de proteína foram esterilizados e contaminados com cada cepa de *Salmonella* spp. padronizada ( $10^8$  UFC/mL). De acordo com o melhor resultado obtido nos testes de inibição com cada cepa de *Lactobacillus* e com cepas mistas, o substrato foi fermentado com um mix de cepas em um Bioreator de 15L sob as mesmas condições dos testes anteriores. O material obtido da fermentação, passou por neutralização e concentração. O bioconservante líquido e em pó foi adicionado em diferentes quantidades no Farelo de soja contaminado (0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7% e 0,8%). Amostras foram coletadas para realizar a análise de *Salmonella* spp. para avaliação da inibição do patógeno.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Avaliação das cepas de *Lactobacillus***

Através do método direto em placas, observou-se que entre as sete cepas testadas, 57,15% inibiram a *Salmonella choleraesuis*, e 28,60% inibiram a *Salmonella mbandaka*. Barros et al. (2009) mostrou que 100% das amostras contendo *Salmonella enteritidis* apresentaram zonas de inibição de 16 a 24 mm de diâmetro usando cepas de *L. salivarius* e 86,7%, utilizando cepas de *L. reuteri* com uma zona de inibição de 14-22 mm aplicando o método direto em placas.

Através do método indireto utilizando espectrofotômetro a 600nm, os melhores resultados de inibição de *Salmonella* spp. foram de 48-90% de inibição para *S. choleraesuis* e 59-96% de inibição para *S. mbandaka*. Todas as cepas avaliadas foram capazes de inibir o crescimento das cepas de *Salmonella* spp. utilizadas, sendo que houve uma inibição de 96% por *L. plantarum* e 92% por *L. agilis*.

Lash et al. (2005) mostraram que um sobrenadante livre de células fermentado por *L. plantarum* exibiu um efeito antibacteriano em uma ampla gama de espécies bacterianas por densidade óptica a 600nm. Em seu estudo, a inibição foi de mais de 90% para bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* e *Salmonella typhimurium*.

### **3.2 Composição do Substrato**

Inicialmente, o melaço de soja a 5° Brix tinha um total de 14,3 mg/mL de carboidratos, principalmente sacarose. Após 24 horas de fermentação ocorreu a diminuição para 2,3 mg/mL. Já o melaço de soja a 10° Brix apresentou 27.1mg/mL antes da fermentação e depois diminuiu para 1,9 mg/mL. Os resultados mostraram que ambas as concentrações de melaço de soja foram suficientes para a fermentação por *Lactobacillus* spp.

### 3.3 Fermentação do Substrato e Avaliação da Produção de Bacteriocinas

O pH inicial do substrato era de 6,2 e após a fermentação do melaço de soja a 5° Brix houve a redução para 4,0, já o melaço de soja 10° Brix reduziu para 3,8. A produção de bacteriocinas ocorreu durante a fase exponencial para todas as cepas utilizadas e concentração do substrato (melaço de soja a 5 e 10° Brix). Kelly, Asmudson e Huang (1996), cultivaram *L. plantarum* em caldo MRS a 28°C durante 24 horas, observaram a diminuição do pH de 6,0-3,8. Lewus e Monteville (2002) observaram que o aumento da produção de bacteriocina plantaricin BN ocorreu na fase exponencial de crescimento. O presente trabalho confirma os resultados obtidos por outros autores na produção de bacteriocinas.

As cepas de *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. agilis* e *L. plantarum* (8014) foram empregadas individualmente e também combinadas para verificação da inibição da *Salmonella* spp. Os melhores resultados de inibição testados foram utilizando o sobrenadante fermentado de melaço de soja a 10° Brix durante 8 horas, utilizando as cepas mistas (*L. reuteri*, *L. agilis*, *L. plantarum* e *L. salivarius*). Uma zona de inibição de 14 milímetros foi observada nas placas inoculadas para *S. choleraesuis* e 7 milímetros *S. mbandaka*. Lima et al. (2007) demonstraram por métodos diretos, incluindo o método de difusão em disco que, amostras de *L. reuteri*, *L. salivarius* e *Lactobacillus* sp. mostrou ação de bacteriocinas contra *Enterococcus* sp., *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Barros et al. (2009) também confirmou que cepas de *L. reuteri* e *L. salivarius* isoladas de frangos, foram capazes de inibir a *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. agona*, *S. anatum*, *S. dublin* e *S. senftenberg* in vitro. Isto confirma os resultados obtidos neste trabalho, onde foi possível inibir a *Salmonella* spp. utilizando uma mistura combinada de cepas de *Lactobacillus* spp. em melaço de soja 10° Brix.

### 3.4 Avaliação da Inibição da *Salmonella* spp. em Farelo de Soja

A quantidade mínima necessária para a inibição de *S. choleraesuis* foi de 0,2% e 0,4% para *S. mbandaka*, utilizando os diferentes tipos de farelo de soja. A aplicação do biopreservante em pó afetou a cor do farelo de soja. Este é um parâmetro muito importante na sua comercialização, devido às exigências e necessidades dos clientes. A aplicação na forma líquida teve vantagens principais pois não afetou as características sensoriais do produto (cor, umidade e proteína) além de ser de fácil homogeneização.

## 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- Da combinação de cepas de *Lactobacillus* testadas, quatro mostraram um forte poder de inibição contra *S. choleraesuis* e *S. mbandaka*., sendo assim, as cepas selecionadas foram *L. agilis*, *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L. plantarum*.
- A composição do substrato foi satisfatória para o processo de fermentação e produção de bacteriocinas na fase exponencial (após 8 horas).



- A capacidade das cepas de *Lactobacillus* spp. produzirem bacteriocinas foi demonstrada, bem como a inibição da *Salmonella* spp. utilizando pequenas quantidades do Bioconservante líquido no Farelo de Soja.
- Uma patente do bioconservante desenvolvido foi depositada.

O produto desenvolvido utilizando melaço de soja como substrato tem grande potencial para ser aplicado em alimentos, equipamentos e/ou matérias-primas; Além disso, o substrato tem um custo baixo sendo economicamente viável quando comparado com o meio seletivo para *Lactobacillus* (MRS), pois é 160 vezes mais caro do que o melaço de soja.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. A.; MESQUITA, A. J.; SOUZA, A. M.; BATISTA, M. A. C. Frequência de *Salmonella* em granjas de postura comercial localizadas no município de Goiânia e entorno. Anais da Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade Federal de Goiás, v.25, n.2, p.21-26, 1995.
- BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T. and CROCCI, J.A. Avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do ingluvío e cecos de aves sobre *Salmonella*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, n.4, p.863-868, 2009.
- D'AOUST, J. Foodborne salmonellosis: current international concerns. Food Safety Magazine; n.7, p.10-17, 2001.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Reviews International, v.18, n.2-3, p.191-208, 2002.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to "Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production", The EFSA Journal n.341, p.1-131, 2006.
- JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiology Review, v.39, n. 2, p.171-200, 1995.
- KELLY, W.J.; ASMUDSON, R.V.; HUANG, C.M. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Bacteriology, v.81, p.657-662, 1996.
- LASH B.W., MYSLIWIEC T.H., GOURAM H., Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Food Microbiology, n.22, p.199-204, 2005.
- LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Journal of Microbiology Methods, v.13, p.145-150, 1991.
- LIMA, E. T., R. L. ANDREATTI FILHO, A. S. OKAMITO, J. C. NOUJAIM, M. R. BARROS and A. J. CROCCI. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. Canadian Journal of Veterinary Research, p.71:103-107, 2007.

MORITA M., KOBAYASHI A., YAMASHITA T., SHIMANUKI T., NAKAJIMA O. and TAKAHASHI S., Functional analysis of basic transcription element binding protein by gene targeting technology, *Molecular and Cellular Biology*, n.23, p.2489–2500, 2003.

NASCIMENTO, M. S.; BERCIERT JR, A.; BARBOSA, M. D.; ZANCAN, F. T.; ALMEIDA, W. A. F. Comparações de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.2, n.1, p.85-91, 2000.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, L.; KUAYE, A, YOSHITERU. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11, n.2, p.120-127, 2008.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água, *Microbiologia*, v.2, p.689-722, 1981.

ROSA, C. M., FRANCO, B. MORENO. Bacteriocinas de bactérias lácticas. *Consciência e Saúde, Revista Científica UNINOVE*, v.1, p.09-15, 2002.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I. Incidência de *Salmonella* spp em pintos de corte recém nascidos. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.70, n.3, p. 278-281, 2003.

TODOROV, S.D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action. *Brazilian Journal Microbiology*, n.40, p.209-221, 2009.