

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

TALITA BUTZSKE BÚSSOLO

**PROTEÍNA DE SOJA COMO FONTE PROTEICA PARA PRODUÇÃO DE
ENTEROCINA POR *Enterococcus durans***

DEFESA DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO

2021

TALITA BUTZSKE BÚSSOLO

**PROTEÍNA DE SOJA COMO FONTE PROTEICA PARA PRODUÇÃO DE
ENTEROCINA POR *Enterococcus durans***

**SOYBEAN FLOUR AS A PROTEIN SOURCE FOR ENTEROCIN PRODUCTION
BY *Enterococcus durans***

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^o. Dr. Evandro Bona.

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Luciana Furlaneto Maia

CAMPO MOURÃO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

27/06/2022 13:21



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira



TALITA BUTZSKE BUSSOLO

PROTEÍNA DE SOJA COMO FONTE PROTEICA PARA PRODUÇÃO DE ENTEROCINA POR ENTEROCOCCUS DURANS

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 15 de Abril de 2021

Prof Evandro Bona, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Joice Sifuentes Dos Santos, Doutorado - Universidade Norte do Paraná (Unopar)

Prof.a Leila Larisa Medeiros Marques, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Marcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 15/04/2021.

AGRADECIMENTOS

Nessa fase tão importante da minha vida, não posso deixar de agradecer todos que de alguma forma tornaram esse processo mais fácil e feliz.

Agradeço meus pais, meus alicerces.

Agradeço meu esposo e filhos, meu Sol.

Agradeço meus professores, todos eles têm um lugar cativo no meu coração. Em especial, professor Evandro Bona e professora Luciana Furlaneto-Maia, a dedicação, o carinho e a leveza com que conseguimos conduzir esse trabalho só reforçam a ideia de que desejo ser uma professora como vocês.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina e do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos – Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina pela gentileza no auxílio com minhas análises e acolhimento.

Agradeço a todos os meus amigos pela paciência e pelo carinho comigo, em todos os momentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente pelo grupo das bactérias ácido lácticas e apresenta status de GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Tem amplo uso na indústria de alimentos como conservante natural, sendo bactericida contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. A produção de bacteriocina é realizada em meios de cultura complexos e onerosos, inviabilizando a produção em larga escala. Componentes e resíduos da agroindústria têm sido uma alternativa acessível para produção desses metabólitos. Nesse cenário, foram propostos meios de cultura usando farinha de soja como fonte proteica principal, visando a produção de enterocina pelo isolado *Enterococcus durans* MF5. Foram elaboradas quatro formulações, contendo entre 10g/L e 16g/L de farinha de soja, denominadas de M1, M2, M3 e M4, sendo as duas primeiras contendo dextrose em sua formulação. O meio controle foi o Man, Rogosa & Sharpe (MRS). O inóculo bacteriano foi de $1,5 \times 10^6$ UFC, seguido de incubação a 37°C/24h. A PCR confirmou a presença dos genes entA, entX e entP no isolado MF5. A ação antagonista e unidade arbitrária das enterocinas foi testada contra as bactérias alvo *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*, pela técnica de poço difusão e mensuração da densidade óptica. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para avaliar a lise da parede celular das bactérias alvo. A confirmação da constituição proteica da enterocina foi avaliada pela ação de enzimas proteolíticas. A enterocina produzida nas formulações contendo proteína de soja apresentou eficiência na ação antimicrobiana contra as bactérias alvo. As melhores formulações foram M1 e M2, não diferindo dos resultados obtidos em MRS. A MEV mostrou alterações na morfologia e protuberâncias na parede celular das bactérias alvo, enfatizando o extravasamento celular. Após tratamento enzimático, a enterocina perdeu sua atividade, confirmando a constituição peptídica. Os resultados obtidos foram promissores na produção de enterocina.

Palavras-chave: bacteriocinas; bactérias ácido lácticas; farinha de soja; meio de cultura; resíduo industrial; bioprodutos.

ABSTRACT

Bacteriocins are antimicrobial peptides ribosomally synthesized by the group of lactic acid bacteria (LAB) and have GRAS (Generally Recognized As Safe) status. It has wide use in the food industry as a natural preservative, against both Gram positive and Gram negative bacteria. Despite these qualities, bacteriocin is typically produced in complex and expensive culture media, making large-scale production unfeasible. Components and residues from the agribusiness have been a cheap alternative for the production of these metabolites. In this scenario, we propose culture media for the production of enterocin by the isolate *E. durans* MF5 using soybean flour as the main protein source. Four formulations were prepared, containing between 10% and 16% of soybean flour, namely M1, M2, M3, and M4. The first two formulations contain dextrose as well. The control medium was the ManRogosa Sharpe (MRS). The bacterial inoculum was 1.5×10^6 CFU, followed by incubation at 37°C/24h. The PCR detection revealed the presence of *entA*, *entX*, and *entP* genes in the MF5 isolate. Using the well diffusion method, we tested both the antagonistic action and the arbitrary unity of the enterocins against the target bacteria *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. We evaluated the target bacteria cell lysis using scanning electron microscopy (SEM). We also confirmed the protein constitution of the produced enterocin using proteolytic enzymes. The enterocin produced in soybean formulations showed antimicrobial activity against the target bacteria. Moreover, the SEM revealed changes in the morphology and protuberances in the cell wall of the target bacteria, highlighting cell leakage. After enzymatic treatment, enterocin lost its activity, confirming the peptidic constitution. The results are promising, as we developed low-cost culture media for the growth and the production of enterocin by *E. durans* MF5.

Keywords: bacteriocins; lactic acid bacteria; soy flour; culture medium; industrial waste; bioproducts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modo de ação de bacteriocinas	14
Figura 2 – Amplificação dos genes entA, entX e entP	24
Figura 3 – Contagem de <i>Enterococcus durans</i> MF5 (UFC/mL) nos meios formulados 1, 2, 3, 4 e MRS	25
Figura 4 - Atividade inibitória mensurada pela técnica de poço difusão da enterocina produzida nos meios M1, M2, M3 e M4 e controle MRS (A); halo de inibição da enterocina contra <i>Listeria innocua</i> (B); Unidade Arbitrária da enterocina produzida nas 4 formulações e MRS contra <i>L.innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i> (C)	27
Figura 5 - Atividade inibitória da enterocina produzidas nos meios M1 e M2 contra <i>L. monocytogenes</i> (A) e <i>Listeria innocua</i> (B), pela mensuração da DO (densidade ótica) em cultivo líquido a 540nm	29
Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando <i>Listeria</i> sp tratada e não com enterocina. A: <i>L.innocua</i> controle; B: <i>L.innocua</i> afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M1; C: <i>L.innocua</i> afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M2; D: <i>L. monocytogenes</i> controle; E: <i>L.monocytogenes</i> afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M1; F: <i>L. monocytogenes</i> afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M2.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes e propriedades de bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido lácticas (BAL)	12
Tabela 2 - Classificação de enterocinas de acordo com características estruturais.....	15
Tabela 3 – <i>Enterococcus</i> sp. e enterocinas utilizadas no controle de patógenos alimentares	16
Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores de enterocina em <i>Enterococcus durans</i>.....	20
Tabela 5 – Composição do meio de cultivo para produção de enterocinas	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Bacteriocinas	12
3.2	Mecanismos de ação das bacteriocinas	13
3.3	<i>Enterococcus</i> e enterocinas.....	15
3.4	Farinha de soja como fonte proteica para produção de bacteriocina 17	
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Linhagens bacterianas.....	19
4.2	Determinação de genes codificadores de enterocinas.....	19
4.3	Elaboração do meio de cultura contendo farinha de soja para a produção de enterocina.....	20
4.4	Contagem bacteriana total	21
4.5	Atividade antagônica de enterocinas sobre isolados alvo	21
4.6	Mensuração da unidade arbitrária	22
4.7	Atividade antimicrobiana contra isolados alvo	22
4.8	Estabilidade térmica do composto antimicrobiano.....	22
4.9	Efeito do tratamento enzimático na atividade antimicrobiana	23
4.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	23
4.11	Análise estatística	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Genotipagem.....	24
5.2	Contagem bacteriana total	25
5.3	Atividade antagônica e mensuração da unidade arbitrária	26
5.4	Estabilidade térmica e efeito do tratamento enzimático na enterocina 28	
5.5	Atividade antimicrobiana contra células-alvo.....	28
5.6	Microscopia eletrônica de varredura	30
6	CONCLUSÕES	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do grupo ácido láctico (BAL) produzem uma ampla variedade de fatores antagônicos que incluem produtos metabólicos finais, como ácido láctico, substâncias semelhantes a antibióticos e proteínas antimicrobianas ou bacteriocinas (ZOU; LIU, 2018). Dentre esses compostos, destacam-se as bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos ativos contra a deterioração de alimentos e microrganismos patogênicos de origem alimentar.

Bacteriocinas produzidas por BAL tem atraído grande atenção por causa do seu status Geralmente Reconhecido Como Seguro (GRAS) e seu uso potencial como aditivo na conservação de alimentos. São efetivas em pequenas quantidades, sem causar alterações das propriedades sensoriais do alimento. Nisina é a bacteriocina mais estudada e aplicada em alimento como aditivo alimentar, apresentando amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, porém, pouco eficaz contra bactérias Gram-negativas, fungos e leveduras (DELVES-BROUGHTON, 1990).

Portanto, bacteriocinas com amplo espectro de ação tem futuro promissor como conservante de alimentos. Um exemplo de peptídeos com essa característica é a enterocina, produzida por bactéria do gênero *Enterococcus*. Diversas enterocinas foram caracterizadas, apresentando propriedades tecnológicas importantes, como termoestabilidade, capacidade de agir em ampla faixa de pH, e apresentar amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, atuando principalmente na membrana citoplasmática das células-alvo. Vários relatos de antagonismo com enterocina já foram descritos, a exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (GRANDE et al., 2005; MUÑOZ et al., 2007; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2016; ROCHA et al., 2019).

As enterocinas podem ser utilizadas nos alimentos de duas formas: pela inoculação do isolado como uma cultura bioprotetora ou pela adição de enterocina produzida e concentrada. Em vista disso, a produção da bacteriocina deve ser de baixo custo, tornando o produto economicamente viável.

Atualmente o meio de cultura utilizado para o crescimento de bactérias produtoras de bacteriocinas é o MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), cujo custo de aquisição o torna um meio desfavorável para produção em escala industrial.

O baixo rendimento na produção e dificuldades na obtenção de quantidades significante de bacteriocina pura tem limitado a caracterização bioquímica e física dos compostos ativos, em muitos casos (LÓPEZ et al., 2007). É também importante encontrar um substrato de crescimento de qualidade alimentar para que a cepa bacteriocinogênica produza bacteriocina (ANANOU et al., 2008). Portanto, um dos desafios à produção de bacteriocinas é diminuir o custo do meio de cultura produtor desses peptídeos.

A determinação dos parâmetros ideais para a produção de bacteriocina está entre os pré-requisitos para seu emprego na indústria de alimentos (HERRANZ et al., 2001). Diferentes substratos, a composição do meio e a concentração de nutrientes têm uma grande influência na produção de enterocina. São também, um dos problemas principais para estudar a eficácia de bacteriocina em alimentos. (LÓPEZ et al., 2007).

Uma alternativa para produção de enterocinas é a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes para as bactérias produtoras. O resíduo do beneficiamento da soja possui um teor proteico em torno de 40%, sendo então um potencial componente para uso em meios de cultura.

Conhecendo o promissor potencial da enterocina, mas ciente da falta de padrão na sua produção, bem como o alto custo para tal, o objetivo deste trabalho foi testar quatro formulações contendo farinha de soja como fonte proteica, para a produção de enterocina pelo isolado *Enterococcus durans* MF5, e testar sua ação antagônica em *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir enterocinas por *Enterococcus durans* MF5, em meio de cultura elaborado com farinha de soja como fonte proteica.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar quatro formulações contendo proteína de soja como fonte proteica para produção de enterocina;
- Confirmar a presença de genes codificadores de bacteriocina;
- Determinar a atividade bacteriocinogênica das formulações contra *Listeria innocua* CLIP12612 e *Listeria monocytogenes* CLIP2032;
- Confirmar a constituição proteica da enterocina produzida em proteína de soja;
- Avaliar a estabilidade térmica da enterocina produzida em proteína de soja;
- Verificar as alterações ao nível de membrana citoplasmática por meio da microscopia eletrônica de varredura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bacteriocinas

Bacteriocinas são pequenos peptídeos antimicrobianos, sintetizados no ribossomo bacteriano. São considerados um mecanismo de defesa das bactérias, sendo que a cepa produtora é naturalmente imune a própria bacteriocina (CLEVELAND et al., 2001). Possuem ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, afetando primariamente a membrana citoplasmática (GHRAIRI, 2008; ÖZDEMIR et al., 2011).

As bacteriocinas são classificadas com base em suas estruturas primárias, pesos moleculares, modificações pós-tradução e características genéticas (Tabela 1). No entanto, não existe um esquema de classificação de bacteriocina adotado universalmente. Originalmente, três classes foram reconhecidas, embora haja pequenas diferenças na descrição das subclasses entre diferentes autores (BURKE et al., 2013; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2016).

Tabela 1 – Classes e propriedades de bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido lácticas (BAL)

Classe	Espécie produtora	Propriedades
I	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Contém lantionina e metil-lantionina, <5 KDa
IIa	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Termoestável, hidrofóbico, catiônico, contém dupla ligação de glicina, peptídeos pediocina-like, <10 KDa
IIb	<i>Enterococcus faecium</i>	Peptídeos catiônicos, requer sinergismo de peptídeos complementares
IIc	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Afetam permeabilidade membrana e formam poros
III	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Termoestável, elevado peso molecular, >50 KDa

Fonte: Autoria própria (2021)

Dentre as bactérias produtoras de bacteriocinas, destacam-se as BAL, devido seu uso potencial na conservação de alimentos, sendo uma alternativa viável para atender à crescente demanda de alimentos seguros, saudáveis e minimamente processados (ANANOU et al., 2008). Outras vantagens ao uso de bacteriocinas produzidas por BAL são o fato de serem estáveis ao calor, degradadas no trato

intestinal por enzimas proteolíticas e também por não causarem alterações sensoriais nos alimentos (OLIVEIRA; SIQUEIRA JÚNIOR; SILVA, 2012).

A produção de bacteriocinas depende da cepa microbiana e das condições de cultura; sua síntese ocorre no início da fase de crescimento até o final da fase exponencial. Essa produção pode ser induzida por uma situação de estresse, como escassez de nutrientes ou excesso populacional, já sua inibição ocorre com adição de surfactantes ou mesmo pelas condições nutricionais do meio (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2016). Inicialmente são biologicamente inativas, e posteriormente modificados para atingir um estado ativo. Geralmente, os genes que codificam a produção de bacteriocina e imunidade são organizados em grupos de operons, localizados em elementos genéticos móveis, como cromossomos em associação com transposons ou plasmídeos (PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014).

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos pela inoculação da bactéria produtora ou pela adição da bacteriocina purificada (ANANOU et al., 2008). Para a indústria de alimentos, a utilização de bacteriocinas é de grande valia, já que são peptídeos geralmente termorresistentes. Sua aplicação como barreira reduziria as cepas contaminantes, conseqüentemente aumentaria a qualidade e segurança alimentar, influenciando também, na redução da utilização de processos mais severos para conservação do alimento (BURKE et al., 2013; OLIVEIRA; SIQUEIRA JÚNIOR; SILVA, 2012).

3.2 Mecanismos de ação das bacteriocinas

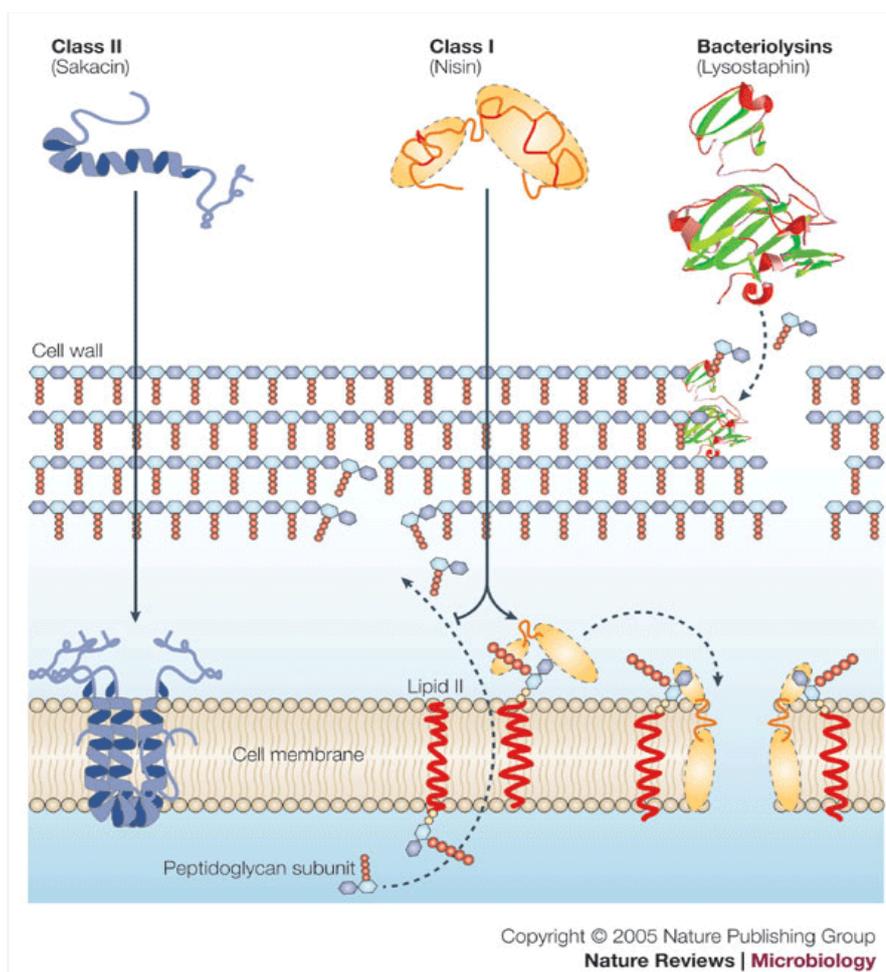
A ação primária da bacteriocina é a membrana plasmática das bactérias alvo, agindo a permeabilidade na membrana por meio da formação de poros, o que promove a dissipação da força próton motora (PMF) e inibição do transporte de aminoácidos. A PMF está envolvida em diversos processos na membrana citoplasmática, tais como o acúmulo de íons e metabólitos, e a síntese de ATP (MOKOENA, 2017).

Outras bacteriocinas podem inibir também bactérias Gram-negativas, estas necessitam transpor a membrana externa da parede celular e alcançar a membrana plasmática da célula-alvo para atuarem. Em contato com a membrana plasmática são capazes de interferir na síntese de DNA, RNA e proteínas (BURKE et al., 2013).

Alguns membros da Classe I, como a nisina, se liga ao lipídeo II impedindo a

síntese correta da parede celular, levando a formação de poros. As bacteriocinas de Classe II se ligam a receptores da membrana da célula-alvo, conduzindo à despolarização por dissipação da PMF, conseqüentemente há o desequilíbrio do conteúdo intracelular. Bacteriocinas Classe III ou bacteriolisinas, podem funcionar diretamente sobre a parede celular de bactérias Gram-positivas alvos, causando sua lise (COTTER; HILL; ROSS, 2005) (Figura 1).

Figura 1 – Modo de ação de bacteriocinas das classes I, II e bacteriolisina (classe III)



Fonte: Cotter, Hill, Ross (2005)

Além da membrana citoplasmática, as bacteriocinas podem atuar em outras estruturas das bactérias alvo. A nisina é capaz de inibir a germinação de esporos bacterianos e a atividade de enzimas autolíticas (MOLL et al., 1996). Ainda, há relatos de ação inibidora da síntese proteica e degradação do DNA, em concentrações de pico a nanomolar (GILLOR; VRIEZEN; RILEY, 2008).

Bactérias produtoras de bacteriocinas possuem um mecanismo de imunidade

que as protegem da ação de suas próprias bacteriocinas. A proteção é conferida por um peptídeo de imunidade expresso concomitantemente às bacteriocinas (NES; BREDE; DIEP, 2013).

3.3 *Enterococcus* e enterocinas

Os enterococos são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas, cujo principal produto do metabolismo fermentativo da glicose é o ácido láctico, por isso são caracterizadas como bactérias ácido-láticas (BAL). O gênero *Enterococcus* inclui mais de 54 espécies e 2 subespécies, sendo as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* as mais encontradas em alimentos e habitat relacionados. Algumas espécies têm motilidade, e em sua maioria, apresentam crescimento entre 10°C a 45°C na presença de 6,5% de NaCl (FRANZ et al., 2007). Espécies de enterococos constituem parte da microbiota normal do intestino de seres humanos e animais de sangue quente, além de serem isolados de água, solo e plantas (HAJIKHANI; BEYATLI; ASLIM, 2007).

Bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp. são denominadas de enterocinas, e são classificadas em quatro classes, segundo Franz et al. (2007). (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação de enterocinas de acordo com características estruturais

Classificação	Exemplos
Classe I - Enterocinas lantibióticas	Citolisina
Classe II - Enterocinas não lantibióticas	
Classe II.1 - Enterocinas tipo pediocina	Enterocina A e P
Classe II.2 - Enterocinas sintetizadas sem peptídeo líder	Enterocina L50A e L50B
Classe II.3 - Outras lineares, e do tipo não pediocina	Enterocina B
Classe III - Peptídeos cíclicos antibacterianos	Enterocina AS-48
Classe IV - Proteínas grandes	Enterolisina A

Fonte: Franz et al. (2007)

As enterocinas mais estudadas são A, B, P, L50A e L50B (DU TOIT et al., 2000), principalmente devido as suas propriedades anti-listeriais, especialmente em produtos cárneos. Além disso, o efeito sinérgico das enterocinas juntamente a outros conservantes, ou tratamentos físicos, tais como calor e alta pressão, mostrou um

melhoramento na atividade antimicrobiana das enterocinas (KHAN; FLINT; YU, 2010).

Várias bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de *Enterococcus* sp. já foram testadas em diversos produtos alimentícios, tendo como alvos espécies patogênicas como *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus* e *S. aureus* (Tabela 3).

Tabela 3 – *Enterococcus* sp. e enterocinas utilizadas no controle de patógenos alimentares

Produtor	Bacteriocina	Alimento testado	Alvo bacteriano
Efm 7C5	Indefinida	Taleggio (queijo suave italiano)	<i>L. monocytogenes</i>
Efm7C5	Indefinida	Leite	<i>L. innocua</i>
Efm WHE 81	Ent A e B	Queijo Munster	<i>L. monocytogenes</i>
Efm F58	Ent L50A e B	Leite de cabra e Jben (queijo marroquino de leite de cabra)	<i>L. monocytogenes</i>
Efs A-48-32	Ent AS-48	Queijo sem gordura	<i>Bacillus cereus</i>
Efs A-48-32	Ent AS-48	Leite desnatado e queijo suave sem gordura maturado	<i>S. aureus</i>
Efm CCM 4231, Efm RZS C13	Ent CCM 4231, Ent 13	Salames secos fermentados espanhóis	<i>Listeria spp.</i>
Ecf IM 416K1	Ent 416k1	Cacciature (salame italiano)	<i>L. monocytogenes</i>
Efm CTC 492	Ent A e B	Salame seco fermentado	<i>L. innocua</i>
Efm CTC 492	Ent A e B	Carne de porco cozida	<i>L. sakei CTC746</i>

Fonte: Khan, Flint, Yu (2010) Efm = *Enterococcus faecium*, Efs = *Enterococcus faecalis*, Ecf = *E. casseliflavus* e Ent = enterocina(s)

Em teste *in vitro* utilizando presunto cozido, a enterocina AS-48 (concentrações de 20 a 60µg/g) foi ativa contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*, após armazenamento a 5 e 15°C (ANANOUE et al., 2008).

A associação de enterocina e elevada temperatura diminuíram o número de sobreviventes viáveis de *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis* (BURGOS et al., 2014). Esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foram extremamente afetados após 1 minuto de contato com enterocinas (GRANDE et al., 2005).

As enterocinas podem ser recuperadas de culturas líquidas a partir de células em fase exponencial e estacionária, indicando que é produzida durante o metabolismo celular primário. Um meio mínimo foi projetado para facilitar a produção de bacteriocina de alto rendimento e a purificação rápida em duas etapas com base na cromatografia de troca catiônica seguida por cromatografia semi-preparativa de fase reversa de alto desempenho (ABRIOUEL et al., 2003). Enterocinas também podem ser

produzidas em subprodutos alimentares baratos, como o permeado de soro de leite, o que abre o caminho para uma produção em escala industrial de preparações de bacteriocina adequadas para serem usadas como aditivos alimentares (ANANOU et al., 2008).

Kawai et al. (2001) utilizaram um derivado parcialmente deslactosado e desmineralizado de soro de leite, enriquecido em proteínas do leite para produção de enterocina. Schueler (2017) relatou a obtenção de enterocina com um meio de cultura enriquecido com milhocina, como fonte proteica adicional.

Em condições ideais de fermentação, a unidade arbitrária (UA) de enterocina pode chegar a 360UA/mL (equivalendo a 104 µg de bacteriocina por mL), após 18h de cultivo (BURGOS et al., 2014).

3.4 Farinha de soja como fonte proteica para produção de bacteriocina

Soja é um cultivar oriundo de países como China e Japão, que encontrou no Brasil, condições ideais para se desenvolver. Dados recentes do CONAB, nos colocam como os maiores produtores de soja do mundo, sendo que na safra de 2019/2020, o país produziu, até setembro de 2020, cerca de 124,845 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Sua composição química em base seca é de cerca de 40% de proteína, 20% de óleo, 35% de carboidratos e 5% de cinzas (PÍPOLO; MANDARINO, 2016).

A produção de bacteriocina é frequentemente realizada no meio MRS, composto por tween, infusão de cérebro e coração, triptona de soja, extrato de levedura e sais, que promove crescimento abundante e rendimentos relativamente altos de bacteriocina. No entanto, esses meios são caros e apresentam elevadas quantidades de proteínas podendo interferir na purificação subsequente da bacteriocina (GUERRA et al., 2001). Assim, o processamento biológico de subprodutos industriais pode ser considerado uma alternativa rentável de utilização, gerando bioprodutos de alto valor e estimulando pesquisas para seu uso.

Produtos do beneficiamento da soja podem ser utilizados para o desenvolvimento de microrganismos. Penariol et al. (2008) desenvolveram um meio de cultura a base de farinha de soja visando a propagação do fungo *Bipolaris euphorbiae* utilizado no controle biológico.

Diversos autores relatam a utilização da farinha de soja ou a proteína de soja para produção de bacteriocinas. Dominguez et al. (2007) relataram a produção de cereína em meio de cultivo composto por resíduos de soja. Leães et al. (2011) obtiveram bacteriocinas a partir do crescimento de *Bacillus* sp em proteína de soja e grãos de soja macerados, apresentando a média de 800UA/mL.

Motta e Brandelli (2008) também utilizaram meio de cultura contendo proteína de soja para produção de bacteriocina de *Bacillus* sp.

Muitos dos trabalhos desenvolvidos para produção de bacteriocina em meio contendo proteína de soja, focam-se em *Bacillus*. Nenhum trabalho foi relatado analisando a produção de enterocinas nesse tipo de meio, sendo, portanto, uma estratégia importante para a produção em escala comercial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas

Neste estudo foi utilizado o isolado *E. durans* MF5 (TOSONI, 2019). Este isolado foi proveniente de queijo e apresentou atividade antilisterial.

As bactérias indicadoras foram *L. monocytogenes* CLIP2032 e *L. innocua* CLIP12612.

As culturas encontravam-se estocadas em freezer e foram reativadas em 5mL de caldo MRS (Man, Rogosa & Sharpe/Sigma) para *E. durans* e caldo LB (Luria Bertani/Sigma) para *Listeria* sp, seguido de incubação a 37°C/24 horas.

4.2 Determinação de genes codificadores de enterocinas

A extração de DNA total seguiu o método de fervura (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2016). *E. durans* MF5 foi cultivado em caldo BHI, incubados a 37°C, sob agitação de 180rpm, por 18 horas. O cultivo foi centrifugado por 10min a 10.000rpm, e o sedimento foi ressuspenso em 300µL de água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi aquecida a 100°C por 30 minutos, seguido de choque térmico em banho de gelo por 5 minutos, e novamente centrifugada. Um volume de 150µL do sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer a -20°C.

Para a identificação dos genes que expressam as enterocinas A, B, L50A, L50B e P foram usados os oligonucleotídios iniciadores descritos na tabela 4.

As reações serão realizadas em misturas com volume final de 20µL, contendo 20ng/mL DNA, 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5mM de MgCl₂, 0,17mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Forward e Reverse).

Para as reações de amplificação foi usado o termociclador ESCO (Swift-Max-Pro), nas condições: ciclo de desnaturação inicial de 95°C/5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C/30s, temperatura de pareamento correspondente ao oligonucleotídeo (Tabela 4) por 30s, 72°C/30s, e extensão final a 72°C por 5 min. O controle negativo continha todos os reagentes, exceto a amostra de DNA (FOULQUIÉ MORENO et al., 2003).

A visualização dos produtos da amplificação foi realizada em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados

com sistema de fotodocumentação computadorizado L-PIX ST (LOCCUS). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Amersham Pharmacia Biotech).

Tabela 4 – Oligonucleotídios iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores de enterocina em *Enterococcus durans*

Gene alvo	Sequência (5´-3´)	Temperatura de hibridação (°C)	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>EntA</i>	ggtaccactcatagtggaaa ccctggaattgctccaccta	55	138	OZDEMIR et al., 2011
<i>EntB</i>	caaaatgtaaaagaattaagtagc agagtatacattgctaacc	56	201	FOULQUIÉ MORENO et al., 2003
<i>EntP</i>	gctacgcggtcatatggaat tcctgcaatattctcttagc	55	87	OZDEMIR et al., 2011
<i>entL50A/B</i>	atgggagcaatcgcaaaatta tagccattttcaattgatc	55	274	OZDEMIR et al., 2011
<i>Enterocin 1071 AB</i>	ggggagagtcggttttag atcatatgcgggttagcc	50	243	MARTIN et al., 2006
<i>Enterocin 31</i>	cctacgtattacggaaatggt gccatggttacccaaccatt	50	122	DU TOIT et al., 2000
<i>Enterocin AS48</i>	atattgtaaaattaccaa gaggagtatcatggttaaaga	50	185	DU TOIT et al., 2000
<i>Enterocin X</i>	cctcttaatacattaaccatac gtttctgtaaaagagatgaaac	50	500	EDALATIAN et al., 2012

Fonte: Autoria própria (2021)

4.3 Elaboração do meio de cultura contendo farinha de soja para a produção de enterocina

A produção de enterocina foi realizada em quatro meios de cultura, elaborados com proteína de soja (Tabela 5).

Tabela 5 – Composição do meio de cultivo para produção de enterocinas

Composição (g/L)	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
Farinha de soja	10	16	10	15
Dextrose	20	20	-	-
Tween 20 ou 80	1	1	1	1
Fosfato de potássio	2	2	2	2
Cloreto de sódio	-	-	5	5
Tripton	-	-	15	15

Fonte: Autoria própria (2019)

Ajustou-se as quatro formulações para pH 6,5 com NaOH 1N.

O cultivo foi realizado em frascos de 500mL contendo 250mL de cada substrato a ser testado. O cultivo bacteriano foi na concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹, e os frascos foram incubados a 37°C/24h, sob agitação de 120rpm. O controle foi a produção de enterocina em meio MRS.

O Sobrenadante Livre de Células (CFS) foi obtido conforme metodologia descrita por Rocha et al. (2019). O cultivo celular foi centrifugado a 10.000rpm por 15 min e o sobrenadante teve pH ajustado em 6,5 utilizando solução de NaOH 1N e tratamento com 1mg/mL de catalase. O CFS contendo a enterocina foi esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22µm com baixa capacidade de ligação de proteínas (*Millipore*) e mantido a -20°C.

A concentração da enterocina foi realizada por liofilização no equipamento liofilizador modelo L101, marca Liotop. No momento de uso, uma solução de enterocina a 1 mg/mL foi feita em água ultrapura estéril.

4.4 Contagem bacteriana total

Nos tempos 0, 6 e 18h foram retiradas alíquotas de cada meio de cultivo para determinação da contagem bacteriana total em placa para a determinação da Unidade Formadora de Colônia (UFC).

4.5 Atividade antagônica de enterocinas sobre isolados alvo

O teste da atividade antimicrobiana de enterocina seguiu o protocolo de poço difusão, segundo metodologia descrita por Furlaneto-Maia et al. (2020). Para tanto, 20mL de meio BHI semissólido, contendo *L.monocytogenes* e *L.innocua* na concentração final correspondente à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL) foi transferido para uma placa de Petri e após a solidificação foram feitos poços de aproximadamente 5mm de diâmetro com auxílio de ponteiros estéreis. Em cada poço foi adicionado 30µL de enterocina.

As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 2h, para permitir a difusão do sobrenadante no ágar e posteriormente foram incubadas a 37 °C/24h. Os

halos de inibição foram mensurados em milímetros, com paquímetro eletrônico. Cada teste foi realizado em triplicata em duas repetições independentes.

4.6 Mensuração da unidade arbitrária

Para avaliação da atividade da enterocina, foi utilizado o método de diluição crítica de Mayr-Harting; Hedges; Berkeley (1971). A inoculação das bactérias alvo seguiu o descrito no protocolo anterior.

A solução de enterocina foi diluída na proporção 1:2 (v/v) em solução salina a 0,85% e seguiu-se a inoculação de poço difusão. Após incubação, a inibição foi detectada visualmente por meio da observação das zonas de inibição clara em torno do isolado testado. A atividade foi expressa em unidades arbitrária (UA.mL⁻¹), definida como sendo a recíproca da maior diluição que não apresentar crescimento bacteriano, multiplicado por 100.

4.7 Atividade antimicrobiana contra isolados alvo

A lise da bactéria indicadora foi avaliada pela metodologia descrita por Todorov (2008). Para tanto, 20mL de solução de enterocina (1mg/mL) foi adicionada a 100mL de uma cultura de 3h de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em meio BHI (Brain Heart Infusion – Sigma), e incubado a 37°C. Nos tempos 0h, 8h, 12h e 24h a densidade óptica (DO_{540nm}) foi mensurada. O controle foi realizado mensurando o cultivo celular sem enterocina.

4.8 Estabilidade térmica do composto antimicrobiano

A estabilidade térmica dos compostos antimicrobianos com os diferentes substratos foi avaliada tratando a solução de enterocina (1mg/mL) a 80°C/10min e 100°C/20min (AMMOR; DUFOUR; CHEVALLIER, 2006). A mensuração da atividade antimicrobiana seguiu como descrito anteriormente no item 4.6.

4.9 Efeito do tratamento enzimático na atividade antimicrobiana

Para avaliar a sensibilidade do composto antimicrobiano frente a enzimas proteolíticas, a solução de enterocina (1mg/mL) foi tratada com as enzimas α -quimiotripsina, protease e proteinase-K, individualmente, em concentração final de 1mg/mL. As amostras foram incubadas a 37°C/1h e a atividade residual foi determinada pelo ensaio de difusão em poços (GARRIGA et al., 1993).

4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a produção das amostras seguiu-se a metodologia descrita por Rocha et al. (2019). As células das bactérias indicadoras foram cultivadas em 10mL de meio BHI contendo solução de enterocina e mantidos a 37°C/18 horas. Seguiu-se centrifugação do cultivo a 10.000rpm/5min, e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio 50mM, pH7 e submetidas novamente à centrifugação. Este processo de lavagem foi realizado duas vezes e o concentrado de células foi ressuspensão em 5mL do mesmo tampão. As células foram fixadas em lâminas com glutaraldeído a 2,5% (Electron Microscopy Sciences) em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M por 18h a 4 °C.

As amostras foram desidratadas suavemente em etanol graduado de 30 a 100% de etanol (30%/10 min, 50%/10 min, 70%/10 min, 80%/10 min, 90%/10 min, 100%/15 min), secas em CO₂ (secador de pontos críticos BALTEC DCP 030), revestidas com ouro (sputter BALTEC SDC 050) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

4.11 Análise estatística

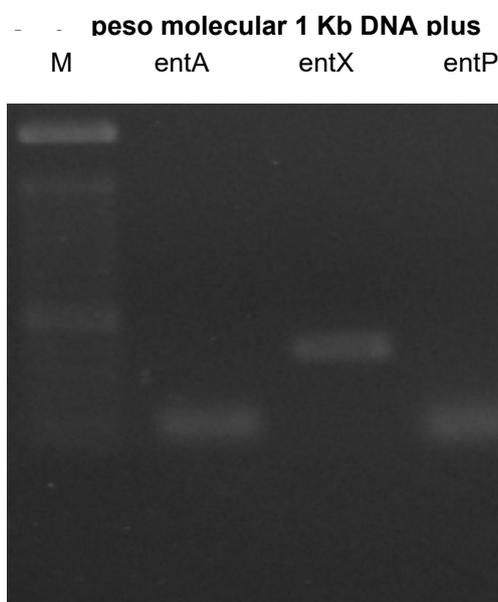
Os valores médios dos halos foram avaliados usando análise de variância one-way (ANOVA) e Teste de Tukey, considerando $p < 0,05$, para estipular diferenças significativas entre a atividade antimicrobiana da enterocina obtida nos diferentes meios de cultivo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Genotipagem

A amplificação por PCR usando oligonucleotídios específicos, conforme apresentado na Tabela 5 foi usado para rastrear o DNA de *E. durans* MF5 existência de genes conhecidos de enterocina. Este estudo mostrou que o isolado MF5 apresentou os genes entA, entX e entP conforme bandeamento de 138, 500 e 87 pb (Figura 2), respectivamente.

Figura 2 – Amplificação dos genes entA (138 pb), entX (500 pb) e entP (87 pb). M marcador de



Fonte: Autoria própria (2020)

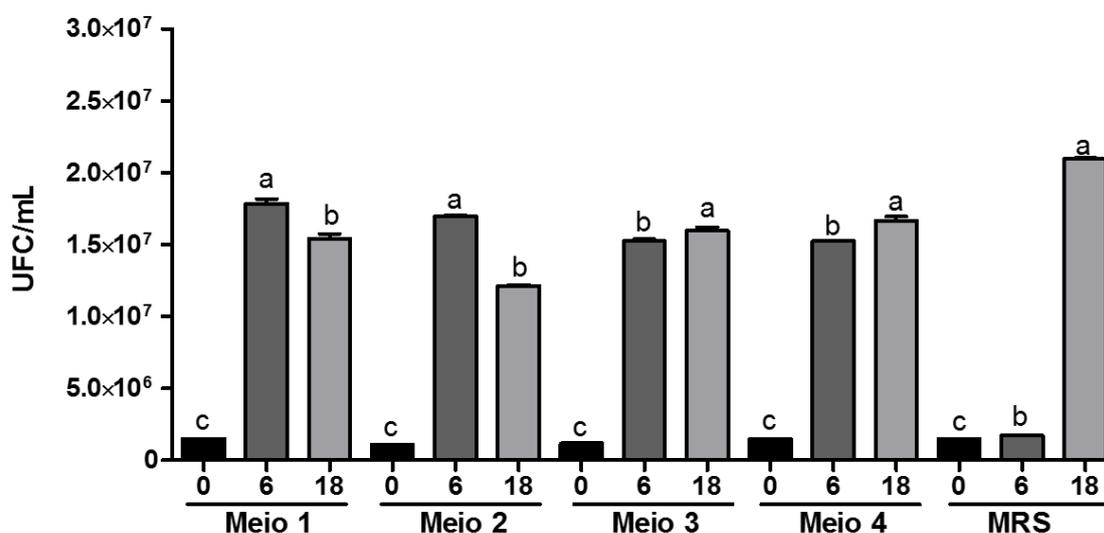
Os genes codificadores de enterocinas mais comumente encontrados em isolados de *Enterococcus* são os genes A, B, P, L50 A e L50B (REHAIEM et al., 2012; RIVAS et al., 2012). Diversos autores relatam a presença de mais de um gene para enterocina, corroborando com o resultado obtido neste estudo (ÖZDEMIR et al., 2011; RIVAS et al., 2012).

Franz et al. (2007) e Masias et al.(2017) relataram que enterocina pode ser classificada como bacteriocina classe IIa, mostrando atividade antimicrobiana contra *Listeria* spp., especialmente *L. monocytogenes*, e também *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* spp. Rocha et al. (2019) também relataram que os genes A, P e X foram frequentemente detectados em isolados de *Enterococcus*.

5.2 Contagem bacteriana total

Neste estudo foram formulados 4 meios de cultura contendo farinha de soja como fonte proteica, visando a produção de enterocina. Afim de determinar a interferência da composição do meio no crescimento do isolado *E. durans* MF5, procedeu-se a contagem bacteriana nos tempos 0, 6 e 18h de incubação. A contagem de células está apresentada na figura 3. Observa-se que o desenvolvimento celular ocorreu já nas primeiras 6 até às 18h de incubação nos meios formulados, diferindo do controle (MRS). Destacamos que o meio 1 e 2 apresentaram melhor desenvolvimento celular em 6h diferindo estatisticamente ($p < 0.05$) do tempo de 18h. Esses dados demonstram um ponto positivo para produção de enterocina, com redução no tempo de incubação.

Figura 3 – Contagem de *Enterococcus durans* MF5 (UFC/mL) nos meios formulados 1, 2, 3, 4 e MRS



Fonte: Autoria própria (2020)

Mesmo nos meios isentos de dextrose (meios 3 e 4) e com adição de cloreto de sódio, observou-se crescimento, o que indica que uma boa fonte de proteínas, como a farinha de soja e a peptona, pode ser suficiente para o crescimento de *Enterococcus*, porém a adição de dextrose pode ser um agente melhorador. Maia et al. (2019) descreveram que a adição de fonte de açúcar em meio MRS propiciou melhoria no desempenho da produção de enterocinas. Nossos resultados corroboram com os encontrados por Dominguez et al. (2007), que relataram um aumento na

produção de cereína 8A, de *Bacillus cereus*, quando crescido em proteína de soja. Resultados semelhantes também foram obtidos por Furlaneto-Maia et al. (2017), que utilizaram água de maceração de milho (milhocina) como aditivo em meio de cultura comercial para obter bacteriocina.

Motta e Brandelli (2008) e Oliveira; Siqueira Júnior; Silva, (2012), também citam que uma boa fonte de nitrogênio é um diferencial favorável ao crescimento de cepas produtoras de bacteriocinas, porém outros fatores também podem influenciar, tais como pH, temperatura e tempo de incubação.

5.3 Atividade antagônica e mensuração da unidade arbitrária

A atividade antagônica da enterocina frente as bactérias alvo foi realizada pela técnica de poço difusão, mensurando o halo de inibição ao redor do poço confirmando inibição do microrganismo (Figuras 4A e 4B). Observou-se que em todas as formulações propostas (M1, M2, M3 e M4) houve produção de enterocina, levando a inibição de *L. innocua* e *L. monocytogenes*, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações, sendo que os meios M1 e M2 foram os selecionados para os experimentos posteriores. Outro destaque a ser pontuado é que o halo de inibição em *L. monocytogenes* causado pela enterocina produzida em MRS foi semelhante ao obtido nas formulações M1 e M2, enfatizando o potencial dessas formulações para produção desse peptídeo.

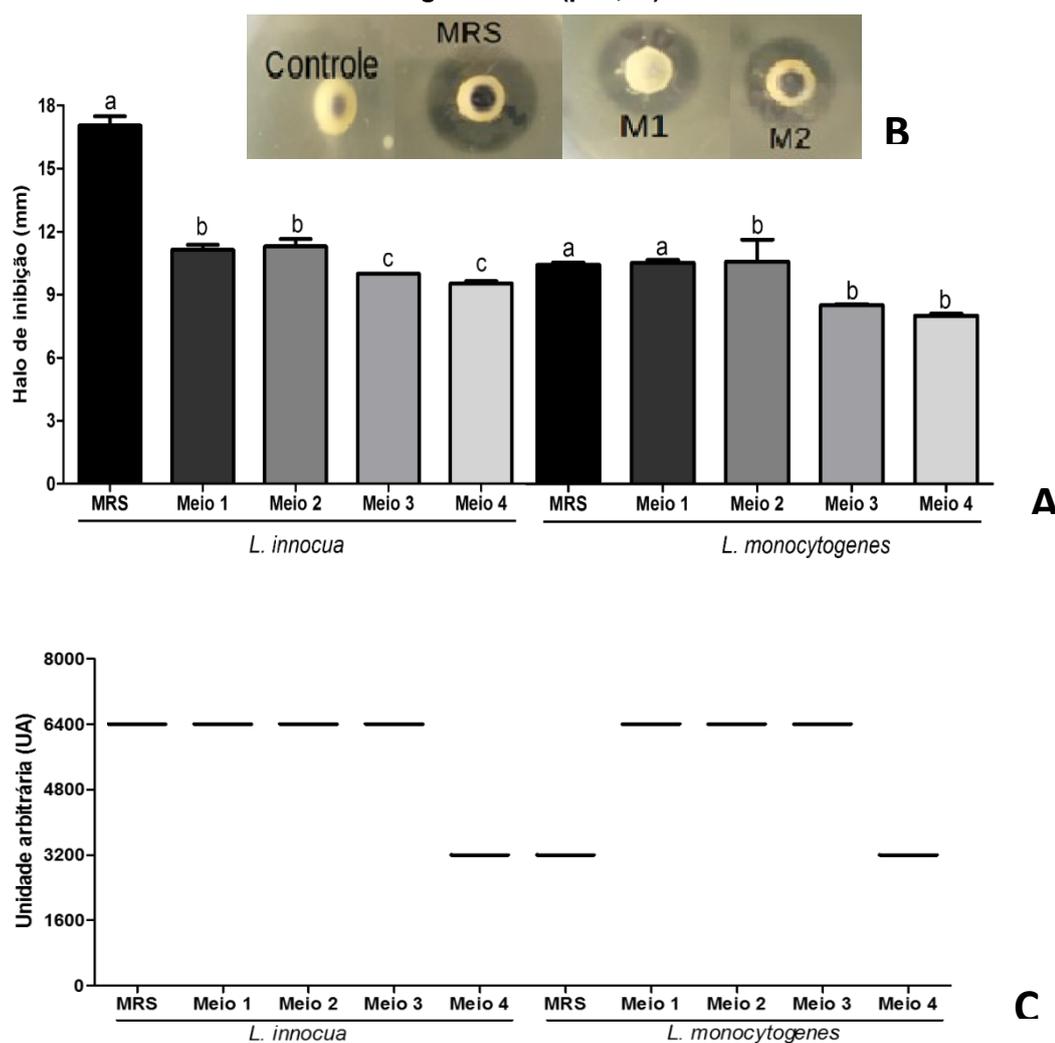
O valor da UA (Figura 4C) confirma o potencial antagônico relevante para as enterocinas formadas nos meios M1 e M2. O teste de diluição seriada nos dá como resultado as unidades arbitrárias (UA/mL). Esse valor é tido como a mais alta diluição capaz de produzir halo de inibição (SALVUCCI et al., 2019). Também chamado de método de diluição crítica, é muito utilizado para detecção qualitativa e quantitativa de variedades de bacteriocinas (MAYR-HARTING; HEDGES; BERKELEY, 1971).

Os valores médios de unidade arbitrária variaram de acordo com o meio em que a enterocina foi produzida e a bactéria indicadora. As formulações M1, M2 e M3 obtiveram valores de 6400UA/mL, para ambas as bactérias, revelando um resultado bastante promissor. Nossos resultados corroboram com os obtidos por Schueler (2018) onde obteve valores de até 6400UA/mL com enterocina produzida por *E. faecium*. Estes valores foram muito satisfatórios, uma vez que alguns autores relatam valores de UA/mL muito inferiores. Ghrairi (2008) obteve um máximo de 380UA/mL,

em 17 horas de incubação de *E. faecium* MMT21 contra cepas de *L. monocytogenes*. Du et al. (2017) obtiveram valores de 400UA/mL utilizando enterocinas de *E. durans* contra cepas de *L. monocytogenes*, em matriz alimentar. Já Motta e Brandelli (2008) obtiveram o máximo de 1600UA/mL para bacteriocina produzida por *Bacillus* sp em proteína de soja.

Os níveis de bacteriocina em CFS raramente excedem 5.000UA/mL (BROMBERG et al., 2006). Este resultado nos indica que o composto antimicrobiano tem um grande potencial de uso como conservador de alimentos.

Figura 4 - Atividade inibitória mensurada pela técnica de poço difusão da enterocina produzida nos meios M1, M2, M3 e M4 e controle MRS (A); halo de inibição da enterocina contra *Listeria innocua* (B); Unidade Arbitrária da enterocina produzida nas 4 formulações e MRS contra *L.innocua* e *L. monocytogenes* (C). Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$)



Fonte: Autoria própria (2020)

A hipótese de outros compostos estarem atuando no antagonismo foi descartada, uma vez que o pH do CFS foi ajustado em 6,5 para inibir a ação de ácidos orgânicos, e tratamento com catalase para inibir a ação do peróxido de hidrogênio, que poderiam atuar como agentes antimicrobianos. Destaca-se que os meios de cultura elaborados neste estudo apresentaram eficiência no desenvolvimento de *E. durans*, bem como foram produtores de enterocina, quando comparado ao controle MRS.

5.4 Estabilidade térmica e efeito do tratamento enzimático na enterocina

O composto antimicrobiano mostrou-se estável nos ciclos de tratamento térmico, 80°C/10min e 100°C/20min, apresentando atividade antagônica contra *L. innocua* e *L. monocytogenes* após o teste poço difusão, tratando-se de uma bacteriocina termostável.

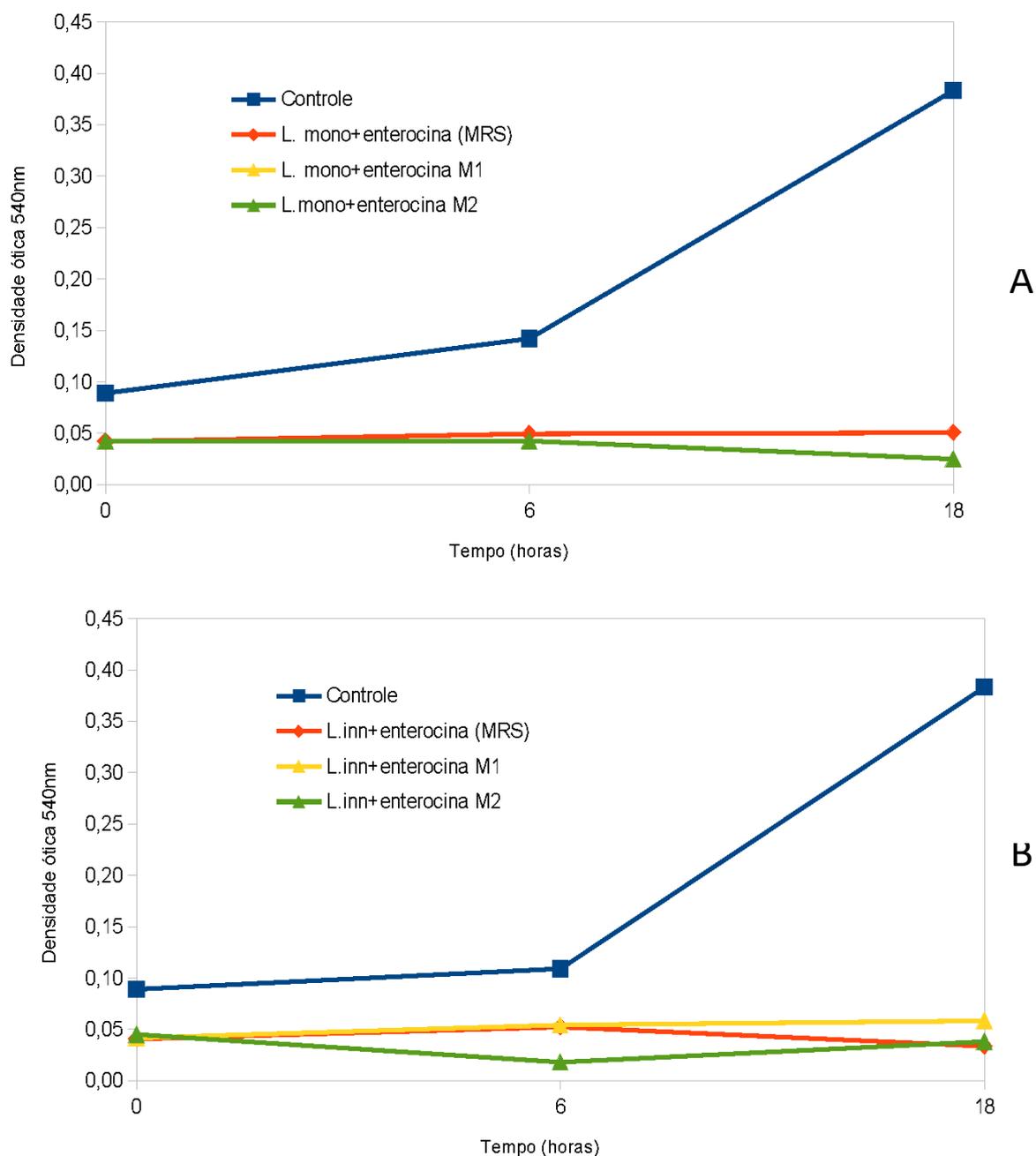
A capacidade antibacteriana foi totalmente inativada após tratamento enzimático, confirmando assim em se tratar de um composto proteico.

Resultados semelhantes foram obtidos por Furlaneto-Maia et al. (2017), Bromberg et al. (2006) e Du et al. (2017), que caracterizaram a estabilidade térmica de enterocinas classe IIa, devido sua estrutura β -pregueada em formado de S, estabilizada por pontes dissulfeto (NES; BREDE; DIEP, 2013).

5.5 Atividade antimicrobiana contra células-alvo

A ação antimicrobiana da enterocina, produzida nos meios M1 e M2, reduziram o número de células das bactérias indicadoras já nas primeiras 6h de incubação, mantendo até 18h (tempo estipulado do experimento).

Figura 5 - Atividade inibitória da enterocina produzidas nos meios M1 e M2 contra *L. monocytogenes* (A) e *Listeria innocua* (B), pela mensuração da DO (densidade ótica) em cultivo líquido a 540nm



Fonte: Autoria própria (2020)

Esses dados corroboram com os obtidos por Maia et al. (2019), que mostram a eficácia antimicrobiana de enterocina já nas primeiras 4h de incubação contra *L. innocua* e *L. monocytogenes*.

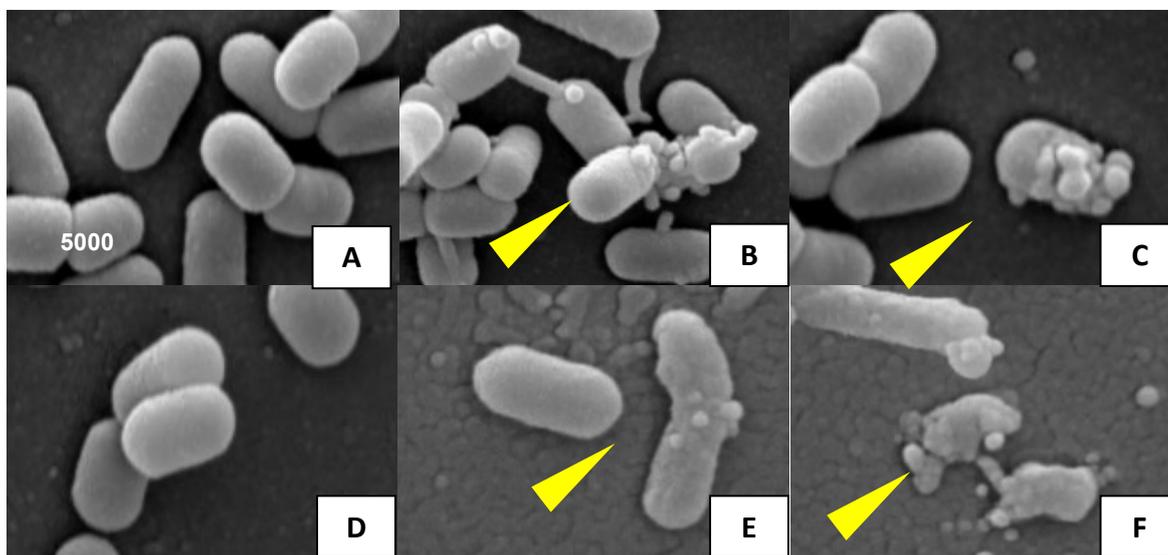
É conhecido que o potencial de aplicação desses peptídeos antimicrobianos em alimentos deve ser baseado em sua atividade e modo de ação sob condições que

reproduzem aquelas usadas em produtos alimentícios, conforme realizado por Pingitore et al. (2012). No entanto, Maia et al. (2019) mostraram que condições de matriz alimentar não afeta a ação antagônica de enterocinas.

5.6 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 6 apresenta as células das bactérias alvo antes e após tratamento com enterocina. A análise estrutural das células mostra ruptura da membrana celular, que exibem superfícies ásperas com mudanças e indício de extravasamento celular (Figuras 6 B, C, E e F), em comparação com as células não tratadas que mantiveram formas típicas de bastonetes com superfícies lisas (Figuras A e D).

Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando *Listeria* sp tratada e não com enterocina. **A:** *L.innocua* controle; **B:** *L.innocua* afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M1; **C:** *L.innocua* afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M2; **D:** *L. monocytogenes* controle; **E:** *L.monocytogenes* afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M1; **F:** *L. monocytogenes* afetadas pela enterocina obtido no meio de cultura M2. Cabeça de seta indica ruptura do envoltório celular. A barra indica 1 µm



Fonte: Autoria própria (2020)

Essa dissipação celular coincide com o que a literatura aponta como mecanismo de ação das enterocinas, que são formação de poros, com perda de íons e força motriz, culminando na morte da célula (NES; BREDE; DIEP, 2013). Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com Kim et al. (2019) e Maia et al. (2019), que também mostraram células danificadas após tratamento com bacteriocina.

6 CONCLUSÕES

Os meios de cultura propostos, a base de proteína de soja, foram capazes de promover o crescimento da cepa *E. durans* MF5, com produção de composto antimicrobiano, sendo que dos quatro, obteve-se melhores resultados com os meios de cultura M1 e M2.

A sequência das análises foi elaborada de forma que cada uma fosse complementar e corroborasse a anterior, assim, tem-se uma linha de análises que nos permitiu verificar e qualificar um composto antimicrobiano, com características proteicas.

A microscopia eletrônica permitiu visualizar o resultado da atividade antagônica contra células de *L. innocua* e *L. monocytogenes*.

Diante dos fatos apresentados e dos dados obtidos, conclui-se que o composto antimicrobiano se trata de uma bacteriocina, classe IIa.

O fato da bacteriocina obtida ser termoestável e apresentar atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *L. innocua* a torna uma forte candidata a ser um preservador natural em alimentos.

Com esses importantes resultados, inéditos, já que não há nenhum estudo sobre produção de enterocinas em meio a base de resíduo de soja, foi pedido o registro de patente do processo de produção de bacteriocina em meio de proteína de soja.

A utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultura pode representar um valor adicional para a indústria e vai ao encontro da crescente conscientização para a conservação de energia. No entanto, ainda são escassos os trabalhos que descrevem a produção de enterocina além de meios sintéticos.

REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H. et al. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, p. 599–605, 2003.
- AMMOR, S.; 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**, v. 17, p. 454–461, 2006.
- ANANOU, S. et al. Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. **Internacional Dairy Journal**, v. 18, p. 923–927, 2008.
- BROMBERG, R. et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ss. *hordniae* CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 135–144, 2006.
- BURGOS, M. J. G. et al. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22706–22727, 2014.
- BURKE, D. G. et al. **Microbial production of bacteriocins for use in foods**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2013.
- CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins : safe , natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1–20, 2001.
- CONAB, C. N. DE A. Acompanhamento da safra brasileira 2019/2020. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2019/2020**, v. 7, p. 1–68, 2020.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777–788, 2005.
- DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. **International Journal of Dairy Technology**, v. 43, n. 3, p. 73–76, 1990.
- DOMINGUEZ, A. P. M. et al. Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 238–243, 2007.
- DU, L. et al. Characterization of *Enterococcus durans* 152 bacteriocins and their inhibition of *Listeria monocytogenes* in ham. **Food Microbiology**, v. 68, p. 97–103, 2017.
- FOULQUIÉ MORENO, M. R. et al. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 214–229, 2003.
- FRANZ, C. M. A. P. et al. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 293–310, 2007.
- FURLANETO-MAIA, L. et al. Utilização de soro de leite e milhocina para produção de enterocinas por *Enterococcus* sp. **Anais do Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, v. I, n. 43, 2017.
- GARRIGA, M. et al. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, p. 142–148, 1993.
- GHRAIRI, T. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v. 19, p. 162–169, 2008.
- GILLOR, O.; VRIEZEN, J. A. C.; RILEY, M. A. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation.

Microbiology, v. 1, p. 1783–1792, 2008.

GRANDE, M. J. et al. Stability of enterocin AS-48 in fruit and vegetable juices. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 10, p. 2085–2094, 2005.

HAIKHANDI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 105–108, 2007.

HERRANZ, C. et al. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. **Applied Microbiology Biotechnology**, p. 378–383, 2001.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P. L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1–2, p. 1–10, 2010.

KIM, Y. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using biofilms of non-pathogenic soil bacteria (*Streptomyces* spp.) on stainless steel under desiccated condition. **Journal Of Food Microbiology**, v. 79, n. April 2018, p. 61–65, 2019.

LÓPEZ, R. L. et al. Semi-preparative scale purification of enterococcal bacteriocin enterocin EJ97 , and evaluation of substrates for its production. **J. Ind. Microbiol. Biotechnology**, p. 779–785, 2007.

MAIA, L. F. et al. Influence of optimised commercial medium on bacteriocin production by *Enterococcus faecium*. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 41, n. 1, 2019.

MASIAS, E. et al. Impairment of the class IIa bacteriocin receptor function and membrane structural changes are associated to enterocin CRL35 high resistance in *Listeria monocytogenes*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 7, p. 1770–1776, 2017.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. In: [s.l.: s.n.]. p. 316–417.

MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.

MOLL, G. et al. Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 600–605, 1996.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 641–646, 2008.

MUÑOZ, A. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ : Bactericidal synergism with heat. **Internacional Dairy Journal**, v. 17, p. 760–769, 2007.

NES, I. F.; BREDE, D. A.; DIEP, D. B. **Class II Non-Lantibiotic Bacteriocins**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão : Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 267–276, 2016.

OLIVEIRA, C. P. DE J.; SIQUEIRA JÚNIOR, P. DE; SILVA, J. A. DA. Bacteriocinas Como Alternativa Na Conservação De Alimentos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 09–15, 2012.

ÖZDEMİR, G. B. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. **Indian J. Microbiology**, v. 51, n. June, p. 182–187, 2011.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. Suppl 1, p. 1–13, 2014.

PÍPOLO, A. E.; MANDARINO, J. M. G. Os teores de proteína do soja e a qualidade para a indústria. **Boletim Informativo da SBCS**, p. 30–33, 2016.

REHAIEM, A. et al. Technological performance of the enterocin A producer *Enterococcus faecium* MMRA as a protective adjunct culture to enhance hygienic and sensory attributes of traditional fermented milk “Rayeb”. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2140–2150, 2012.

RIVAS, F. P. et al. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes’ milk and cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 428–436, 2012.

ROCHA, K. R. et al. Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria innocua*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 1–11, 2019.

SALVUCCI, E. et al. Triticale flour films added with bacteriocin-like substance (BLIS) for active food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, n. November 2017, p. 193–199, 2019.

SCHUELER, J. **PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM SORO DE LEITE PARCIALMENTE DESMINERALIZADO E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2018.

TOSONI, N. F. **POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ENTEROCINAS EM CÉLULAS PLANCTONICAS E EM BIOFILME DE *Salmonella Typhimurium* E SOROTIPOS DE *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão,, 2019.

PINGITORE, E. V. et al. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38–47, 2012.

ZOU, M.; LIU, D. A systematic characterization of the distribution ,biofilm-forming potential and the resistance of the biofilms to the CIP processes of the bacteria in a milk powder processing factory. **Food Research International**, v. 113, n. January, p. 316–326, 2018.