

Biodegradação de Ochratoxin A por *Pediococcus parvulus*

Luís Abrunhosa ^{a,*}, Ana Guimarães ^a, António Inês ^b e Armando Venâncio ^a

^a CEB-Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

^b CQVR-Centre of Chemistry Vila Real, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Department of Biology and Environment, School of Life Sciences and Environment, Edifício de Enologia, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal

Algumas bactérias do ácido láctico (BAL) são capazes de destoxificar micotoxinas através de processos de adsorção às suas paredes celulares ou através de processos de biotransformação em compostos menos tóxicos. Uma das micotoxinas mais importantes encontradas em produtos agrícolas é a ocratoxina A (OTA). A OTA é conhecida principalmente pela sua nefro e carcinogenicidade, estando classificada no Grupo 2B pelo IARC.

O presente trabalho descreve a destoxificação de OTA por estirpes de *Pediococcus parvulus* que foram isoladas de vinhos do Douro. As estirpes foram identificadas e caracterizadas utilizando uma abordagem polifásica que utilizou métodos fenotípicos e genotípicos. Para identificar e caracterizar a sua capacidade para destoxificar a OTA, as estirpes foram cultivadas em meio MRS suplementado com esta micotoxina (1 µg/mL). A concentração de OTA, a temperatura de incubação e a concentração de inóculo foram os parâmetros cujo efeito na destoxificação foi avaliado.

Verificou-se que a OTA foi degradada em OTα pelas estirpes de *P. parvulus* em todas as condições testadas e que a estirpe tipo desta espécie não apresentou essa capacidade. Ademais, a OTα foi confirmada por LC-MS/MS. A conversão de OTA em OTα indica que a ligação amida presente na micotoxina foi hidrolisada por uma peptidase. Verificou-se também que a taxa de biodegradação da OTA depende do tamanho do inóculo e da temperatura de incubação. Às condições ótimas (10⁹ CFU/mL e 30 °C), 50% e 90% da OTA foi degradado em 6 e 19 h, respetivamente. Por outro lado, observou-se que as células mortas de *P. parvulus* adsorveram apenas 1,3% da OTA, o que exclui este mecanismo na eliminação da micotoxina pelas bactérias. A biodegradação de OTA por *P. parvulus* UTAD 473 foi também avaliada e observada em mostos de uvas. Experiências de vinificação foram também realizadas.

Uma vez que algumas estirpes de *P. parvulus* têm propriedades probióticas relevantes, as estirpes isoladas de vinhos do Douro podem ser de particular interesse para aplicações em alimentos e rações de forma a neutralizar os efeitos tóxicos da OTA.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pelo FEDER através do COMPETE e pela FCT; Ref. FCOMP-01-0124-FEDER-028029 e PTDC/AGR-TEC/3900/2012, respetivamente. Luís Abrunhosa foi apoiado através da bolsa Incentivo/EQB/LA0023/2014 do ON.2 - O Novo Norte.



Biodegradação de Ochratoxin A por *Pediococcus parvulus*



Luís Abrunhosa ^{a,*}, Ana Guimarães ^a, António Inês ^b e Armando Venâncio ^a

^aCEB-Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

^bCentro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Biologia e Ambiente, Edifício de Enologia, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal

* luisjap@deb.uminho.pt

Sumário

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina que pode ser encontrada no café, vinho tinto e frutos secos mas a sua principal fonte são os cereais e os seus derivados. É produzida principalmente por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*. Estas duas últimas espécies são muito comuns em uvas e são responsáveis pela presença de OTA nos vinhos. Na Europa, o vinho é a segunda principal fonte dietética desta micotoxina, estando por isso estabelecido um limite máximo para a sua presença em vinho de 2 µg/kg [1]. Para que os vinhos possam cumprir com esse limite, é necessário implementar medidas preventivas ou correctivas.

No presente trabalho estudou-se a aplicação em mostos e em vinhos de uma bactéria láctica (*Pediococcus parvulus*) que tem a capacidade de hidrolisar a OTA em compostos não tóxicos. Desta forma, pretendeu-se avaliar se a bactéria seria capaz de eliminar esta micotoxina nas referidas matrizes. Para tal, suplementou-se mosto e vinho sintético com OTA comercial. De seguida, inocularam-se, em triplicado, matrizes com 100 mL de mosto ou de vinho com 10⁹ UFC/mL da bactéria. Ensaios em que se inoculou a bactéria juntamente com uma levedura enológica, ensaios sem a bactéria e só com a levedura foram também realizados. Os matrizes foram incubadas a 25 °C no escuro durante 30 dias e amostras foram recolhidas ao longo do tempo para analisar a presença de OTA. Os açúcares totais, ácido málico, ácido láctico e etanol foram também determinados.

No vinho sintético, verificou-se que a estirpe de *Pediococcus parvulus* não foi capaz de eliminar a OTA embora tenha convertido o ácido málico em ácido láctico. Nos mostos, verificou-se que a estirpe *Pediococcus parvulus* UTAD 473 foi capaz de eliminar esta micotoxina. Ao fim de 3 dias a bactéria tinha degradado 50% da OTA presente no mosto, ao fim de 6 dias essa percentagem atingiu os 80%. Nos ensaios realizados com a bactéria e com *Saccharomyces cerevisiae* em simultâneo, verificou-se uma tendência similar - 66% da OTA foi eliminada nos primeiros 3 dias e ao fim de 6 dias essa percentagem atingiu os 78%. Num dos ensaios conseguiu-se eliminar a totalidade da OTA do mosto ao fim de um período de 3 dias. No mosto, verificou-se ainda que os níveis de açúcares consumidos pela bactéria foram muito baixos, indicando que estes ficam disponíveis para que a levedura possa levar a bom termo a fermentação alcoólica. Em estudos futuros pretende-se avaliar o impacto de *Pediococcus parvulus* na qualidade do vinho produzido.

Resultados e Conclusões

RESULTADOS

- No vinho sintético, não se observou nenhuma acção hidrolítica da estirpe *Pediococcus parvulus* UTAD 473 sobre a OTA (Figura 1.A). Também não se detectou nenhuma OTA nos cromatogramas destas amostras.
- No mosto, observou-se uma clara acção hidrolítica da estirpe *Pediococcus parvulus* UTAD 473 sobre a OTA (Figura 1.B). Para além do declínio da concentração de OTA no mosto, observou-se um aumento da concentração de Ota.
- Ao fim de 3 dias a bactéria degradou 50% da OTA presente no mosto, ao fim de 6 dias essa percentagem atingiu os 80% (Figura 1.B).
- No mosto inoculado com a estirpe *Pediococcus parvulus* UTAD 473 e *S. cerevisiae* em simultâneo, observou-se também a hidrólise de OTA (Figura 2.A).
- Ao fim de 3 dias a bactéria degradou 66% da OTA presente no mosto, ao fim de 6 dias essa percentagem atingiu os 78% (Figura 2.A).
- No mosto inoculado com a estirpe *Pediococcus parvulus* UTAD 473 durante 3 dias e depois inoculado com *S. cerevisiae* verificou-se a eliminação total da OTA nos 3 primeiros dias (Figura 2.B).
- Na Figura 3 estão apresentadas as concentrações de açúcares totais, ácido málico, ácido láctico e etanol nestes ensaios.

CONCLUSÕES

- Conclui-se que a estirpe *Pediococcus parvulus* UTAD 473 consegue eliminar a micotoxina ocratoxina A no mosto de uvas.
- No processo de vinificação, esta bactéria tem potencial para ser adicionada antes do início da fermentação alcoólica, e.g. durante o período de maceração dos mostos de forma a eliminar a OTA.
- Conclui-se ainda que tem potencial para ser utilizada na eliminação de OTA em sumos de uva.
- Estudos futuros irão avaliar o impacto de *Pediococcus parvulus* na qualidade do vinho produzido.

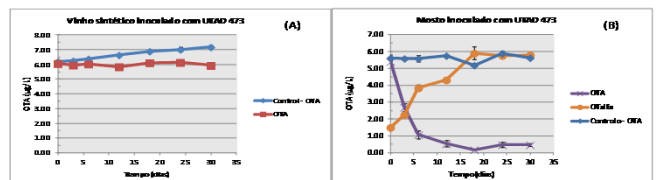


Figura 1. Concentração de OTA e Ota detectada no vinho (A) e no mosto (B) ao longo do tempo após inoculação com *P. parvulus* UTAD 473.

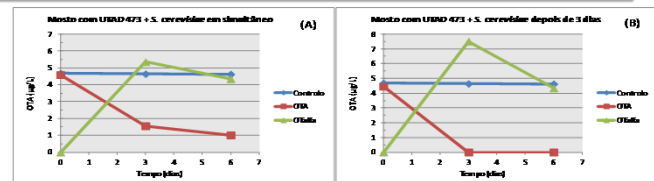


Figura 2. Concentração de OTA e Ota detectada no mosto (A) e no mosto (B) ao longo do tempo após inoculação com *P. parvulus* UTAD 473.

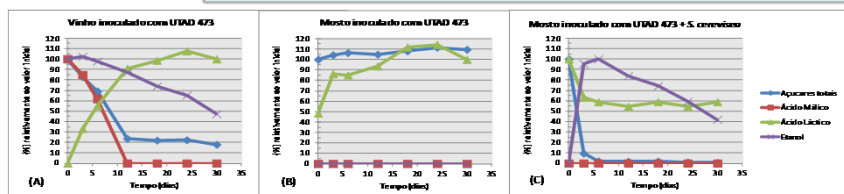


Figura 3. Evolução da concentração de açúcares totais, ácido málico, ácido láctico e etanol no mosto e no vinho, expressos em percentagem dos valores iniciais.

Materiais e Métodos

- Preparação do material biológico:** a estirpe *Pediococcus parvulus* UTAD 473 foi crescida em MRS (Oxoid) a 30 °C durante 5 dias. De seguida o inóculo foi transferido para 200 mL de meio de adaptação (MRS, 50 g/L; glucose, 20 g/L; frutose, 40 g/L; ácido málico, 4 g/L; Tween 80, 1 g/L; etanol, 6%; pH 4.6) e incubado a 30 °C durante 5 dias. O inóculo gerado foi concentrado e o número de UFC determinado. A levedura enológica *S. cerevisiae* LALVIN QA23 (Lallemand) foi reavivada em meio YPD líquido a 30 °C durante 2 dias.
- Ensaios com vinho sintético:** Preparou-se vinho sintético de acordo com Mateo et al. [2], esterilizou-se a 115 °C durante 25 min, adicionou-se etanol esterilizado por filtração (12,5%), suplementou-se com 7 µg/mL de OTA e colocaram-se 100 mL em matrizes. Inocularam-se 3 matrizes com 10⁹ UFC/mL de *P. parvulus* UTAD 473 e prepararam-se, como controlos, 3 matrizes sem inóculo. Os matrizes foram incubados a 25 °C no escuro.
- Ensaios com mosto de uva:** Trituraram-se uvas da variedade Red Globe, filtrou-se o sumo por um filtro de papel, adicionou-se 2 g/L de extracto de levedura e esterilizou-se a 115 °C durante 25 min. O mosto foi de seguida suplementado com 7 µg/mL de OTA e colocaram-se 100 mL em matrizes. Prepararam-se 3 matrizes inoculadas com 10⁹ UFC/mL de *P. parvulus* UTAD 473; 3 matrizes inoculadas com 10⁹ UFC/mL de *P. parvulus* UTAD 473 e com 10⁹ UFC/mL de *S. cerevisiae* (inóculos adicionados em simultâneo no tempo 0); 3 matrizes inoculadas com 10⁹ UFC/mL de *P. parvulus* UTAD 473 (inóculo adicionado no tempo 0) e com 10⁹ UFC/mL de *S. cerevisiae* (inóculo adicionado no tempo 3h); e 3 matrizes sem inóculo. Os matrizes foram incubados a 25 °C no escuro.
- Processamento das amostras e análises:** Recolheram-se amostras ao fim de 0, 3, 6, 12, 18, 24 e 30 dias. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min e extrairam-se 2 mL de sobrenadante com igual volume de acetonitrilo/metanol/ácido acético (78:20:2, v/v/v). A OTA foi determinada por HPLC com fluorescência [3]. Os açúcares totais, ácidos orgânicos (ácido málico e ácido láctico) e etanol foram determinados por HPLC com detecção por índice de refração e por ultravioleta utilizando uma coluna Varian 67H Metacarb (300 mm x 6,5 mm) operado a 80 °C e uma solução de 5 mmol/L de H2SO4 como eluente a um caudal de 0,5 mL/min.

Referências:

- Comissão Europeia. 2005. Regulamento (CE) nº 123/2005, de 26 de janeiro de 2005, que altera o Regulamento (CE) nº 466/2001 no que diz respeito à ocratoxina A. Off. J. Eur. Union. L25:3-5; [2] Mateo, E.M., et al. 2010. Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media. Food Control. 21, 935-941; [3] Abrunhosa, L., Venâncio, A., 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters 29, 1909-1914.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado por fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade - COMPETE e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT, ref. FCOMP-01-0124-FEDER-028029 e PTD/AGR-TEC/3900/2012, respectivamente. Este trabalho também foi financiado pelo IBB/CGB-UTAD e Centro de Química de Vila Real (CQ-VR). Luís Abrunhosa recebeu apoio através da bolsa Incentivo/EQB/LA0023/2014 from ON.2 – O Novo Norte.