



## INTERAÇÃO DA PEDIOCINA COMERCIAL E DE CULTURAS LÁCTICAS INICIADORAS

**<sup>1</sup>BEHNCK, Priscila Costa da Silva; <sup>1</sup>MELLO, Michele Brauner; <sup>1</sup>SILVA, Gabrielle Peverada de Freitas; <sup>2</sup>MOTTA, Amanda de Souza; <sup>3</sup>JANTZEN, Márcia Monks**

<sup>1</sup>Bacharelado em Química de Alimentos, UFPel, Caixa Postal 354, Pelotas/RS

<sup>2</sup>Inspeção de Leite e Derivados, UFPel, Caixa Postal 354, Pelotas/RS

<sup>3</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos, UFPel, Caixa Postal 354, Pelotas/RS, [mjantzen\\_vet@hotmail.com](mailto:mjantzen_vet@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O desejo do consumidor por alimentos mais saudáveis tem contribuído para o avanço do estudo da bioconservação. Este processo de conservação é utilizado para estender a vida de prateleira de produtos alimentícios e a segurança alimentar, pelo emprego de bacteriocinas, em substituição aos aditivos químicos (NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008).

Levando-se em conta o grande consumo de queijo devido ao seu valor nutricional e sua palatabilidade, e durante seu processo de elaboração não sofrer nenhum tratamento térmico para eliminar os microrganismos patogênicos, este produto apresenta um maior risco de contaminação quando comparado com outros alimentos (SILVA et al, 2004).

As bactérias lácticas empregadas na fermentação de alimentos são capazes de inibir ou reduzir o crescimento de microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, por meio da produção de vários agentes antimicrobianos. A pediocina, uma bacteriocina produzida por bactérias lácticas da espécie *Pediococcus acidilactici*, vem sendo estudada como uma forma de bioconservação em queijos de média maturação, por apresentar uma ampla atividade bioconservante e de estabilidade em alimentos (CONVENTRY et al., 1997).

As culturas lácticas, além de acelerarem o processo fermentativo, contribuem para uma maior uniformidade do produto final e formação do *flavour* desejável. Porém, a compatibilidade da bacteriocina com o fermento láctico é essencial para a obtenção de produtos característicos (NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2009).

A sensibilidade do fermento láctico à bacteriocina foi avaliada *in vitro*, utilizando o método de difusão em ágar. O objetivo deste estudo foi avaliar a compatibilidade do cultivo láctico iniciador mesófilo tipo O, utilizado na elaboração de Queijo Minas Padrão, frente à pediocina.

### 2. METODOLOGIA

Foi avaliada a pediocina ALTA™ 2345 (5R01434), da marca comercial KERRY e do cultivo láctico iniciador mesófilo tipo O Choozit™ MA 11 LYO 25 DCU, da marca comercial DANISCO, contendo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Primeiramente a interação entre o cultivo láctico (*starter*) e a pediocina foi testada a partir da dissolução da cultura láctica em solução salina (0,85%) e posteriormente o experimento foi direcionado para a inoculação da cultura *starter* e pediocina em leite que foi submetido ao processo UHT desnatado, a fim de aproximar-se às condições da matriz alimentar. Os testes foram realizados *in vitro*, interagindo-se a pediocina (1%) e as culturas lácticas em Ágar MRS com incubação à 37°C por 24 horas.

A cultura láctica foi preparada de acordo com o fabricante na concentração de 2,5 *Danisco Culture Unite* (DCU)/100L de leite, procedendo-se no experimento a diluição de 0,002 g de fermento láctico em 500 mL de diluente, o que correspondeu 0,0125 DCU em 500mL de solução salina e de leite. A suspensão da cultura diluída na solução salina foi aplicada uniformemente sobre os meios de cultivo com *swab* estéril, utilizando-se o método de difusão em ágar com discos de celulose (MOTTA e BRANDELI, 2002). Nesse método depositou-se sobre os discos aplicados à placa de Ágar MRS as microdiluições da pediocina nas diluições de 1 até 1:512, sendo dispensadas alíquotas de 20µL sobre os discos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, sendo a ausência de halos indicativa da não atividade da pediocina frente à cultura láctica.

O controle da atividade da bacteriocina foi realizado utilizando-se *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, na concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo realizado pelo método de difusão em ágar com discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade foi definida como sendo a recíproca da última diluição que apresentar uma zona de inibição, e foi expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA.mL<sup>-1</sup>) de acordo com MAYR-HARTING et al. (1972).

No experimento realizado em leite UHT desnatado, a cultura láctica foi adicionada diretamente no leite (de 0,002 g de fermento láctico em 500mL de leite), sendo preparados 3 tubos em duplicata, com 20 mL cada: Tubo 1) Controle, contendo somente leite; Tubo 2) Leite + cultura láctica iniciadora; Tubo 3) Leite + cultura láctica iniciadora + pediocina. A fim de se verificar a atividade e estabilidade da cultura láctica, avaliou-se o pH e a acidez Dornic (BRASIL, 2003) em diferentes momentos da incubação à 37°C: após 16 horas e após 24 horas. Para comprovar a presença das bactérias lácticas, procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) após as 24h de incubação à 37°C em Agar MRS, pelo método de microdiluição (MILLES e MISRA, 1938).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes realizados pelo método de difusão em ágar não houve interferência da pediocina no crescimento da cultura láctica. Para controle positivo, confrontamos a pediocina com a *Listeria monocytogenes*, e foi observada a inativação da mesma, o que significa atividade da pediocina contra a *L. monocytogenes* e não interferência da mesma na cultura láctica.

Nos testes em leite, simulando as condições da matriz alimentar, observamos produção de ácido láctico, uma vez que, após 16 horas a 37°C, o leite do Tubo 2

(com cultura láctica) obteve pH 4,0 e em 24 horas se manteve o mesmo pH. Esses resultados também podem ser confirmados pelo aumento da acidez de 85°D em 16 horas para 92°D em 24 horas (TABELA 1). Em relação à pediocina podemos concluir que não houve a inibição do crescimento da cultura láctica, já que no Tubo 3 (leite, cultura láctica e pediocina), ocorreu redução do pH de 7,0 para 4,0 em 16 horas, mantendo-se durante as 24 horas de incubação, confirmando-se a produção de ácido através da medição da acidez Dornic, apresentando resultado de 86°D após 16 horas e 93°D em 24 horas de incubação (Tabela 1). Comparando-se a amostra do Tubo 2 (leite e cultura láctica) com a do Tubo 3 (leite, cultura láctica e pediocina) quanto à acidez Dornic e ao pH, não houve muita diferença entre os resultados, comprovando que a pediocina não inibiu o desenvolvimento da cultura láctica.

Tabela 1. Efeito da interação entre culturas lácticas e bacteriocinas sobre a acidez e o pH de leite UHT desnatado

Amostra	16 horas/37°C		24 horas/37°C	
	Acidez (°D)	pH	Acidez (°D)	pH
Tubo 1*	19	7,0	18	7,0
Tubo 2**	85	4,0	92	4,0
Tubo 3***	86	4,0	93	4,0

\* Leite (controle); \*\* Leite + cultura láctica; \*\*\* Leite + cultura láctica + pediocina

Para pesquisar a presença da bactéria láctica, procedeu-se a contagem das UFC's em ágar MRS dos três tubos. No tubo 1 (somente com leite), não houve contagem de UFC, por tratar-se de leite "esterilizado". No Tubo 2 (leite + cultura láctica), a contagem de bactérias lácticas foi de  $6,2 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> e no Tubo 3 (leite + cultura láctica + pediocina) foi de  $6,3 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Apesar de ter ocorrido a diferença de um (1) ciclo logarítmico entre as duas amostras, ainda é precoce afirmar que essa redução seja em decorrência da ação da bacteriocina. Por esse motivo, a continuação da pesquisa poderá afirmar possíveis alterações com maior propriedade, podendo-se lançar mão de testes mais específicos para verificar a possível injúria das culturas lácticas, se for o caso.

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* apresentaram sensibilidade às bacteriocinas produzidas por linhagens homólogas (CONVENTRY et al., 1997, BENKERROUM et al., 2002, ELOTMANI et al., 2002). Da mesma forma, Nascimento, Moreno e Kuaye (2009), ao estudarem duas diferentes marcas comerciais de fermento mesofílico tipo O quanto à compatibilidade às bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198. *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, verificaram que houve zona de inibição de 6mm em ambas as marcas de fermento láctico, indicando inibição do desenvolvimento do fermento pelas bacteriocinas produzidas pelas linhagens estudadas. Por outro lado, os autores concluíram que nisina não foi produzida, porém a produção de pediocina Ach e enterocina foi potencializada pela presença dos fermentos lácticos.

Pela possível ação antagônica entre culturas lácticas iniciadoras e culturas produtoras de bacteriocinas, é interessante que se estude a viabilidade da interação das culturas lácticas com a aplicação direta das bacteriocinas liofilizadas no alimento. Dessa forma, a utilização e o perfeito desenvolvimento dos fermentos/culturas lácticas iniciadoras tornam-se essenciais para a caracterização do queijo, a fim de que ocorra uma correta fermentação do produto, com geração de outros compostos como o diacetil e acetaldeído em queijos de média maturação.

#### 4. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais até então estudadas, podemos concluir que não houve interferência da pediocina nas culturas lácticas iniciadoras, tanto quando se utilizou solução salina para a diluição da cultura láctica quanto no teste em leite UHT desnatado. Esses testes preliminares servem de subsídios para atividades posteriores onde será pesquisada a aplicação e avaliação da pediocina como um bioconservante em Queijo Minas Padrão frente a linhagens de *Listeria*.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à empresa DANISCO pela doação do cultivo láctico iniciador mesófilo tipo O Choozit™ MA 11 LYO 25 DCU e à KERRY por ceder a pediocina ALTA™ 2345 (5R01434).

#### 6. Órgão financiador

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), financiando bolsas de Iniciação Científica (BEHNCK, P. e MELLO, M.) através de projeto aprovado pelo Edital 62/2008 e bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/UFPeI (SILVA, G.)

#### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENKERROUM, N. et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in model cultured milk by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 145-151, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 22 de 14 de abril de 2003. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da União de 02/05/2003, Seção 1, Página 3.
- CONVENTRY, M. J. et al. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocina and nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 11, p. 246-258, 1997.
- ELOTMANI, F. et al. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan traditional fermented milk. **Current Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 10-17, 2002.
- MAYR-HARTING, A.; HEDJES, A.J.; BERKELEY, C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R; RIBBONS, D.W. (Eds.). **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press, 1972, v. 7a, 115p.
- MILLES, A.A.L; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 38, p. 732-739, 1938.
- MOTTA, A.S; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium* lines. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 63-71, 2002.

NASCIMENTO M., MORENO I. & KUAYE A. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, abr./jun. 2008

NASCIMENTO, M.S; MORENO, I; KUAYE, A.Y. Determinação da compatibilidade de desenvolvimento de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2009.

SILVA, LAER, A. E., LIMA, A. S., JANTZEN, M. M. *Listeria monocytogenes* en quesos tipo Minas producidos artesanalmente y comercializados en Pelotas, RS, Brasil. **Alimentaria**. p.57 - 60, 2004.