



Área: Ciência de Alimentos

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS FRENTE A FUNGOS CONTAMINANTES DE QUEIJOS

Kátia Bitencourt Sartor, Lariane Strack, Raíssa Vieira Da Silva*, Luciane Maria Colla

Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

*E-mail: 166370@upf.br

RESUMO – Atualmente, os consumidores buscam por alimentos cada vez mais naturais que proporcionem uma alimentação saudável. Os probióticos são bactérias que promovem benefícios ao organismo de quem os consome e, possuem a capacidade de produzir compostos antimicrobianos naturais que podem substituir os conservantes sintéticos. O queijo é um alimento rico em nutrientes e está exposto ao desenvolvimento de microrganismos como fungos, que, durante a maturação do queijo, podem gerar aspectos sensoriais desagradáveis ao produto, ocasionando perda para a indústria e tornando-se um risco de contaminação ao consumidor. As bactérias lácticas (BALs) probióticas podem produzir substâncias com potencial antimicrobiano, capazes de agir contra patógenos. A produção desses compostos é de alto custo para as indústrias, por isso, propõe-se realizar a produção de compostos antimicrobianos em meios de cultivo de baixo custo, a fim de reduzir o descarte desse subproduto e possibilitar uma produção em larga escala. Foram realizadas coletas em queijos para realizar o isolamento e identificação dos principais fungos existentes. As BALs foram selecionadas por sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos que inibam os fungos contaminantes de queijos. Foi estudado o processo de fermentação submersa para produção de compostos antimicrobianos, analisando a influência de fatores como a concentração de acarose, NaCl e pH na produção de compostos antimicrobianos. A cinética do processo também foi estudada. Observou-se que o pH e a concentração de NaCl foram fatores importantes para os resultados do potencial antifúngico dos extratos de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* e *Lactobacillus lactis* frente ao fungo *Penicillium spp.*

Palavras-chave: Bactérias. Fungos. Fermentação

1 INTRODUÇÃO

Os métodos de conservação de alimentos podem ser classificados em três categorias principais, métodos físicos, químicos e biológicos (MISRA et al., 2017; MUKHOPADHYAY; UKUKU, 2018). Entre as tecnologias existentes, a biopreservação recebe atenção devido ao seu impacto mínimo nas propriedades nutricionais e sensoriais dos produtos alimentícios, tornando possível o uso controlado de microrganismos e seus metabólitos para prolongar o prazo de validade dos alimentos (SABO et al., 2017).

Atualmente, a maioria dos conservantes utilizados em alimentos é de origem sintética, devido ao seu histórico de uso, alguns microrganismos já se adaptaram ao meio e conseguem se desenvolver mesmo com a adição desses conservantes (FERNANDEZ et al., 2017). Portanto, a busca da população por alimentos com maiores benefícios à saúde faz com que a indústria tenha a necessidade de se atualizar.

A fermentação pode ser vista como um método biológico de preservação de alimentos. Os alimentos produzidos desta maneira têm um risco reduzido de contaminação quando enriquecidos com antimicrobianos, como as bacteriocinas (MARCO et al., 2017). Os probióticos são microrganismos estudados pela sua capacidade de produzir agentes antimicrobianos naturais, e por proporcionar benefícios à microbiota e a saúde de quem os consome (PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017).

Derivados lácteos, como queijos, são muito consumidos, utilizados na alimentação diária. Um problema atual encontrado nas indústrias produtoras de queijos é a presença de microrganismos indesejáveis que se desenvolvem nesses alimentos durante a maturação, os quais são responsáveis por atribuir aspecto, sabor e aparência desagradável ao produto (FERNANDEZ et al., 2017; JURADO; NAVARRO, 2018; ZHENG et al., 2018; COSTA et al., 2018).

O desenvolvimento de microrganismos deteriorantes em queijos ocorre naturalmente, e se torna uma fonte de prejuízos à indústria e de risco à saúde dos consumidores (COSTA et al., 2018). Desta forma, torna-se necessária a utilização de novos compostos naturais como conservantes.

O objetivo do trabalho foi estudar o processo de fermentação para produção de compostos antimicrobianos a partir de bactérias ácido lácticas em meios de cultivo de baixo custo que inibissem os fungos contaminantes de queijos.

2 MATERIAL E MÉTODOS



2.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES DE QUEIJOS

Foram selecionadas duas agroindústrias onde foram coletadas 10 amostras de diferentes queijos que apresentavam crescimento visível de microrganismos e colocados cada um em uma placa de petri estéril. Posteriormente cada amostra foi cortada em quatro pedaços menores e estes foram distribuídos nos quatro lados de uma placa de petri com meio Potato Dextrose Agar (PDA), estas placas foram incubadas por oito dias a 35°C.

Para os fungos que cresceram no ágar e apresentaram características diferentes em termos de cor, textura e zonação, foi realizado o repique para o isolamento. Uma alíquota da colônia previamente crescida foi transferida com uma alça de platina para uma nova placa contendo o meio de cultura PDA, até a obtenção de colônias visualmente isoladas e homogêneas (SILVA et al., 2017).

A identificação e caracterização dos fungos isolados foram realizadas através de suas características morfológicas, macro e microscópicas conforme Garnier et al. (2017). A observação macroscópica das características das colônias fúngicas foi realizada pela pigmentação, textura e topografia, segundo Fischer et al. (2001).

A identificação microscópica foi feita pelo tipo de ramificação, comprimento e largura dos conidióforos, utilizando a técnica de Microcultivo. Nesta técnica, foi recortado um pequeno quadrado de aproximadamente 2cm² de meio de cultura Ágar PDA e o mesmo foi colocado sobre uma lâmina histológica. Realizou-se a inoculação dos fungos nos quatro lados do pedaço do ágar, depois este foi coberto com uma lamínula. Todo o conjunto foi colocado no interior de uma placa de Petri com um papel filtro embebido com solução fisiológica. Foram incubados em estufa a 35°C. Após o crescimento fúngico, a lamínula foi retirada e colocada em nova lâmina com uma gota de corante azul de metileno para visualização em um aumento de 40 vezes no microscópio óptico.

2.2 SELEÇÃO E ATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Foram utilizadas bactérias ácido lácticas escolhidas entre as disponíveis na UPF, sendo o critério de seleção as mais citadas nos artigos como produtoras de bacteriocinas, sendo elas *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* (LEMMA) e *Lactobacillus lactis* (T.H.T. S.A). Para a ativação das bactérias, as culturas que se encontravam congeladas em Eppendorf (700 microlitros de BAL + 300 microlitros de glicerol) foram adicionadas ao caldo MRS (Man Rogosa e Sharpe) e incubadas durante 24 h a 37°C. Após ativação, as BAL'S foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para placas de petri contendo ágar MRS, posteriormente foram incubadas por 72 horas a 37°C. Realizou-se coloração de Gram para comprovar que eram colônias de BAL sem contaminação. As bactérias lácticas com maior facilidade de cultivo e repicagem foram selecionadas para a etapa posterior.

2.3 PRÉ INÓCULO

O pré-inóculo foi preparado em um frasco de erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo MRS, do processo anterior foi retirado uma alçada da colônia da placa de petri e adicionada ao caldo, sendo fermentado por 24 horas a 37°C em agitador rotativo a 100 rpm.

2.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA PRODUÇÃO DE EXTRATOS ANTIFÚNGICO

As cepas selecionadas de bactérias foram utilizadas para a realização da fermentação submersa utilizando soro de leite como componente principal do meio de cultivo, segundo o Delineamento Fatorial Completo 2³ com pontos centrais apresentado na Tabela 1. Os ensaios realizados com o *Lactobacillus lactis* foram identificados como L e com o *Bifidobacterium sp* como B, seguidos dos números dos experimentos. Posteriormente, a partir das melhores condições experimentais obtidas a partir do primeiro planejamento experimental em relação à capacidade antifúngica, foram realizados novos ensaios (em duplicatas), conforme Tabela 2. Nesta etapa, os ensaios foram numerados na sequência dos ensaios da Tabela 1 e foram variados os tempos de fermentação sendo retiradas amostras nos tempos 0h (usado como controle), 24h, 48h e 72h.

Tabela 1 - Delineamento Fatorial Completo 2³ com três pontos centrais para o estudo da influência das variáveis sobre a produção de compostos antimicrobianos por bactérias lácticas

Ensaio	X ₁ (pH inicial)	X ₂ (NaCl %)	X ₃ (Sacarose %)
1	-1 (5)	-1 (1)	-1 (0,5)
2	+1 (7)	-1 (1)	-1 (0,5)
3	-1 (5)	+1 (4)	-1 (0,5)
4	+1 (7)	+1 (4)	-1 (0,5)



5	-1 (5)	-1 (1)	+1 (2,5)
6	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)
7	-1 (5)	+1 (4)	+1 (2,5)
8	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)
9	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)
10	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)
11	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Planejamento dos experimentos da segunda etapa de fermentação

Microrganismo	Experimento	pH	NaCl (%)	Sacarose (%)
<i>Lactobacillus lactis</i>	L12	6	2,5	1,5
<i>Bifidobacterium</i>	B12	7	4	2,5

Fonte: elaborado pelo autor.

Em frascos de erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 60 mL de soro de leite e ajustadas as concentrações de NaCl, sacarose e pH segundo o delineamento fatorial. Após foi realizado uma pasteurização em banho metabólico sob agitação de 100 rpm durante 15 minutos a 90°C. Neste tempo foi retirada amostra correspondente aos controles (10 mL de cada extrato). As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e congeladas para posterior uso no teste de atividade antifúngica.

Para inoculação dos meios de fermentação, foram adicionados 5 mL do pré inóculo junto aos meios de cultivo preparados (50 mL restante de soro de leite presente em cada ensaio), para assim iniciar a fermentação. Os frascos foram incubados em agitador rotativo marca Tecnal, modelo TE-421a 100 rpm, 37°C por 72 h. Ao fim da fermentação, os meios foram centrifugados em centrífuga marca Hitachi, CR 22N para separação da biomassa microbiana a 10.000 rpm por 10 min (BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018; WONG et al. 2017). Após a centrifugação, os extratos foram congelados até a realização das análises de atividade antifúngica.

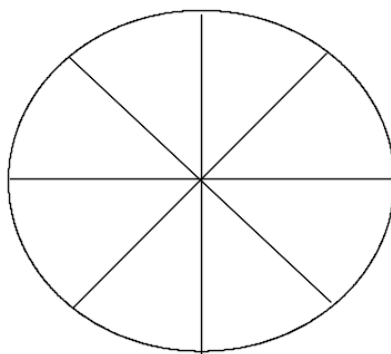
2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DAS FERMENTAÇÕES

O preparo do inóculo fúngico para os testes de atividade antifúngica foi realizado com a adição de 5 mL de uma solução Tween 0,1% em um tubo de ensaio contendo fungo isolado, foram transferidos 1 mL dessa suspensão de esporos contida no tubo em placas de Petri contendo PDA, e incubados a 30°C por 48 h. Após o período de crescimento do fungo, foram confeccionados os discos para uso nos ensaios de atividade antifúngica com um perfurador de aço inoxidável.

Os extratos foram testados quanto à atividade antifúngica contra os fungos isolados na primeira etapa através da técnica descrita por Gerbaldo et al. (2012), com algumas adaptações. Foram adicionados 2 mL do extrato das BAL's às placas de petri contendo 20 mL de ágar PDA solidificado. A seguir, no centro das placas de Petri foram adicionados discos contendo ágar coberto com micélio fúngico previamente preparado. As placas foram incubadas a 25°C durante 72 horas. Após o período de incubação, foram desenhados nas placas de Petri 8 raios, conforme Figura 1. Foi realizada a leitura dos oito raios, com auxílio de uma régua, medindo-se o raio do crescimento micelial (RCM) das colônias do centro em direção a lateral da placa, até onde havia crescimento fúngico. Paralelamente, foram realizados controles negativos, adicionando-se solução de Tween 0,1% no lugar do extrato das BAL's. Os testes com os extratos e os controles foram realizados em quintuplicata.



Figura 1 - Demonstrativo dos raios desenhados nas placas para medir o diâmetro do crescimento micelial



Fonte: elaborado pelo autor.

O potencial de inibição do crescimento fúngico foi calculado através da Equação 1, na qual PI é o potencial de inibição (%), Rc é a média dos raios do controle e Ra é a média dos raios de cada amostra.

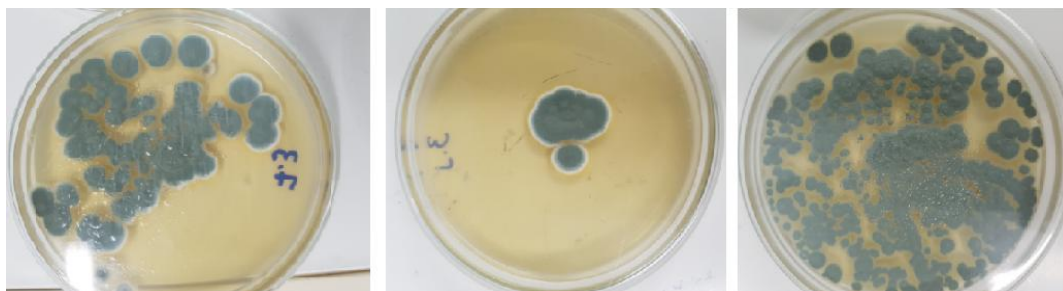
$$PI = \frac{(Rc - Ra)}{Rc} \times 100 \quad (1)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES DE QUEIJOS

Das agroindústrias selecionadas, foram coletadas cinco amostras de queijo de cada. O critério de coleta dos queijos foi à apresentação de contaminação fúngica visível. Após incubação, o crescimento de cada fungo foi sendo observado diariamente. Para os fungos que cresceram no ágar e apresentaram características diferentes em termos de cor, textura e zonação, foi realizado o isolamento para posterior identificação, como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Isolamento das colônias fúngicas em meio PDA



Fonte: elaborado pelo autor.

Após o isolamento do fungo, seguiu-se a etapa de identificação, através da qual foi identificado o gênero *Penicillium spp.* A observação das características macroscópicas foi realizada seguindo as descrições de Fisher et al., (2001), que relata que colônias de *Penicillium spp.* são caracteristicamente verde azuladas com periferia branca, apresentam textura aveludada e topografia rugosa. Microscopicamente apresentam hifas finas e septadas, conidióforos eretos e septados, apresenta um penicilo que se ramifica e suporta fiálides secundárias das quais, cadeias de conidióforos crescem (FISCHER et al, 2001).

De acordo com a literatura, este é o gênero que mais se adapta para crescer na matriz de queijo, sendo assim o mais encontrado em estudos de isolamentos de fungos nesse produto (CASQUETE et al., 2018; GARNIER et al., 2019).

3.2 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS EXTRATOS DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

3.2.1 *Lactobacillus lactis*



A Tabela 3 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios (originados de quintuplicatas) para os extratos de cada experimento do delineamento experimental e para o controle.

Tabela 3 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicilium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Lactobacillus lactis*

Experimentos	Raios (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,70±0,27	1,85±1,09	4,35±0,90	4,20±0,49	4,20±0,32	4,30±0,43	4,00±0,29	1,45±1,36
2	1,30±0,22	1,30±0,37	3,85±1,19	4,35±0,51	4,25±0,17	4,00±0,40	3,85±1,42	1,30±0,15
3	1,45±0,78	1,85±0,61	2,45±0,80	2,65±0,78	4,35±0,21	4,45±0,51	4,40±0,25	4,10±0,52
4	1,65±0,67	1,70±1,02	4,30±0,41	3,90±0,88	3,95±1,03	4,15±0,66	1,65±1,36	1,65±1,11
5	2,10±0,62	3,35±0,63	1,80±1,17	3,95±0,77	4,35±0,33	3,85±0,84	3,00±0,91	2,50±0,29
6	3,00±0,55	2,35±0,67	3,90±1,06	3,85±0,91	4,15±0,53	3,75±0,95	3,25±0,73	3,60±1,09
7	1,50±0,76	2,00±1,26	3,20±1,16	3,35±0,85	4,00±0,55	4,00±0,15	4,00±0,50	4,00±0,00
8	2,55±0,66	4,00±0,65	4,10±0,55	3,08±0,39	3,75±0,32	3,85±0,98	1,30±0,55	1,95±0,87
9	4,00±0,63	4,00±0,41	4,15±0,33	3,00±0,63	3,75±0,48	3,50±1,11	4,00±1,11	4,00±0,63
10	3,80±0,95	1,50±0,68	1,10±0,48	1,10±0,62	1,55±0,61	1,25±0,95	1,00±0,58	1,00±0,50
11	3,50±0,41	3,50±0,63	1,50±0,41	1,75±0,29	1,00±0,42	1,50±0,05	1,45±1,22	2,45±0,41
Controle	4,40±0,24	4,30±0,20	3,90±0,26	4,00±0,21	4,30±0,00	4,00±0,41	4,20±0,68	4,30±0,25

*resultados de média e desvio padrão

Fonte: elaborado pelo autor

Ao analisar os resultados do crescimento micelial dos extratos comparados com o crescimento micelial do controle, verificou-se que todos os extratos apresentaram inibição, sendo todos menores do que o crescimento micelial do controle. Observou-se também que os experimentos 10 e 11 se destacam como os melhores para esse microrganismo, sendo esse extrato obtido em condições de cultivo de pH 6, NaCl 2,5% e Sacarose 1,5%.

3.2.2 *Bifidobacterium animalis subesp. lactis*

A Tabela 4 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios (originados de quintuplicatas) para os extratos de cada experimento e do controle.

Tabela 4 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicilium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis*

Experimentos	Raios (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	3,00±0,67	2,43±0,67	2,23±0,49	1,70±0,22	2,50±0,45	2,88±1,01	3,05±0,48	2,88±0,54
2	3,25±0,82	3,13±0,43	3,78±0,79	3,70±0,64	2,57±0,85	2,95±0,62	3,38±0,39	3,20±0,43
3	1,45±0,37	2,05±0,82	3,70±0,73	3,70±0,90	3,90±0,33	3,93±0,39	2,30±1,23	1,58±0,78
4	1,43±0,51	3,33±0,50	4,28±0,34	4,10±0,48	3,80±1,22	3,55±1,16	3,38±0,92	1,60±0,35
5	2,15±0,35	2,98±0,76	4,03±0,59	3,70±0,61	2,40±0,36	1,93±0,95	2,83±0,97	2,15±0,33



6	2,28±0,79	4,38±0,10	4,03±0,56	4,25±0,10	4,08±0,19	3,55±1,12	3,50±1,49	3,70±1,21
7	3,84±0,48	3,92±0,44	3,82±0,50	4,28±0,43	4,32±0,40	4,50±0,55	4,66±0,34	4,68±0,28
8	1,65±0,37	2,13±0,49	2,78±1,22	3,03±0,54	2,20±0,76	2,38±0,64	2,65±0,62	2,20±0,54
9	2,30±0,66	3,77±0,55	4,23±0,54	2,95±1,04	3,90±1,12	3,80±1,34	3,88±1,06	3,55±1,32
10	3,05±0,52	3,93±0,73	4,30±0,18	4,12±0,40	3,36±1,00	4,10±0,48	4,33±0,68	3,47±1,01
11	2,48±0,29	2,40±0,83	3,20±0,34	3,65±0,19	3,64±0,69	3,80±0,49	3,68±0,86	3,20±0,45
Controle	3,03±0,29	3,28±0,56	3,60±0,91	4± 1,08	4,54±0,15	4,40±0,67	4,34±0,86	4,18±0,39

*resultados de média e desvio padrão

Fonte: elaborado pelo autor

Com os gráficos do crescimento micelial do experimento comparados com o crescimento micelial do controle podemos perceber que os experimentos 1,2,3,4,5,8 e 11 tiveram uma inibição, mesmo que mínima, menores do que o crescimento micelial do controle. Já nos experimentos 6,7,9 e 10 as inibições foram menores e os raios encontram-se em alguns pontos maiores que o raio do controle.

3.3 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS EXTRATOS DA SEGUNDA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

3.3.1 *Lactobacillus lactis*

A Tabela 5 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios para os extratos de cada experimento (T24h, 48h e 72h) e do controle (T0h).

Tabela 3 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Lactobacillus lactis*

Experimento	Raios (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
T 0h 1	4,53±0,15	4,60±0,20	4,20±0,20	4,40±0,10	4,47±0,21	4,43 ± 0,12	4,43 ± 0,06	4,47 ± 0,15
T 24h 1	4,17±0,35	4,27±0,35	3,70±0,82	4,20±0,53	4,60±0,10	4,60 ± 0,00	4,57 ± 0,15	4,10 ± 0,26
T 48h 1	3,87±0,60	3,87±0,57	4,07±0,67	3,97±0,45	3,90±0,62	4,00 ± 0,56	4,13 ± 0,47	4,57 ± 0,06
T 72h 1	3,60±0,80	3,07±0,40	3,03±1,00	3,33±0,55	2,43±0,86	2,87 ± 1,03	2,93 ± 1,12	3,33 ± 1,16
T 0h 2	3,83±1,08	4,27±0,32	3,73±0,70	4,43±0,47	4,33±0,55	4,43 ± 0,38	4,43 ± 0,21	4,57 ± 0,06
T 24h 2	4,13±0,32	3,37±0,15	4,17±0,29	4,3±0,21	4,40±0,20	3,90 ± 0,79	4,43 ± 0,15	4,20 ± 0,26
T 48h 2	3,53±1,06	3,87±0,70	4,37±0,35	3,97±0,67	3,40±0,85	3,43 ± 1,02	3,43 ± 0,85	3,17 ± 1,06
T 72h 2	2,83±0,61	3,50±0,89	3,57±1,01	4,23±0,38	2,87±0,23	2,60 ± 0,20	3,73 ± 0,45	3,23 ± 0,90

*resultados de média e desvio padrão

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os resultados dos halos de inibição dos extratos comparados com o halo de inibição do controle (T0h) podemos perceber que quanto maior o tempo de fermentação de cada experimento, menor é o crescimento do fungo *Penicillium* spp., sendo os menores raios de crescimento os dos experimentos com 72h de fermentação em ambos os testes.

3.3.2 *Bifidobacterium animalis subesp. lactis*

A Tabela 6 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios para os extratos de cada experimento (T24h, 48h e 72h) e do controle (T0h).



Tabela 4 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis*

Experimento	Raios (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
T 0h 1	4,50±0,10	4,67±0,21	4,80±0,10	4,73±0,12	3,97±0,84	4,27 ± 0,15	4,03 ± 0,38	3,93 ± 0,81
T 24h 1	3,93±0,75	4,47±0,21	3,97±0,78	3,97±0,84	4,27±0,42	3,93 ± 0,59	3,90 ± 0,35	3,63 ± 0,60
T 48h 1	4,13±0,99	4,10±1,04	3,73±1,10	3,97±0,64	3,33±1,12	3,23 ± 1,23	3,33 ± 1,10	3,20 ± 0,20
T 72h 1	2,93±0,70	3,13±1,10	2,83±1,45	3,07±1,26	2,60±0,75	1,83 ± 0,65	2,50 ± 0,72	2,40 ± 0,52
T 0h 2	4,40±0,26	4,23±0,25	4,30±0,36	4,00±0,79	4,53±0,12	4,53 ± 0,15	4,57 ± 0,06	4,53 ± 0,12
T 24h 2	3,07±1,25	4,27±0,32	4,47±0,12	4,10±0,61	3,30±1,15	4,13 ± 0,64	3,27 ± 0,46	2,83 ± 0,85
T 48h 2	3,47±1,43	3,40±1,45	3,10±1,15	2,73±0,61	3,30±1,28	4,40 ± 0,10	4,03 ± 0,81	2,83 ± 0,15
T 72h 2	2,83±0,59	2,33±0,15	3,07±1,10	3,70±0,89	3,60±0,30	3,33 ± 0,75	2,87 ± 0,81	3,23 ± 1,05

*resultados de média e desvio padrão

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os resultados dos halos de inibição dos extratos comparados com o halo de inibição do controle (T0h) podemos perceber que quanto maior o tempo de fermentação de cada experimento, menor é o crescimento do fungo *Penicillium* spp., sendo os menores raios de crescimento os dos experimentos com 72h de fermentação em ambos os testes.

Neste estudo foi observado potencial antifúngico nos extratos de *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* e *Lactobacillus lactis* frente ao *Penicillium* spp.

As melhores condições de cultivo das BAL's, que propiciaram as melhores atividades antifúngicas foram pH 6, NaCl 2,5% e Sacarose 1,5% para *Lactobacillus lactis* frente ao *Penicillium* spp. e pH 7, NaCl 4% e Sacarose 2,5% para *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* frente ao *Penicillium* spp.

Um estudo realizado por Garnier et al. (2019) com 430 extratos de fermentação de BAL com dois substratos lácteos diferentes mostrou que com o primeiro substrato apenas 81 (18,9%) deles apresentaram atividade antifúngica frente ao *P. commune*, e com o segundo substrato o número caiu para 8 (1,8%), neste estudo também foi identificado que as BAL com maior potencial antifúngico eram principalmente de espécies de *Lactobacillus*.

Na segunda etapa de fermentação desse estudo obtivemos uma clara comprovação de que quanto maior o tempo de fermentação, maior se torna o potencial de inibição dos extratos de fermentação das bactérias ácido lácticas. O tempo de 72h mostrou-se nos quatro testes feitos na segunda etapa ser o mais eficaz no controle do *Penicillium* spp. Em geral, quanto maior o tempo de incubação e quanto maior a concentração de células, mais significativa à atividade antifúngica (GARNIER et al., 2019).

Em um estudo com *Lactobacillus curvatus*, Ahmadova et al. (2013) observaram inibição do crescimento de fungos (*Cladosporium* e *Fusarium*) e maior crescimento da bactéria ácido láctica em fermentação com pH 7,0 e 9,0. Assim como o encontrado nesse estudo para o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* que apresentou melhores resultados em fermentação com pH 7,0.

Em nosso teste o *Lactobacillus lactis* apresentou melhores resultados frente ao fungo quando cultivado em pH 6,0. A atividade antifúngica de 36 culturas de BAL foram avaliadas após fermentação em pH 6,5 e temperatura de 37°C, 83% das cepas inibiram *Penicillium* spp. 62 % apresentaram resultados contra *P. digitatum* e 52% tiveram ação frente *A. niger* (GEREZ et al., 2013).

Moghanjougi et al. (2020) testou os efeitos antifúngicos dos filmes bioativos com *L. acidophilus* encapsulado e concluiu que o uso de cepas probióticas pode aumentar a vida útil do queijo, pois após 45 dias de maturação a quantidade de fungos presentes nas amostras com a substância antifúngica foi significativamente menor do que os queijos usados como controle.

Portando os extratos produzidos no presente estudo poderão ser utilizados como bioconservantes em queijos e poderão ser produzidos com um meio de cultivo de baixo custo.

4 CONCLUSÃO

Atualmente existe uma demanda crescente da população por alimentos mais naturais, com menos conservantes químicos e com propriedades benéficas ao organismo. Cada vez mais se fala da correlação entre alimentação e saúde, o que torna os alimentos funcionais uma grande aposta para o futuro das indústrias.



A eficácia da produção de microrganismos com potencial antimicrobiano a partir de bactérias ácido lácticas já é comprovado através de diversos estudos científicos e está cada vez mais sendo explorada para que no futuro possa ser ainda mais utilizada em escala industrial.

O potencial antifúngico de extratos de BAL é uma área que ainda precisa ser mais bem explorada, tendo em vista a dificuldade de resultados satisfatórios contra fungos contaminantes de alimentos. Com os resultados obtidos neste estudo conseguimos contribuir para pesquisas futuras sinalizando o potencial antifúngico dos extratos de *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* e *Lactobacillus lactis*. frente ao *Penicillium spp.*

5 AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao PIBIC/CNPq e a Universidade de Passo Fundo.

6 REFERÊNCIAS

- AHMADOVA, A. et al. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. **Anaerobe**. v. 20, p. 42-49, 2013.
- BARMAN, S.; GHOSH, R.; MANDAL, N. C. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, p. 286–296, 2018.
- CASQUETE, R. et al. Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. **LWT - Food Science and Technology**. v. 89, p. 179-185, 2018.
- COSTA, M. J. et al. Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 84–92, 2018.
- ELAYARAJA, S. et al. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 4, p. 305-311, 2014.
- FERNANDEZ, B. et al. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. **Food Control**, v. 78, p. 350-356, 2017.
- FISCHER, F. et al. Fundamentals of Diagnostic Mycology. **Saunders Company**. 2001.
- GARNIER, L. et al. Development of antifungal ingredients for dairy products: From in vitro screening to pilot scale application. **Food Microbiology**. v. 81, p. 97-107, 2019.
- GARNIER, L. et al. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 191–197, 2017.
- GEREZ, C. L. et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. **Biological control**. v. 64, p. 231-237, 2013.
- JURADO, M.; NAVARRO, P. R. Effects of fungal growth on the firmness of a cheese analogue formulated with different casein-to-fat ratios. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 145–151, 2018.
- MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Biotechnology, Current Opinion**, v. 44, p. 94–102, 2017.
- MISRA, N. N. et al. Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. **Food Research International**, v. 97, p. 318–339, 2017.
- MOGHANJOUGI, Z. M. et al. Bio-preservation of white brined cheese (Feta) by using probiotic bacteria immobilized in bacterial cellulose: Optimization by response surface method and characterization. **LWT - Food Science and Technology**. v. 117, p. 108603, 2020.
- MUKHOPADHYAY, S.; UKUKU, D. O. The role of emerging technologies to ensure the microbial safety of fresh produce, milk and eggs. **Food Science, Current Opinion**, v. 19, p. 145–154, 2018.
- PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, R. K. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. **Biomedical journal**, v. 40, p. 270-283, 2017.
- SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. **Edgard Blücher Ltda**, 5ª Edição, 2017.
- SABO, S. S. et al. Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat. **Food Research International**, v. 99, p. 762–769, 2017.
- ZHENG, X. et al. Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. **Food Research International**, v. 105, p. 733-742, 2018.
- WONG, F. et al. Recovery of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus acidilactici* Kp10 using surfactant precipitation. **Food Chemistry**, v. 232, p. 245–252, 2017.