

IMOBILIZAÇÃO DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* PP 170 EM GRÃOS DE ARROZ

Bruna Kelm Teixeira¹

Andressa da Conceição Alves²

Carla Pohl Sehn³

Resumo:

As bactérias ácido lácticas (BAL) habitam uma grande variedade de nichos ecológicos, e muitos deles estão em estreita interação com os seres humanos. As BAL são constituídas de 13 gêneros de bactérias Gram-positivas e dentre elas está, o gênero *Pediococcus*. As BAL são utilizadas há séculos na preservação de alimento e muitas espécies são reconhecidas como probióticos. Um grande obstáculo na indústria de alimentos é a manutenção da viabilidade de bactérias probióticas que deve se manter superior a 10⁶ e 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) até o consumo do alimento. A utilização de arroz (*Oryza sativa*) torna-se uma opção para a imobilização celular de microrganismos e ainda, uma alternativa de consumo e valorização do produto, devido ao alto consumo e importância no mundo, constituindo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização de arroz como agente para imobilização de *Pediococcus pentosaceus* PP 170. Para a imobilização foram utilizados grãos de arroz integral longo fino tipo 1 (produto comercial da empresa "Picinin" subgrupo "Integral") e parboilizado longo fino tipo 1 (produto comercial da empresa "Camil", subgrupo "Parboilizado"), o isolado PP 170, caldo Man Rugosa Shaper (MRS) e submetidos a fermentação por 48 h a 36 °C, sem agitação, denominados como biocatalizador AI e AP. Os biocatalizadores AP e AI foram armazenados sob refrigeração a 8 °C e a viabilidade celular determinada através das contagens de células viáveis nos períodos de 0, 10, 20 e 30 dias. Para a imobilização foram inoculados 8,69 log UFC.mL⁻¹ em AP e 8,19 log UFC.mL⁻¹ em AI de *P. pentosaceus* PP 170, após 30 dias o biocatalizador AP apresentou viabilidade celular de 6,27 log UFC.mL⁻¹, e AI 6,31 log UFC.mL⁻¹. Com isso, o isolado *P. pentosaceus* PP 170 manteve sua viabilidade sob armazenamento em refrigeração por até 30 dias utilizando grãos de arroz como suporte para imobilização, demonstrando característica vantajosa para aplicação em alimentos.

Palavras-chave: biocatalizador, alimentos funcionais, bactérias ácido láticas

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

IMOBILIZAÇÃO DE PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS PP 170 EM GRÃOS DE ARROZ

¹ Aluno de graduação. brunakelm.t@gmail.com. Autor principal

² Aluna de graduação. alvesandressa519@gmail.com. Co-autor

³ Docente. carla.pohlsehn@gmail.com. Orientador

IMOBILIZAÇÃO DE *Pediococcus pentosaceus* PP 170 EM GRÃOS DE ARROZ

1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) habitam uma grande variedade de nichos ecológicos, e muitos deles estão em estreita interação com os seres humanos. Sua proliferação se dá em diversos *habitats* relacionados com alimentos e plantas, além disso, são habitantes naturais de superfícies mucosas de mamíferos, como as do trato gastrointestinal (TGI), cavidade oral e a vaginal (OUWEHAND et al., 2003).

As BAL são constituídas de 13 gêneros de bactérias Gram-positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactoshaepa*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (MEIRA, 2011). Dentre estas, o gênero *Pediococcus* possui característica homofermentativa, Gram-positiva, oxidase-negativa e catalase-negativa (IVANOVA et al., 2013; SHUKLA, GOYAL, 2013; KITAHARA, 1974).

A espécie *P. pentosaceus* apresenta desenvolvimento entre pH 4,5 e pH 8,0. Há crescimento na presença de até 15% de cloreto de sódio (NaCl) e nas temperaturas de 7°C a 48°C. Algumas cepas produzem substâncias proteicas capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos, chamadas pediocinas (FRANCO, LANDGRAF, 2008). As BAL são utilizadas há séculos na preservação de alimentos e muitas espécies são reconhecidas como probióticas (SULLIVAN, ROSS, HILL, 2002). Ainda, podem ser aplicadas no processo de fermentações de carnes e vegetais, e algumas cepas são utilizadas como culturas para melhoramento dos atributos do queijo cheddar e mussarela (BHOWMIK, 1990).

Um grande obstáculo na indústria de alimentos é a manutenção da viabilidade de bactérias probióticas que deve se manter superior a 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) até o consumo do alimento (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). Em virtude deste problema, a imobilização celular possibilita processos fermentativos contínuos, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do material biológico. Vários métodos são utilizados para imobilização como: aprisionamento em matriz porosa, auto-agregação, contenção por barreira e ligação à superfície. Além de várias serem as formas de suporte para este método, sendo os materiais mais estudados alginatos e carragena, bem como, grãos ou pedaços de frutas (VITOLA, 2017).

A utilização de arroz (*Oryza sativa*) torna-se uma opção para a imobilização celular de microrganismos e ainda, uma alternativa de consumo e valorização do produto, devido ao alto consumo e importância no mundo, constituindo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas (Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, 2010). Sendo rico nutricionalmente por ser fonte de vitaminas, minerais, fibras, compostos bioativos e ácidos graxos insaturados (DE SOUZA et al, 2017).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização de arroz como agente para imobilização de *Pediococcus pentosaceus* PP 170.

2 METODOLOGIA

2.1 Linhagem bacteriana

Para realização deste estudo foi utilizado um isolado de BAL proveniente de queijo mussarela fatiado comercializado em mercados e minimercados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS) e denominado *P. pentosaceus* PP 170 (SEHN, 2015). O mesmo pertence à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (DCTA-FAEM-UFPel).

2.2 Imobilização e viabilidade celular

Para a imobilização das células do isolado PP 170, o mesmo foi cultivado em caldo Man Rugosa Shaper (MRS, Lab M Limited®), a 37 °C durante 72 h sem agitação. Em seguida, o caldo foi centrifugado a 4160 g, por 10 min a 20 °C, para obtenção do pellet celular. As células foram lavadas duas vezes com tampão fostato-salino (PBS, Proquimios®) pH 7,4, para retirada de interferentes do meio.

Foram utilizados grãos de arroz integral longo fino tipo 1 (produto comercial da empresa “Picinin” subgrupo “Integral”) e parboilizado longo fino tipo 1 (produto comercial da empresa “Camil”, subgrupo “Parboilizado”) como suporte para a imobilização. Ambos os grãos foram submetidos a esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, 200 g de grãos de arroz (integral ou parboilizado), 1 g de células (peso molhado) e 500 mL de caldo MRS foram misturados, e submetidos a fermentação por 48 h a 36 °C, sem agitação, denominado como biocatalizador AI e AP.

Após, procedeu-se a contagem de células viáveis em placas contendo ágar MRS, incubadas à 37 °C, por 48 h em condições de aerobiose, e na sequência separou-se o caldo do biocatalizador (células bacterianas e grãos de arroz). Os grãos foram lavados duas vezes com PBS para remoção total das células não aderidas. Misturaram-se 10 g de cada amostra (biocatalizador AI ou AP) com 90 mL de PBS em *stomacher* por 90 segundos, diluídos em série decimais e a quantificação realizada em triplicata, utilizando-se os meios e condições conforme descrito anteriormente.

Os biocatalizadores AP e AI foram armazenados sob refrigeração a 8 °C e a viabilidade celular determinada através das contagens de células viáveis nos períodos de 0, 10, 20 e 30 dias (BOSNEA et al, 2009).

2.3 Análise dos dados

Os resultados obtidos foram digitados no programa Excel (Microsoft®), realizado a média, desvio padrão e assim as contagens microbiológicas foram transformadas em log.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Para a imobilização foram inoculados 8,69 log UFC mL⁻¹ em AP e 8,19 log UFC.mL⁻¹ em AI de *P. pentosaceus* PP 170, concentração correspondente a 1 g de células (peso úmido). Após 48 h de fermentação, a concentração de células encontradas no conjunto caldo e grãos do biocatalizador AP foi de 9,06 log UFC.mL⁻¹, e no AI foi de 9,11 log UFC.mL⁻¹, demonstrando uma aumento da concentração celular. A lavagem dos grãos de arroz com tampão PBS levou a eliminação das células não aderidas, ou fracamente aderidas, permanecendo somente as células imobilizadas, na concentração de 6,65 log UFC.g⁻¹ no biocatalizador AP e de 6,49 log UFC.g⁻¹ no AI.

No estudo de Vitola (2017), foram utilizados grãos de soja para imobilização do isolado *L. casei* SCL3, e avaliado sob as mesmas condições de tempo e temperatura (ao longo de 30 dias a 8 °C), sendo adicionado uma concentração celular superior (11 log UFC.mL⁻¹) à do presente estudo (cerca de 8 log UFC.mL⁻¹). No entanto, ambos apresentaram resultado semelhante quanto à viabilidade celular após a fermentação (cerca de 6 log UFC.mL⁻¹). Já Bosnea et al. (2009) utilizaram grãos de trigo para imobilização de *L. casei* ATCC 393, o qual foi armazenado a temperatura de 4 °C durante 40 dias utilizando lactose sintética fresca, obtendo-se uma concentração final de 11 log UFC.g⁻¹ no biocatalizador.

A utilização de grãos de arroz, soja, ou mesmo de trigo como suporte, representam uma alternativa para imobilização de BAL devido às características físico-químicas, pois a presença de proteínas, carboidratos, lipídios e fibras auxiliam no desenvolvimento e preservação dos micro-organismos (BOSNEA et al., 2009; 2015).

A viabilidade celular nos biocatalizadores AP e AI mantiveram-se estável ao longo dos 30 dias avaliados, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Estes valores podem sofrer diferenças devido ao valor nutricional, pois, os açúcares livres localizam-se na camada externa do grão, sendo sua concentração afetada pela variedade, grau de polimento e processamento (MATSUO et al., 1995). O arroz integral costuma ter valores maiores de proteínas, lipídios, cinza, fibra total, fibra insolúvel e fibra solúvel comparado ao arroz parboilizado (WALTER, MARCHEZAN, DE AVILA, 2008), com isso a imobilização celular pode ser afetada pela aderência ao grão.

Ainda, os resultados obtidos não atendem ao número mínimo de 10^8 e 10^9 UFC para consumo imediato de produto probiótico, porém, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017), valores menores podem ser aceitos, logo comprovados sua eficácia e sobrevivência à acidez gástrica e aos sais biliares além de possuir seu efeito isolado ou em alimento.

Tabela 1. Número de células viáveis do isolado *Pediococcus pentosaceus* PP 170 durante processo de imobilização em grãos de arroz parboilizado e arroz integral (biocatalizadores) ao longo de 30 dias de refrigeração a 8 °C.

Biocatalizador	Dia 0	Dia 10	Dia 20	Dia 30
	UFC.mL ⁻¹			
Arroz parboilizado	6,65 ± 0,50	6,32 ± 1,00	6,48 ± 0,50	6,27 ± 0,00
Arroz integral	6,49 ± 1,00	6,76 ± 0,00	6,69 ± 0,00	6,31 ± 0,00

Autor: Teixeira, 2018.

Com isso, podemos observar que diferentes subgrupos de arroz são eficientes para utilização como agentes para imobilização do isolado PP 170.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolado *P. pentosaceus* PP 170, proveniente de queijo mussarela fatiado comercializado em mercados e minimercados na cidade de Pelotas manteve sua viabilidade sob armazenamento em refrigeração por até 30 dias utilizando grãos de arroz como suporte para imobilização, demonstrando característica vantajosa para aplicação em alimentos.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência-Geral de Alimentos. **Probióticos: Construção da Lista de Linhagens Probióticas**, abril de 2017.

BOSNEA, L.; KOURKOUTAS, Y.; ALBANTAKI, N.; TZIA, C.; KOUTINAS, A. A.; KANELAKI, M. Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat grains. **LWT. Food Science and Technology**, v. 42, p. 1696-1702, 2009.

BOSNEA, L.A.; KOUORKOUTAS, Y.; ALBANTAKI, N.; TZIA, C. KOUTINAS, A.A.; KANELAKI, M.; Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages Running title: Volatiles in heat treated sausages with immobilized *L. casei*. **LWT. Food Science and Technology**, v.42, p.1696–1702, 2015.

DE SOUZA, C.K.; LICODIEDOFF, S.; SCHMITZ, F.R.W.; TEDESCHI, P. MAIETTI, A.; BERTOLI, S.L.; BRANDOLINI, V. Estudo dos ácidos graxos e das propriedades antioxidantes de *Oryza sativa* L: arroz bruto, integral, parboilizado e branco comercializados no Brasil e na Itália. **Engevista**, v. 19, n. 5, p. 1168-1187, 2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008 Ed.2, p. 184.

IVANOVA, I.; ILIEV, I.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. Food or Medicine? Future of Lactic Acid Bacteria. Sofia University. Layout & prepressed: Georg Iliev. **Printed by Diagal print Printing House**, p. 26 -30, 2013.

KITAHARA, K. *Pediococcus Balcke* 1884. **Bergey's manual of determinate bacteriology**, 1974.

MATSUO, T. et al. **Science of the rice plant v.II**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Reserch Center, p.1245, 1995.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ROBERTS, P.J.; OVASKA, J.;SALMINEN, E. Disease-dependent adhesion of *lactic acid bacteria* to the human intestinal mucosa. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 643-646, 2003.

SEHN, C.P., **Avaliação da atividade bacteriocinogênica e características probióticas do isolado *Lactobacillus curvatus* LC254 e da utilização da sua substância antimicrobiana em filmes biodegradáveis**. 2015. Tese (doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, 2015.

SHUKLA, R.; GOYAL, A. Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: A New Isolate from Fermented Cucumber. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, p. 11–21, 2013.

Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado (Bento Gonçalves)**. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado, 1 a 13 de agosto de 2010, Bento Gonçalves, RS. Porto Alegre: SOSBAI, 2010.

SULLIVAN, L.; ROSS, R.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

VITOLA, H.R.S. **Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, 2017.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E., DE AVILA, L.A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1184-1192, 2008.