



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

DETECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS EM LEITE E QUEIJO¹

Jéssica Tamiozzo Schmidt², Graciele Daiana Funck³, Raul Vicenzi⁴, Neila Richards⁵,
Gislaine Hermanns⁶.

¹ Pesquisa Institucional do Departamento de Ciências da Vida

² Aluna do Curso de Química Industrial de Alimentos da UNIJUI, bolsista PIBIC/UNIJUI

³ Funcionária do Laboratório de Microbiologia da UNIJUI

⁴ Professor do Departamento de Ciências da Vida da UNIJUI

⁵ Professora do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSM

⁶ Professora Orientadora, Curso de Química Industrial de Alimentos da UNIJUI

Resumo: Dentre os produtos fermentados naturalmente por bactérias lácticas (BAL) encontram-se os queijos artesanais. Sua utilização constitui-se em uma das técnicas mais antigas de conservação de alimentos, já que são capazes de produzir substâncias com caráter antagônico frente a microrganismos deteriorantes e patogênicos, com destaque à *Listeria monocytogenes*. Na região Fronteira Noroeste do estado do RS é produzido um queijo típico, denominado colonial. Por ser fabricado, geralmente, com leite cru, sem a adição de culturas iniciadoras e sob condições deficientes de higiene, possui uma diversificada população microbiana indesejada. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de BAL produtoras de bacteriocinas, em leite e queijos artesanais desta região. Para isso, foram coletadas amostras em dez produtores de leite e queijos, em duas épocas do ano (inverno e verão). As BAL foram isoladas destes produtos e então testadas quanto a sua capacidade de produzir bacteriocinas, frente à *Listeria monocytogenes*. Do total de bactérias lácticas isoladas, com potencial antagonista, 33,33% mostraram-se capazes de produzir bacteriocinas.

Palavras-Chave: Bactérias ácido-láticas, bacteriocinas, leite, queijo.

Introdução

O emprego de leite cru e sem a adição de fermentos lácteos, na grande maioria dos processos de produção artesanal de queijos, fornece a este produto uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Este aspecto se caracteriza como um perigo aos consumidores, já que além de microrganismos deteriorantes pode também servir como veículo de microrganismos patogênicos.

Além dos microrganismos indesejáveis, a microbiota é composta também de bactérias ácido-láticas (BAL). Estas são inerentes da matéria-prima leite, e desempenham um papel primordial no processo de





Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

fermentação do mesmo. Demonstram-se predominantes durante a produção e maturação de queijos, conferindo características organolépticas essenciais (NESPOLO, 2009).

Além disso, muitas apresentam poder de inibição frente a patógenos e deteriorantes como *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *E. coli* e bactérias do grupo coliforme (HERNANDEZ et al., 2005; JAY, 2005; NESPOLO, 2009; ORTOLANI, 2009).

A capacidade antagonista que muitas BAL apresentam deve-se a produção de compostos formados em pequenas quantidades a partir do catabolismo celular, dentre os quais podemos citar ácidos orgânicos (como ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza proteica, denominadas bacteriocinas (NAIDU et. al., 1999). Estas são as mais estudadas pela importância na aplicação em indústrias de alimentos como bioconservantes (ORTOLANI, 2009) e também como probióticos (NESPOLO, 2009).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomalmente, biologicamente ativos, produzidos por diversas espécies de bactérias, caracterizados por agirem contra um grupo específico de microrganismos da mesma espécie, ou de diferentes gêneros (MARTINIS et. al., 2001; NESPOLO, 2009; ORTOLANI, 2009). Devido a sua natureza proteica, testes de inibição com diferentes enzimas, podem ser utilizados para caracterizar as bacteriocinas produzidas por BAL.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de bactérias ácido-láticas produtoras de bacteriocinas em leite e queijos artesanais, produzidos na região Fronteira Noroeste do RS, com o intuito de virem a ser utilizadas como cultura iniciadora, conferindo características únicas e seguras aos queijos regionais.

Metodologia

A pesquisa foi realizada, inicialmente, junto a dez propriedades rurais, da região Fronteira Noroeste do estado do RS, de onde foram coletadas vinte amostras de leite e quarenta de queijos, em duas épocas do ano (inverno e verão). Os experimentos foram realizados junto aos Laboratórios de Microbiologia e Físico-química da UNIJUI – Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS.

As BAL foram isoladas em ágar De Man, Rogosa e Sharpe - MRS, sob anaerobiose a 35°C por 72h (IDF, 1983).

Vinte e uma cepas de bactérias ácido-láticas, com atividade antagonista, 06 oriundas de amostras do inverno e 15 de verão, foram testadas quanto à capacidade de produção de bacteriocinas. Para isso a natureza proteica das substâncias antimicrobianas foi identificada frente a enzimas (Sigma): pepsina, α-quimotripsina e proteinase K, segundo Lewus et. al., 1991.



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

Inicialmente, as cepas de BAL foram cultivadas em caldo MRS a 350C por 24h. Destas culturas foram inoculadas quatro gotas de 5µL, cada, em placa de ágar MRS. As placas foram incubadas em anaerobiose a 350C por 24h. Decorrido este tempo foram perfurados orifícios de 5mm de diâmetro, a 5mm de cada colônia. Três orifícios foram preenchidos com solução de cada uma das enzimas citadas, a 20mg/mL. E, um quarto orifício com água destilada estéril, servindo como controle. Após absorção, as placas foram recobertas com uma sobrecamada de ágar BHI semi-sólido a 0,8% contendo em torno de 106UFC/mL de *Listeria monocytogenes*. Em seguida as placas foram incubadas a 350C/24 sob aerobiose.

A interpretação dos resultados foi feita mediante observação dos halos de inibição, sendo que a retração do halo (formato de meia lua), próximo à enzima, indicou sensibilidade à referida enzima, caracterizando a substância antimicrobiana como sendo uma bacteriocina.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos mostraram que 33,33% dos isolados com atividade antagonista foram capazes de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, frente à *Listeria monocytogenes*, sendo caracterizados como produtores de bacteriocinas. Destes 83,33% foram oriundos de amostras coletadas no inverno e 13,33% de amostras coletadas no verão. Na Tabela 01 pode ser observada a sensibilidade dos isolados frente às enzimas pepsina, proteinase K e #-quimotripsina e na Figura 01 é demonstrado o comportamento de um dos isolados frente a estas enzimas.





Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

Figura 01 – Sensibilidade de um dos isolados (AB7) de BAL frente às enzimas pepsina, proteinase K e α -quimotripsina.

Tabela 01 – Sensibilidade dos isolados de BAL frente a enzimas proteolíticas.

Isolados	Sensibilidade às enzimas		
	Pepsina	Proteinase K	α – Quimotripsina
BB9 (I)	+	+	+
AB7 (I)	+	+	+
R7 (I)	+	+	+
F9 (I)	+	+	+
I6 (I)	+	+	+
R1 (V)	+	+	+
AC4 (V)	-	+	+

(+): indica sensibilidade do isolado frente à enzima; (-): indica que o isolado não se mostrou sensível frente à enzima.

(I): isolado proveniente de amostra coletada no inverno; (V): isolado proveniente de amostra coleta no verão.

Ortolani (2009) em trabalho similar, procurando identificar BAL nativas de leite cru e queijo minas frescal com capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, detectou 14,9% dos isolados com sensibilidade a enzimas proteolíticas, sendo estes classificados como supostamente produtores de bacteriocinas. Furtado (2010), através do isolamento de BAL de queijo frescal de leite de cabra, identificou 10% de seus isolados como sendo produtores de bacteriocinas.

As bacteriocinas produzidas por BAL e as culturas iniciadoras de BAL produtoras de bacteriocinas são de grande interesse para a indústria de alimentos como preservativos naturais devido à sua habilidade de inibir o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereuse* *Clostridium botulinum* (HERNANDEZ et. al., 2005).

Conclusão

O leite e o queijo artesanal produzido na região Fronteira Noroeste do RS apresentam bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas.

As bactérias lácticas isoladas podem vir a ser utilizadas como potenciais cultivos iniciadores bacteriocinogênicos em queijos.

Agradecimentos

A Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do RS, pelo financiamento do projeto.

Ao PIBIC/UNIJUI pela bolsa de Iniciação Científica.

Referências Bibliográficas





Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

FURTADO, D. N. Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra. 2010. Dissertação. (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo. São Paulo.

HERNANDEZ, D.; CARDELL, E.; ZARATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p.77-84, 2005.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumerations of characteristic microorganisms count technique at 37°C. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n. 117, p. 1-4, 1983.

JAY, J. M.. *Microbiologia de Alimentos*/ James M. Jay. Traduzido por Eduardo Cesar Tondo... [et al.]. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, n. 13, p. 145-150, 1991.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. FoodSci. Nutr.*, v. 38, p.13-126, 1999.

NESPOLO, C. R. Características microbiológicas e físico-químicas durante o processamento de queijo de ovelha. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ORTOLANI, M. B. T. Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas fresco: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.