

## **PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE *Leuconostoc mesenteroides* a partir da água residuária da fécula de mandioca**

**ARUANI LETÍCIA DA SILVA TOMOTO<sup>1</sup>, ANA PAULA TREVISAN<sup>2</sup>, TATIANE MARTINS DE ASSIS<sup>3</sup>, EDUARDO BORGES LIED<sup>4</sup>, FABIANA COSTA DE ARAUJO SCHÜTZ<sup>5</sup>, SIMONE DAMASCENO GOMES<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Doutoranda, UNIOESTE, Cascavel-PR, Fone: (44) 99850-6729, arutomoto@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutora, UNIOESTE, Cascavel-PR, Fone: (45) 99983-0119

<sup>3</sup> Doutora, UNIOESTE, Cascavel-PR, Fone: (45) 99983-0119

<sup>4</sup> Prof. Dr.º., UTFPR, Medianeira-PR. Fone: (45) 3240-8120

<sup>5</sup> Prof.ª. Dr.ª., UTFPR, Medianeira-PR, Fone: (45) 3240-8120

<sup>6</sup> Prof.ª. Dr.ª., UNIOESTE, Cascavel-PR, Fone: (45) 3220-7239

Apresentado no  
XLIX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2020  
23 a 25 de novembro de 2020 – Congresso On-line

**RESUMO:** O *Leuconostoc mesenteroides* é um microrganismo com potencial para a produção de bacteriocinas, sendo estas produzidas a partir das bactérias do ácido láctico podendo ser utilizada como um conservante natural de alimentos. A água residuária de fecularia pode ser utilizada como um substrato para a produção das bacteriocinas. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* utilizando resíduos provenientes da agroindústria processadora de mandioca. Inicialmente, para otimizar a produção das bacteriocinas foi utilizado um planejamento experimental denominado de “Delineamento Experimental Composto Central Rotacional” (DCCR). Após, foi realizado uma série de análises para determinar a atividade das bacteriocinas e gerar uma superfície de resposta com a melhor condição. Os resultados obtidos indicaram que todas as variáveis independentes são significativas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias do ácido láctico; Otimização; Reuso de água residuária.

## **PRODUCTION OF BACTERIOCINES OF *Leuconostoc mesenteroides* from waste water from cassava starch**

**ABSTRACT:** *Leuconostoc mesenteroides* is a microorganism with potential for the production of bacteriocins, which are produced from lactic acid bacteria and can be used as a natural food preservative. Starch wastewater can be used as a substrate for the production of bacteriocins. In this sense, the objective of this work was the production of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* using residues from the cassava processing agribusiness. Initially, to optimize the production of bacteriocins, an experimental design called “Central Rotational Compound Experimental Design” (CRCED). Afterwards, a series of analyzes was carried out to determine the activity of bacteriocins and to generate a response surface with the best condition. The results obtained indicated that all independent variables are significant.

**KEYWORDS:** Lactic Acid Bacteria; Optimization; Wastewater reuse.

**INTRODUÇÃO:** A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, é a sexta cultura alimentar mais importante do mundo sustentando milhões de pessoas na África, Ásia e América Latina, (TAPPIBAN et al., 2019). O processamento da mandioca para a produção de fécula e farinha gera uma enorme quantidade de resíduos líquidos e sólidos, que possuem na sua composição uma variedade de moléculas que podem ser convertidas em produtos de valor agregado. A água residuária, resíduo líquido, está comumente relacionada com bactérias do ácido láctico que podem produzir as bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos usados na bioconservação de alimentos. Para o gênero *Leuconostoc* (heterofermentativa) são os produtores mais significativos das bacteriocinas, sendo a espécie mais importante do último grupo, a *Leuconostoc mesenteroides*. Uma forma de melhorar a produção da bacteriocinas em escala de bancada é por meio da otimização do meio de cultivo pelo método estatístico denominado de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), tendo como meio de cultivo a água residuária da fécula da mandioca suplementada com sacarose, sulfato de magnésio e levedura. Dessa forma, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar a influência das variáveis independentes citadas a partir do DCCR no tempo de fermentação de 15h para a produção de bacteriocinas, explorando o aproveitamento da água residuária da feccularia de mandioca, aumentando a viabilidade econômica, minimizando os impactos ambientais e valorizando os resíduos

**MATERIAL E MÉTODOS: Delimitação experimental:** O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná. O inóculo da *Leuconostoc mesenteroides* foi obtida inicialmente por Vilver (2019) a partir dos resíduos de uma agroindústria de processamento de mandioca localizada no estado de São Paulo. O substrato utilizado para a produção das bacteriocinas foi a água residuária da indústria de fécula de mandioca, sendo obtido em indústria localizada na região Oeste do Estado do Paraná. Na ativação do inóculo foi utilizado 10% da cultura estoque (v/v), que foi adicionada no caldo MRS, sendo este incubado a 30°C, a 100 rpm, por 16 horas ou até a obtenção de densidade óptica (OD) de 660 com uma leitura no espectrofotômetro com  $\eta_m = 1$  (VILVERT,2019).

**Preparo dos tratamentos para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para *Leuconostoc mesenteroides*:** Os tratamentos do DCCR foram realizados a partir de fermentações em frascos de 120 mL, cada frasco foi composto por 45 mL de água residuária da fécula de mandioca enriquecida com os nutrientes apresentados na Tabela 1 de acordo o DCCR. Inicialmente, foi ajustado o pH para 6 com NaOH 0,2 mol/L para todos os tratamentos. Após, os frascos foram autoclavados a 121 atm, por 15 minutos e após o resfriamento do material foi adicionado 5 mL do inóculo (cerca de 10% v/v) para então serem incubados a 35°C, a 100 rpm por 36 horas no PB e nas mesmas condições por 20 horas no DCCR. Após o período de fermentação o pH foi corrigido para 2,5 com HCL 0,2 mol/L para promover a excreção total das bacteriocinas da célula para o meio extracelular. O meio acidificado foi centrifugado a 3.200 rpm por 20 min, onde o sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro de 0,20  $\mu$ m. No sobrenadante foram realizadas análises físico-químicas dos seguintes parâmetros: DQO, açúcares totais, ácido láctico, ácido acético e bacteriocinas. O precipitado da centrifugação foi utilizado para a quantificação da biomassa, sendo essa expressa como sólidos suspensos totais (SST) (JOZALA, 2005).

**Otimização da produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* em água residuária da indústria de fécula de mandioca:** Foi realizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimizar a produção de bacteriocinas. Na Tabela 1 são apresentadas as variáveis, seus valores e os respectivos níveis, com adição dos pontos axiais necessários para a formação das superfícies de resposta nos 17 ensaios.

TABELA 1. Condições experimentais do planejamento experimental composto central rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central.

| Experimentos | Sacarose        | Extrato de levedura | Sulfato de magnésio |
|--------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| 1            | -1 (6,0714)     | -1 (7,0238)         | -1 (0,30357)        |
| 2            | +1 (23,9285)    | -1 (7,0238)         | -1 (0,30357)        |
| 3            | -1 (6,0714)     | +1 (12,9762)        | -1 (0,30357)        |
| 4            | +1 (23,9285)    | +1 (12,9762)        | -1 (0,30357)        |
| 5            | -1 (23,9285)    | -1 (7,0238)         | +1 (1,19642)        |
| 6            | +1 (23,9285)    | -1 (7,0238)         | +1 (1,19642)        |
| 7            | -1 (23,9285)    | +1 (12,9762)        | +1 (1,19642)        |
| 8            | +1 (23,9285)    | +1 (12,9762)        | +1 (1,19642)        |
| 9            | - $\alpha$ (0)  | 0 (10)              | 0 (0,75)            |
| 10           | + $\alpha$ (30) | 0 (10)              | 0 (0,75)            |
| 11           | 0 (15)          | - $\alpha$ (5)      | 0 (0,75)            |
| 12           | 0 (15)          | + $\alpha$ (15)     | 0 (0,75)            |
| 13           | 0 (15)          | 0 (10)              | - $\alpha$ (0)      |
| 14           | 0 (15)          | 0 (10)              | + $\alpha$ (1,5)    |
| 15           | 0 (15)          | 0 (10)              | 0 (0,75)            |
| 16           | 0 (15)          | 0 (10)              | 0 (0,75)            |
| 17           | 0 (15)          | 0 (10)              | 0 (0,75)            |

Legenda: Os valores entre parênteses são os reais

**Determinação da atividade de bacteriocinas:** A determinação da atividade de bacteriocinas foi realizada pelo método de difusão em ágar descrito por Lewus e Montville (1991). A curva padrão foi obtida através da diluição de nisina padrão na água residuária da mandioca autoclavada a 121 atm por 15 minutos, nas concentrações de  $10^0$  a  $10^5$  AU mL<sup>-1</sup>. A medida média dos halos está relacionada à atividade da bacteriocina, sendo expressa em unidades arbitrárias (arbitrary units- AU). A relação dos diâmetros do halo de inibição com a concentração de bacteriocina gerou uma equação da reta, descrita pela seguinte equação  $PB = \log_{10}^{((0,1632 * x) + 0,6135)}$ . Em que: PB = produção de bacteriocina (AU/mL) e x = medida do halo de inibição (mm).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO: Efeitos das variáveis independentes na produção bacteriocinas de *Leuconostoc mesenteroides* no DCCR:** Na Figura 1 é apresentado o gráfico de Pareto que indica os efeitos das variáveis independentes na produção de bacteriocina no tempo de fermentação de 15 horas.

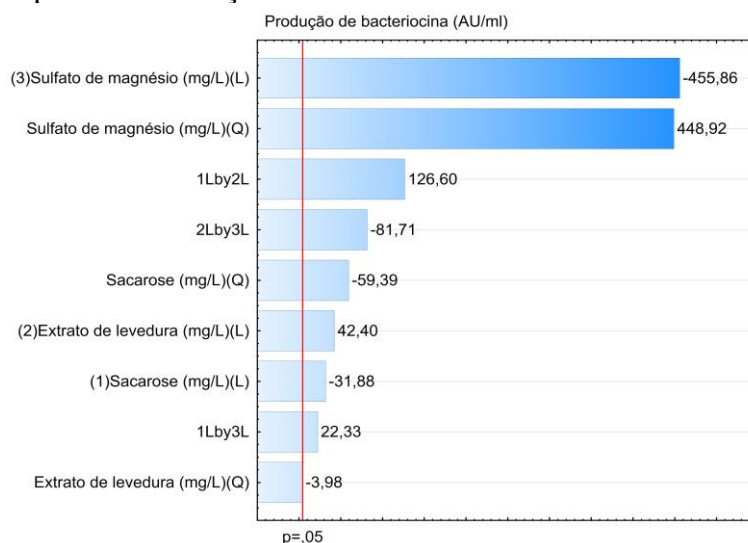


FIGURA 1. Gráfico de pareto com efeito estimado das variáveis independentes para a produção de bacteriocina.

No gráfico de Pareto (Figura 2) identifica-se que a maior parte das variáveis independentes foram significativas ao nível de 95% de confiança para produção de bacteriocinas de *Leuconostoc mesenteroides*, bem como observa-se que a variável sulfato de magnésio, em comparação com a sacarose e o extrato de levedura, foi mais significativa a partir dos valores encontrados. O enriquecimento de resíduos da agroindústria para a produção de bacteriocinas foi relatado por Daba et al. (1991), os autores suplementaram o soro de leite com extrato de levedura e Tween 80, e indicaram um aumento da produção da bacteriocina Mesenterocina 5, produzida a partir da *Leuconostoc mesenteroides* durante a fermentação. Dessa forma, para a melhor produção desse tipo de bactéria láctica é interessante e necessária a suplementação do meio.

**CONCLUSÕES:** A produção da *Leuconostoc mesenteroides* pôde ser otimizada por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizando como substrato a água residuária da fécula de mandioca, representando uma forma de valorização e de minimização dos impactos ambientais gerados por estes resíduos. Considerando os resultados obtidos e a análise estatística descrita, verifica-se que todas as variáveis independentes são significativas em um intervalo de confiança de 95%.

**REFERÊNCIAS:** BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordnia* e CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 135–144, 2006.

DABA, H.; PANDIAN, S.; GOSSELIN, J. F.; SIMARD, R. E.; HUANG, J.; LACROIX, C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 12, p. 3450–5, 1991.

JOZALA, A. F. **Produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp . *lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado , com ou sem suplementação , como meio de cultivo.** 2005. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2005.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 145–150, 1991.

TAPPIBAN, P.; SMITH, D. R.; TRIWITAYAKORN, K.; BAO, J. Recent understanding of starch biosynthesis in cassava for quality improvement: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 83, p. 167–180, 2019.

VILVERT, Raquel Minuceli. **Obtenção de bacteriocina de bactérias lácticas em água residuária de indústria de fécula de mandioca.** 2019. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2019.