

PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DO TRATO INTESTINAL DE PEIXES, AVES E SUÍNOS

Sofia Bacchin Gomes

Taciana Freire de Oliveira

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

sofiagomes@usp.br

Objetivos

- Seleção de bactéria ácido-lática (BAL) para produção de bacteriocina em meio de cultivo com subprodutos agroindústrias (M1), visando sua aplicação como bioconservante de alimentos;
- Purificação parcial do BLIS (*Bacteriocin-like Inhibitory Substance*) produzido;
- Estudos de estabilidade físico-química e atividade antimicrobiana do produto semi-purificado.

Métodos e Procedimentos

As cepas de BAL foram selecionadas avaliando a atividade antimicrobiana do BLIS produzido em meio M1 de composição (g/L): 20 melaço de cana-de-açúcar; 4 peptona; 2 extrato de levedura; 6 água de maceração do milho; 2 K₂HPO₄; 2 citrato de amônio; 5 acetato de sódio; 0,2 MgSO₄*7H₂O; 0,05 MnSO₄*2H₂O; 1 Tween 80.

O BLIS foi preparado e a determinação de sua atividade antimicrobiana foi feita de acordo com Oliveira *et al.* (2024). Estudos para produção do BLIS em diferentes concentrações dos subprodutos agroindustriais, oxigênio, variação de pH e agitação, foram feitos através da avaliação da cinética do crescimento da cepa selecionada no meio formulado em relação ao MRS (*De Man, Rogosa & Sharpe*).

A pré-purificação do BLIS foi realizada inicialmente pela adição de 20% de sulfato de amônio, considerando o valor de saturação de 70,5g por 100mL, sendo em seguida incubado a 4 °C sob agitação. Após ressuspender o precipitado em tampão PBS (pH 6,5), foi realizada a etapa de ultrafiltração com filtração tangencial, utilizando membranas de 2kDa, 10kDa, 30kDa e posterior liofilização das amostras. Tais amostras foram ressuspendidas em PBS e submetidas à ação das enzimas Tripsina, Pepsina e Proteinase K, às diferentes faixas de temperatura (60°C, 80° e 100°) e pH (2, 4, 8 e 10) para testes de estabilidade. A atividade antimicrobiana foi avaliada em leitor de microplaca a 600nm para determinar a

concentração mínima inibitória (MIC) do crescimento da *Listeria monocytogenes*.

Resultados

A cepa selecionada foi a *Ligilactobacillus salivarius* 71, que apresentou potencial antimicrobiano constante diante de diferentes temperaturas e faixas de pH. Em relação aos subprodutos agroindustriais adicionados ao meio, foram alcançadas concentrações de água de maceração do milho igual a 5g/L e 50g/L para o melaço de cana-de-açúcar que favoreceram aumentar a produção do composto antimicrobiano. Desta forma, a produção do BLIS em meio M1 foi em média 2,4 vezes maior em relação ao meio de cultivo MRS (Figura 1).

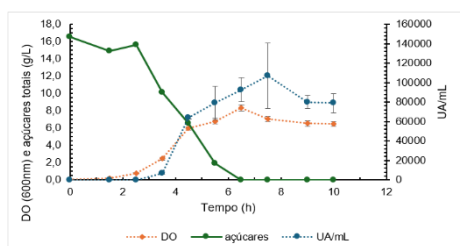


Figura 1: Cinética de crescimento de *L. salivarius* 71 em meio M1.

Posteriormente, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio a 20% e fração maior que 30 kDa apresentou maior atividade antimicrobiana, sendo esta selecionada para os testes de estabilidade. Nos testes de estabilidade, as amostras liofilizadas não apresentaram bioatividade frente à ação de Tripsina, Pepsina e Proteinase K, confirmando a natureza proteica da biomolécula. Por outro lado, o BLIS semi-purificado manteve atividade inibitória diante das diferentes faixas de pH (2,4,8 e 10) e temperatura (60°C, 80°C e 100°C) apontando para um biocomposto estável ao calor (até 100°C) e tolerante às variações de pH.

A atividade antimicrobiana das amostras de 30kDa foi avaliada pela leitura de microplaca a 600nm e apontou para uma concentração mínima inibitória (MIC) contra *L.monocytogenes*. (utilizada como bioindicador) de 0,625mg/mL (Figura 2).

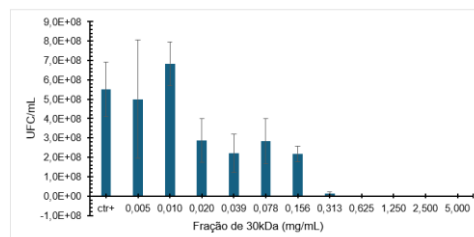


Figura 2: Atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*.

Conclusões

A cepa *Ligilactobacillus salivarius* 71 apresentou-se promissora para a produção de BLIS utilizando meio de cultivo contendo subprodutos agroindustriais. Ademais, o BLIS mostrou-se estável nas faixas de pH e temperatura estudadas, mantendo atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* mesmo após os processos de purificação parcial.

Os autores declaram não haver conflito de interesses. SBG realizou a coleta e análise dos dados e participou da redação do manuscrito; TFO concebeu e planejou o estudo, supervisionou o projeto e participou da redação e revisão final do manuscrito; RPSO supervisionou o projeto, participou da revisão final do manuscrito e financiamento do projeto. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Agradecimentos

Agradeço ao financiamento do CNPq pela bolsa concedida e à doutoranda Taciana Freire de Oliveira pela paciência e acompanhamento durante toda a execução do projeto. Agradeço aos meus colegas de laboratório que tornavam o ambiente leve, divertido e acolhedor e ao Prof. Dr. Ricardo P. S. Oliveira pela oportunidade.

Referências

- OLIVEIRA, T. F. D. *et al.* Anti-Listerial Activity of Bacteriocin-like Inhibitory Substance Produced by *Enterococcus lactis* LBM BT2 Using Alternative Medium with Sugarcane Molasses. **Antibiotics**, Basileia, 2024.