

Termoestabilidade de bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp.

RESUMO

Luciana Furlaneto Maia

lucianamaia@utfpr.edu.br

Departamento de Tecnologia de Alimentos,
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

Larissa Cristina Costa

lary_lcc@hotmail.com

Departamento Acadêmico de Alimentos,
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Katia Real Rocha

katiareal@msn.com

Departamento de Microbiologia,
Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, Paraná, Brasil.

Márcia Regina Terra

marciarterra@hotmail.com

Departamento de Microbiologia,
Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, Paraná, Brasil.

Marcia Cristina Furlaneto

furlaneto@uel.br

Departamento de Microbiologia,
Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, Paraná, Brasil.

Bacteriocinas produzidas por diversas espécies de *Enterococcus* (enterocinas) têm mostrado potencial atividade antagônica contra diversos patógenos além de termoestabilidade. Neste trabalho foi avaliado duas enterocinas já caracterizadas produzidas por *Enterococcus faecium* (Efm20) e *Enterococcus* sp (Ent22). A produção de enterocina foi realizada inoculando os isolados em caldo MRS suplementado com glicose (20,0 g/L), tween 20 (5,0 g/L) e lactose (30,0), seguida de incubação por 24 h a 37 °C. Posteriormente, o CFS foi obtido centrifugando a cultura a 10.000 rpm por 15 minutos e filtrado em membrana Millipore. O sobrenadante livre de célula (CFS) foi aquecido a 60 °C, 80°C e 100 °C por 30 minutos, e 121 °C por 15 minutos. A atividade inibitória contra *Listeria innocua* foi realizada pela técnica do *spot on law*. A atividade inibitória não foi substancial nas condições testadas demonstrando assim o potencial de aplicação desta enterocina na indústria de alimentos em função da sua termoestabilidade.

PALAVRAS-CHAVE: enterocina; tratamento térmico; biopreservação.

INTRODUÇÃO

O estudo de bacteriocinas produzidas por Bactérias Ácido Láticas (BAL) tem atraído grande interesse devido seu uso potencial como bioconservante na indústria de alimentos, visando o controle de bactérias potencialmente patogênicas e deteriorantes (CINTAS et al., 2000). Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizadas nos ribossomos das células e são liberados no meio extracelular, com ação bactericida e bacteriostática sobre diversos microrganismos (FRANCO, et al., 2013).

Segundo Schirru et al., (2003), o mecanismo de ação das bacteriocinas pode envolver a ação bactericida com efeito letal associada ou não com uma lise celular, ou ainda, ter efeito bacteriostático, que causa a inibição da multiplicação de microrganismos. Inicialmente, o modo de ação das bacteriocinas ocorre com sua inserção na membrana das bactérias alvo, provocando modificações na sua estrutura celular. Tais modificações levam a formação de poros na membrana citoplasmática, fazendo com que o meio intracelular seja exteriorizado, ou altera a força próton-motora que é utilizada para a produção de energia e para a síntese de proteínas, tornando a célula alvo inviável à sua manutenção (Ogaki et al., 2015).

Dentre as BAL produtoras de bacteriocinas destaca-se o gênero *Enterococcus*, cujas bacteriocinas produzidas são denominadas de enterocinas. Enterocinas possuem largo espectro de inibição contra diversas bactérias, incluindo o gênero *Listeria sp* (SABIA et al., 2002), além de estabilidade a altas temperaturas e a uma ampla faixa de pH, favorecendo sua utilização na indústria de alimentos.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a estabilidade térmica de enterocinas produzidas por dois isolados de *Enterococcus sp*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizados os isolados Efm20 e Ent22 de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus sp*, respectivamente (FURLANETO-MAIA et al. 2015; OGAKI et al. 2016). *Listeria innocua* CLIP 12612 foi utilizada como bactéria indicadora para os testes de ação antagonista.

A produção de enterocinas foi obtida a partir de cultivo em meio MRS suplementado com glicose (20,0 g/L), tween 20 (5,0 g/L) e lactose (30,0). O pH da cultura foi ajustado para 6,5 com NaOH e o cultivo foi incubado a 37 °C por 24 horas. Estes suplementos e condições de cultivo já foram avaliados por este grupo de pesquisa e mostrou-se promissor para produção de enterocinas pelos isolados analisados (dados ainda não publicados).

O sobrenadante livre de célula (CFS) foi obtido pela centrifugação do cultivo celular a 10.000 rpm por 15 minutos. O CFS foi esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22 µm com baixa capacidade de ligação de proteínas (Millipore). O pH do sobrenadante foi ajustado em 6,5 utilizando solução de NaOH 1N para eliminar a inibição causada pela presença de ácido láctico e foram tratados com catalase (300 U.ml⁻¹) a fim de descartar a inibição pela presença de peróxido de hidrogênio (AMMOR et al., 2006).

L. innocua foi cultivada separadamente em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) a 37 °C/18 h.

Para o teste de estabilidade à temperatura, alíquotas de 200 µL de CFS foram incubados em temperaturas constantes de 60 °C, 80 °C e 100 °C por 30 minutos. Uma alíquota também foi submetida a autoclavagem (121 °C) por período de 15 minutos. Para tanto, 20 mL de ágar semi-sólido 0,8%, contendo a bactéria indicadora *L. innocua*, na concentração final correspondente à escala 4 de McFarland (12 x 10⁸ células/mL), foi transferido para uma placa de Petri. Após a solidificação foram feitos 3 poços de aproximadamente 5 mm de diâmetro. Em cada poço foram adicionados 45µL do CFS neutralizado e tratado termicamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e após os halos de inibição foram mensurados em milímetros com auxílio de um paquímetro. Como controle, foi adicionado aos poços o CFS sem tratamento térmico.

A atividade antimicrobiana residual de cada temperatura foi avaliada de acordo com protocolo descrito por De Vuyst et al. (1996), segundo a Equação 1:

$$\text{Atividade Residual (\%)} = \frac{H_t - t \cdot 100}{H_c - t} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

H_t = halo do sobrenadante após tratamento térmico (mm);

H_c = halo do controle (mm);

t = tamanho do poço.

Para a análise estatística comparando os tratamentos foi utilizado o teste Tukey. As análises foram conduzidas com um nível de significância de 5% no programa ASSISTAT 7.6 Beta.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os isolados Efm20 (*E. faecium*) e Ent22 (*Enterococcus* sp) já foram previamente reportado por este grupo de pesquisa como sendo bons produtores de enterocina (OGAKI et al., 2016), do qual inibe várias bactérias patogênicas de alimentos, incluindo as espécies de *Listeria* (dados não publicados). Neste estudo, a maior produção de enterocinas se deu no pH 6,5.

A Figura 1 apresenta os valores da atividade residual da enterocina após aquecimento a 60 °C, 80 °C, 100 °C por 30 minutos e 121 °C por 15 minutos comparado com o controle. Pode-se observar que a estabilidade variou conforme o isolado, contudo, mesmo com aquecimento a 121 °C não houve redução significativa da ação antagônica das enterocinas. Ainda, algumas temperaturas foram capazes de ativar a ação da enterocina, tornando-as mais potentes, como observa-se para enterocina Efm20 a 100 °C e para Ent22 a 60 e 100 °C.

A Tabela 1 apresenta o porcentual da atividade residual das enterocinas após o tratamento térmico. O isolado Ent 22 apresentou maior potencial de resistência térmica quando comparado com o isolado Efm20, mostrando-se viável para a aplicação na indústria. A figura 2 apresenta os halos de inibição formados

contra a bactéria teste, com os CFSs dos isolados Efm20 e Ent22 tratados a 60°C, 80°C, 100°C e 121°C.

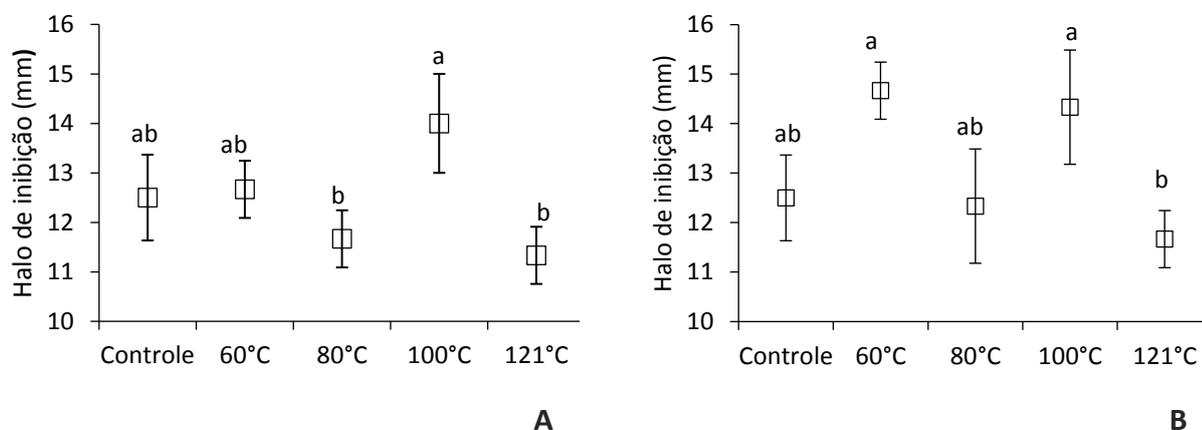


Figura 1 - Comparação entre os tratamentos térmicos da enterocina produzida pelo isolado Efm20 (A) e isolado Ent20 (B), com um nível de significância de 5%.

Tabela 1 - Porcentual da Atividade Residual das enterocinas produzidas pelos isolados Efm20 e Ent 22.

Isolado	Temperaturas (%)			
	60 °C	80 °C	100 °C	121 °C
Efm 20	109,52	95,24	114,29	90,48
Ent 22	138,10	104,76	114,29	95,24

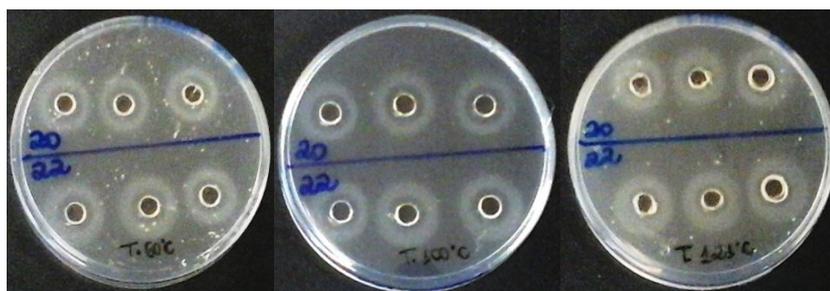


Figura 2 - Halos de inibição, formados pela técnica de poço difusão, com enterocina produzida pelos isolados Efm20 e Ent 22, após tratamento térmico a 60, 100 e 121 °C.

Os resultados revelaram que as enterocinas testadas foram termo-estáveis nas condições testadas. Alguns estudos demonstraram a característica termoestável de enterocinas produzidas por diversas espécies de *Enterococcus* (MORENO et al., 2002; SABIA et al. 2004; KANG e LEE, 2005). Kang e Lee (2005) e Campos et al. (2006) também avaliaram a termoestabilidade da enterocina produzida por *E. faecium*, contudo, estes autores apenas relataram essa condição,

não apresentando o percentual de atividade residual após tratamento térmico, como apresentado em nosso estudo.

Observa-se que para alguns isolados/temperatura, houve aumento na atividade antagônica. Embora esses resultados corroboraram com o trabalho descrito por Ferreira et al (2007) que relataram aumento na atividade antagônica da enterocina produzida por *E. mundtii*, com o aumento da temperatura, não encontramos explicação para este fato.

Estudos revelam que bacteriocinas da classe II apresentam em sua estrutura uma ponte dissulfeto entre duas cisteínas, que desempenha importante papel na atividade antimicrobiana e faz com que seja resistente a temperaturas elevadas (FIMLAND et al., 2005; DRIDER ET AL., 2006; RICHARD et al., 2006).

Todorov (2009) e Moreno et al., (2002) afirmam que a capacidade das bacteriocinas suportarem altas temperaturas é desejável para que haja aplicação delas em alimentos, pois não sofrerão impacto quando submetidas à etapa de tratamento térmico, mantendo suas propriedades antimicrobianas. Resultado interessante obtido em nossos estudos foi que em determinadas temperaturas a atividade antagônica foi maior quando comparado com o controle, sugerindo que a temperatura elevada ativa a ação da enterocina.

CONCLUSÃO

No presente estudo reportamos a estabilidade térmica de enterocinas produzidas por *E. faecium* e *Enterococcus* sp. A atividade antagônica do CFS não foi nula após o tratamento térmico de 60, 80, 100 e 121 °C, inclusive dependendo do isolado/temperatura foi potencializada, mostrando grande potencial do uso industrial dessas enterocinas.

AGRADECIMENTOS

K.R. Rocha agradece à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro na forma de bolsa doutoramento. Os demais autores agradecem o CNPq (processo n. 502230/2009-6) e A Fundação Araucária-PR (processo n. 185/2012) pelo suporte financeiro.

Thermostability of bacteriocins produced by *Enterococcus* sp.

ABSTRACT

The bacteriocins produced by *Enterococcus* species (enterocins) show considerable activity against diverse pathogens and thermostable. Two antimicrobial peptides were isolated from *Enterococcus faecium* (Efm20) and *Enterococcus* sp (Ent22), cultured in MRS broth with glucose (20,0 g/L), tween20 (5,0 g/L) and lactose (30,0), incubated for 24 h at 37 °C. The antimicrobial peptide was obtained by centrifugation at 10.000 rpm for 15 minutes, followed by filtration at Millipore membrane. The CFS were heated at 60 °C, 80 °C and 100 °C for 30 minutes, and 121 °C for 15 minutes. The bacteriocin produced by *E. faecium* (Efm20) and *Enterococcus* sp (Ent22) showed a spectrum of activity against indicator strains of *Listeria innocua*. The inhibitory activity of the bacteriocin was not substantially changed by the use of different temperature.

KEYWORDS: enterocin; heat treatment; biopreservation.

REFERÊNCIAS

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, 17, 454–461, 2006.

BELGACEM, Z. B.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CANAMERO, M.; GÁLVEZ, A.; MANAI, M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 462-470, 2010.

CAMPOS, C. A.; RODRÍGUEZ, Ó.; CALO-MATA, P.; PRADO, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v. 39, n. 3, p. 356-364, 2006.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, vol. 13, n. 4, pp.194–199, 2007.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L. M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

FERREIRA, A. E.; CANAL, N.; MORALES, D.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Characterization of Enterocins Produced by *Enterococcus mundtii* Isolated from Humans Feces. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 50, n. 2, p.249-258, 2007.

GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J. M.; MANAI, M. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v. 19, n. 2, p. 162-169, 2008.

FIMLAND, G.; JOHNSEN, L.; DALHUS, B.; NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 11, p. 688-696, 2005.

FRANCO, B. D. G.; BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. D.; CONVERTI, A.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.

FURLANETO-MAIA, L.; OGAKI, M. B.; BRANDALIZE, C. C.; ROCHA, K. R.; FURLANETO, M. C.: **Enterococcus sp. em alimentos: Paradigmas. Tópicos especiais em Microbiologia**. Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina –PR. 1º edição, p. 71-90, Londrina – PR, 2015.

KANG, J. H.; LEE, M. S. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1169-1176, 2005.

MORENO, M. R. F.; LEISNER, J. J.; TEE, L. K.; LEY, C.; RADU, S.; RUSUL, G.; DE VUYST, L. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 147-157, 2002.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2016.

RICHARD, C.; CANON, R.; NAGHMOUCHI, K.; BERTRAND, D.; PREVOST, H.; DRIDER, D. Evidências sobre correlação entre o número de dissulfeto de ponte e toxicidade da classe bacteriocinas IIa. **Food Microbiology**, v. 23, p. 175-183, 2006.

SABIA, C.; MANICARDI, G.; MESSI, P.; DE NIEDERHÄUSERN, S.; BONDI, M. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 163-170, 2002.

SCHIRRU, S.; TODOROV, S. D.; FAVARO, L.; MANGIA, N. P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; COMUNIAN, R., FRANCO, B. D. G. D.; DEIANA, P. Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 309-320, 2012.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 117-126, 2009.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. D. M. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. **Food Reviews International**, v. 26, n. 3, p. 205-229, 2010.

Recebido: 05 jan. 2017.

Aprovado: 27 dez. 2017.

DOI: 10.3895/rebrapa.v9n2.5275

Como citar:

MAIA, L. F. et al. Termoestabilidade de bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 9, n. 2, p. 43-51, abr./jun. 2018. Disponível em:
<https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

Correspondência:

Luciana Furlaneto Maia

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Avenida dos Pioneiros, 3131, CEP 86036-370, Londrina, Paraná, Brasil.

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

