

PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA DE *LEUCONOSTOC MESETEROIDES* A PARTIR DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA

ARUANI L. S TOMOTO¹, LUIZ F. G. FERREIRA², TATIANE M. ASSIS³, TATIANE MORE⁴, RAQUEL M. VILVERT⁵, SIMONE D. GOMES⁶

¹ Doutoranda em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, (45)991015822, arutomoto@gmail.com

² Graduando em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,

³ Doutoranda em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,

⁴ Graduada em Ciências biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,

⁵ Doutora em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,

⁶ Professora adjunta, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

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

RESUMO: Com o aumento da demanda do mercado mundial por alimentos naturais e saudáveis, ampliou-se as buscas por novas tecnologias e produtos que conservem os alimentos. A *Leuconostoc mesenteroides* é um microrganismo com potencial para a produção de bacteriocinas que podem ser utilizada como conservante natural de alimentos, e apresenta atividade antimicrobiana. A água residuária de fecularia pode ser utilizada como um substrato para a produção das bacteriocinas. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho consiste na produção da *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) com 17 ensaios e dois tempos de fermentação (15 h), agitação em 100 rpm e 30°C. Nesse experimento, foi verificado que todas as variáveis estudadas exerciam influência na produção de bacteriocinas.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias do ácido láctico, resíduos agroindustriais, DCCR.

LEUCONOSTOC MESETEROIDES BACTERIOCINE PRODUCTION FROM FECULARY RESIDENTIAL WATER

ABSTRACT: With the increase in demand in the world market for natural and healthy foods, the search for new technologies and products that conserve food has increased. *Leuconostoc mesenteroides* is a microorganism with potential for the production of bacteriocins that can be used as a natural food preservative, and has antimicrobial activity. Starch wastewater can be used as a substrate for the production of bacteriocins. In this sense, the objective of this work is the production of *Leuconostoc mesenteroides* using residues from the cassava processing agroindustry. Initially, to optimize the production of bacteriocins, an experimental design called “Central Rotational Compound Experimental Design” (DCCR) was used with 17 tests and two fermentation times (15 h), agitation at 100 rpm and 30°C. In this experiment, it was found that all the variables studied had an influence on the production of bacteriocins.

KEYWORDS: Lactic acid bacteria, agro-industrial waste, DCCR

INTRODUÇÃO: A deterioração de um produto alimentar pode ser definida como qualquer alteração que o torne não consumível do ponto de vista sensorial e de salubridade, uma vez que os produtos devem estar isentos de microrganismos potencialmente patogênicos. A aplicação de peptídeos antimicrobianos de bactérias do ácido láctico, como as bacteriocinas, podem ser utilizados na biopreservação dos alimentos. Bacteriocinas são pequenos peptídeos

sintetizados ribossomicamente, capazes de inativar ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas, possuem resistência a altas temperaturas e pH baixo, o que favorece a aplicação na conservação de alimentos. A bactéria láctica *Leuconostoc mesenteroides* é caracterizada como gram-positiva, catalase negativa, morfologia na forma de cocóides, são fastidiosas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, mesófilas, com crescimento ótimo na faixa de 20 a 30°C (DE PAULA et al., 2015). Os resíduos da indústria processadora da fécula de mandioca possuem uma grande variedade de moléculas que podem ser convertidas em produtos de valor agregado, como na produção de etanol, ácido cítrico, álcool feniletílico, ácido láctico, celulose, hemicelulose, proteína bruta, amido residual, fibras e lignina. A água residuária, resíduo líquido, possui alto valor nutricional, com uma biota autóctone que pode ser utilizada como meio de cultivo na produção de bacteriocinas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar a produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* em escala de bancada por meio do reator anaeróbio em bateladas sequenciais, explorando o aproveitamento da água residuária da fecularia de mandioca para minimizar o impacto ambiental, valorizar os resíduos da agroindústria e gerar produtos com valor agregado.

MATERIAL E MÉTODOS: O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná campus Cascavel. Os resíduos para elaboração do inóculo foram obtidos a partir de uma agroindústria de processamento de mandioca localizada no estado de São Paulo, bem como a obtenção do substrato para a produção da bacteriocina foi utilizado a água residuária da indústria de fécula de mandioca localizada na região do Oeste 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 $\eta_m = 1$.

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). O ágar escolhido para verificar o crescimento das bacteriocinas foi o TSA (Ágar triptona de soja) suplementado com sangue de carneiro em 5% v/v e o *Lactobacillus sakei* foi utilizado como microrganismo indicador da atividade de bacteriocinas. Para quantificar a bacteriocina utilizou do método descrito por Jozala (2005) com um padrão comercial de nisina da Sigma Aldrich contendo 2,5% de nisina correspondendo 10^6 AU g⁻¹. Pela relação entre medida do halo de inibição e concentração de nisina obteve-se um gráfico com a seguinte equação: Equação 1: $Au.mL = 10^{((0,1502 \times (\text{mm do halo})) - 0,2834)}$.

Otimização da produção de bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides* em água residuária da indústria de fécula de mandioca: Considerando as variáveis independentes sacarose, extrato de levedura e sulfato de magnésio que influenciam diretamente no crescimento da bactéria láctica *Leuconostoc mesenteroides*, foi realizado o delineamento composto central rotacional (DCCR – Tabela 1).

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

Experimentos	Sacarose	Extrato de levedura	Sulfato de magnésio
1	-1 (6,07)	-1 (7,02)	-1 (0,30)
2	+1 (23,92)	-1(7,02)	-1 (0,30)
3	-1(6,07)	+1 (12,97)	-1 (0,30)
4	+1 (23,92)	+1 (12,97)	-1 (0,30)
5	-1(6,07)	-1 (7,02)	+1 (1,19)

6	+1 (23,92)	-1 (7,02)	+1 (1,19)
7	-1(6,07)	+1 (12,97)	+1 (1,19)
8	+1 (23,92)	+1 (12,97)	+1 (1,19)
9	- α (0)	0 (10,00)	0 (0,75)
10	+ α (30,00)	0 (10,00)	(0,75)
11	0 (15,00)	- α (5,00)	0 (0,75)
12	0 (15,00)	+ α (15,00)	0 (0,75)
13	0 (15,00)	0 (10,00)	- α (0)
14	0 (15,00)	0 (10,00)	+ α (1,5)
15	0 (15,00)	0 (10,00)	0 (0,75)
16	0 (15,00)	0 (10,00)	0 (0,75)
17	0 (15,00)	0 (10,00)	0 (0,75)

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Efeitos das variáveis independentes na produção 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. Identifica-se que todas as variáveis independentes foram significativas ao nível de 95% de confiança para produção da *Leuconostoc mesenteroides*, bem como observa-se que as variáveis sulfato de magnésio e extrato de levedura, em comparação com a sacarose, foram 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.

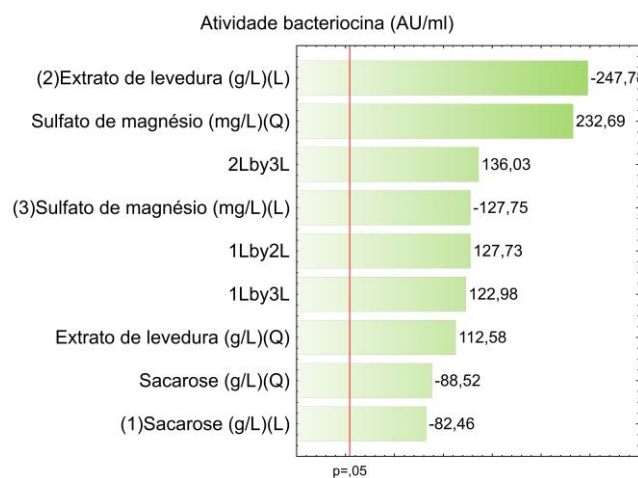


FIGURA 1. Gráfico de Pareto com efeito estimado das variáveis independentes para a produção de bacteriocina

Análise da superfície de resposta do DCCR: O modelo que descreve o comportamento de produção de bacteriocinas de *Leuconostoc mesenteroides* a partir das variáveis independentes (extrato de levedura, sulfato de magnésio e sacarose), apresenta efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. A regressão para os dados de produção de bacteriocina apresentou $R^2=0,84$, representando 84% da variação da eficiência de produção. A ANOVA indicou que o modelo obtido pode ser considerado predito, uma vez que para um nível de confiança de 5% o teste F indicou um F calculado superior ao F tabelado. Dessa forma, a partir desses resultados foram geradas superfícies de resposta a fim de verificar as regiões experimentais que possuem as melhores respostas, representadas na Figura 2.

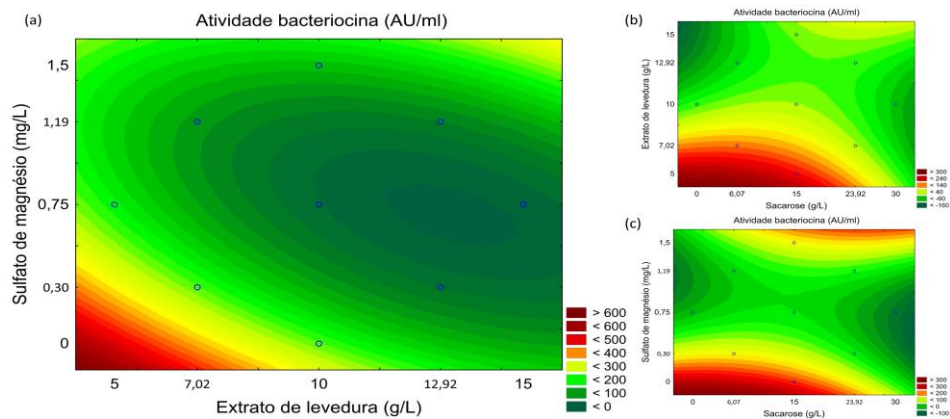


FIGURA 2. Superfície de resposta para produção de bacteriocinas. Legenda: a) Sulfato de magnésio e extrato de levedura; b) Sacarose e extrato de levedura e c) Sacarose e sulfato de magnésio.

Através das superfícies de resposta observa-se que a produção de bacteriocinas foi afetada por todas as variáveis independentes. Quantidades baixas de sacarose, extrato de levedura e sulfato de magnésio propiciaram maiores taxas de produção de bacteriocinas (Figura 2 b-c). Relacionando as variáveis extrato de levedura e sulfato de magnésio (Figura 2- a), verifica-se que esses substratos, assim como foi apresentado no gráfico de pareto (Figura 1) exercem uma maior influência na produção de bacteriocinas do que o substrato sacarose.

CONCLUSÕES: A produção da *Leuconostoc mesenteroides* pode 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%.

AGRADECIMENTOS: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

REFERÊNCIAS: BROMBERG, Renata et al. 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. et al. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 12, p. 3450–5, 1 dez. 1991.

DE PAULA, A. T. et al. The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. **Food Reviews International**, v. 31, n. 2, p. 147–171, 3 abr. 2015.

JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. de L.; CHOLEWA, O.; PENNA, T. C. V. Increase of Nisin Produced by *Lactococcus lactis* in Different Media Through the Five Transfers. **African Journal of Biotechnology**, v. 4 (3), p. 262-265, 2005.

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

PENIDO, F. C. L. et al. Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 823–831, 1 out. 2018.

ZAIAT, M. et al. Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater treatment: a developing technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 29–35, 1 jan. 2001.