

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO

**JULIA NEITZEL UECKER¹; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI²; CHARLENE
CARVALHO CUNHA³; MARINA SCHUMANN PERELLÓ⁴; PAMELA DOS
SANTOS HELLWIG⁵; SIMONE PIENIZ⁶**

¹*Universidade Federal de Pelotas – julia_uecker@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – cha.cunha@hotmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – marinaperello.rs@hotmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – pml.1991@hotmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com*

1. INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de produtos lácteos atualmente é consumida diariamente pela população mundial, utilizando estes aliados microbianos de uma forma eficiente para suprir nossas necessidades diárias de alguns micronutrientes (CABRÉ e GASSULL, 2007). As bactérias ácido-lácticas (BAL) constituem um grande grupo de bactérias benéficas que possuem propriedades semelhantes e que produzem como produto final do processo de fermentação o ácido. As BAL são as principais representantes dos probióticos em alimentos.

Estas são consideradas bactérias probióticas definidas como suplemento microbiano vivo, que melhoram o equilíbrio microbiano do intestino e possuem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro. As células probióticas depois de ingeridas devem ser capazes de sobreviverem às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal, como suco gástrico, presença de sais biliares e enzimas digestivas e, manterem a viabilidade e a atividade metabólica no intestino para exercerem os efeitos benéficos aos hospedeiros (ADNAN, 2007).

De acordo com a legislação brasileira, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária (BRASIL, 2007). As bactérias probióticas oriundas de alimentos devem basicamente sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal para, então, colonizarem o intestino e beneficiar seu hospedeiro. Desta forma, o isolamento e caracterização probiótica é de suma importância, pois já é sabido que nem todos os micro-organismos contidos em um determinado alimento possuem esse potencial. Desta forma, este estudo teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar BAL presentes em alimentos de origem láctea com potencial probiótico, atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante.

2. METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia e Nutrifisiogenômica da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os micro-organismos foram isolados de alimentos lácteos como leite de vaca (L1 e L2) e ricota (R5, R7 e R9). Como controle foi utilizado o leite fermentado Yakult® (Y1 e Y2). O isolamento das BAL foi realizada conforme normas preconizadas para amostras de produtos lácteos. O preparo da primeira diluição constou da adição de 225mL de água peptonada 0,1% e 25g da amostra.

A resistência dos isolados sob diferentes condições ácidas foi avaliada em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (pH6,5) ajustado a pH 2, 3 e 4 com ácido clorídrico (HCl) concentrado. A avaliação de tolerância ao trânsito

gastrointestinal superior, conforme HUANG e ADAMS (2004). O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3mg/mL) e pH2 com ou sem a adição de leite; enquanto o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1mg/mL), pH8 com ou sem adição de 0,5% de sais biliares. O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH2 foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina por 0,3mL de leite integral reconstituído a 10% (m/v).

Atividade antimicrobiana foi testada por meio dos métodos de difusão em poços e difusão em disco. O método de difusão em poços foi avaliado como descrito por BISCOLA et al. (2013) com modificações. A presença de halo de inibição foi considerada indicadora da produção de bacteriocina, caracterizando a capacidade bacteriocinogênica dos isolados. No teste de difusão de disco colônias dos micro-organismos indicadores (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076) foram suspensas em solução salina 0,85% e padronizadas a 0,150 por DO_{600} em espectrofotômetro, sendo considerados inibitórios os halos $\geq 7\text{mm}$ (TODOROV e DICK, 2004). Ambos experimentos foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes.

A capacidade antioxidante foi medida por meio da determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com a metodologia descrita por OHKAWA et al. (1975) e, o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizado de acordo com BRAND-WILLIAMS et al. (1995), baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes. Ambos os testes foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes.

A produção de lipase foi realizada de acordo com BARBOSA et al. (2010). Atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias. A produção de gelatinase foi realizada de acordo com MARRA et al. (2007). O resultado foi interpretado como negativo: meio sólido/ positivo: meio líquido. Os isolados foram testados quanto a atividade hemolítica utilizando Agar Sangue suplementado com sangue de cavalo (7%) (FOULQUIÉ et al., 2003). A interpretação deste resultado foi realizada da seguinte forma: α -hemólise - linhagens que produziram zonas verde em torno das colônias; γ -hemólise - não produziram qualquer efeito sobre as placas de Agar Sangue, sendo consideradas não hemolíticos. Os isolados que apresentam zonas de lise ao redor das colônias foram classificadas como hemolítica (β -hemólise).

A atividade de DNase foi testada como descrito por BANNERMAN (2003), com adaptações, utilizando o Agar DNase. A formação de halo claro em torno das colônias foi considerado como resultado positivo. A capacidade de fermentar glicose com produção de gás CO_2 foi determinada a partir do método descrito por LIMA et al. (2009), no qual *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Nos tubos em que se observou turbidez do meio e produção de gás, os isolados foram classificados como heterofermentativos, enquanto aqueles que apresentarem somente turvação do meio foram classificados como homofermentativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias ácido lácticas isoladas no presente estudo foram identificadas molecularmente por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e depositadas no GenBank como: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (JQ953682); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (KF8791260); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (KF879126);

Leuconostoc citreum; *Aurantimonas altamirensis* (GQ994985); *Lactobacillus casei* (LC188883) e *Lactobacillus casei* (LC188883).

No presente estudo, todos os micro-organismos, exceto o isolado F3, apresentaram tolerância ácida nas diferentes concentrações de pH e tempos analisados. O presente estudo demonstrou tolerância ao suco gástrico simulado pelos micro-organismos R5, R7 e R9, em ambos os tratamentos (pepsina pH2 e pepsina pH2 + leite integral) e em todos os tempos analisados (0h, 2h e 4h). Ainda, foi demonstrado que, na análise da tolerância ao suco intestinal simulado os isolados R7, R9 e L1 mostraram ser resistentes às condições ácidas do suco intestinal simulado quando expostos ao tratamento pancreatina pH8, principalmente.

Quanto à atividade antimicrobiana por difusão em poços frente ao micro-organismo *L. monocytogenes* observou-se que os isolados R7 e R9 apresentaram halos de inibição satisfatórios ($1,37\text{cm} \pm 0,05$; $1,38\text{cm} \pm 0,08$; respectivamente). Quanto a ação antimicrobiana dos isolados frente ao *S. aureus* observou-se que os isolados R5, R7 e R9 ($0,77\text{cm} \pm 0,08$; $1,52\text{cm} \pm 0,08$; $1,37\text{cm} \pm 0,14$; respectivamente) apresentaram atividade antimicrobiana. Ao analisar o micro-organismo indicador *Salmonella Enteritidis* não foi observada atividade antimicrobiana pelos isolados.

Por meio da análise da atividade antimicrobiana por difusão em disco observou-se que os micro-organismos Y1, Y2, R5, R7 e R9, apresentaram inibição frente ao micro-organismo *E. coli*. Ao analisar o efeito inibitório dos isolados frente aos demais micro-organismos indicadores não foi observada ação antimicrobiana.

A capacidade antioxidante pelo método de TBARS, utilizando o sobrenadante bruto das BAL, observou-se que somente o micro-organismo R7 apresentou inibição da peroxidação lipídica. Os demais micro-organismos analisados apresentaram oxidação perante o ácido tiobarbitúrico. É importante ressaltar que os micro-organismos controle utilizados para avaliação da capacidade probiótica (Y1 e Y2) não apresentaram capacidade antioxidante por este método.

A análise pelo método de DPPH, utilizando o sobrenadante bruto das BAL, revelou que todos os micro-organismos apresentaram capacidade destes isolados em sequestrar o radical DPPH, confirmando assim sua ação antioxidante pela mudança significativa na sua coloração que passa da cor violeta para coloração amarela quando em contato com a substância antioxidante.

Os resultados referentes à análise de virulência revelou que todos os isolados não apresentaram atividade enzimática para gelatinase, lipase e DNAse, enquanto que para a atividade hemolítica os isolados foram classificados como α-hemólise. Ainda, de acordo com os resultados do perfil fermentativo os micro-organismos foram considerados como homofermentativos.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que os isolados R7, R9 e L1 apresentaram características probióticas satisfatórias em todas as análises realizadas (tempos/concentrações). Todos os isolados apresentaram capacidade de sequestro de radicais livres pelo método de DPPH. Da mesma forma, os isolados em estudo não apresentaram fatores de virulência. Assim, estes resultados são de extrema importância, visto que estes isolados podem, futuramente, serem utilizados como suplemento tanto na dieta humana, bem como animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADNAN, A.F.M.; TAN, I.K.P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1380-1385, 2007.
- BANNERMAN, T.M. **Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically**. In P. R. Murray (Ed.), *Manual of clinical microbiology*,; 8 ed., p. 384-404. Washington, DC: ASM Press, 2003.
- BARBOSA, O.; ARIZA. C.; ORTIZ, C.; TORRES, R. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). **New Biotechnology**, v.27, n.6, p.844- 850, 2010.
- BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C; ABRIQUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B.D.G.M. Isolation and characterization of a nisin like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v.93, n.3, p.607–613, 2013.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Atualizado em agosto de 2007.
- CABRÉ, E.; GASSULL, M. A. Probiotics for preventing relapse or recurrence in Crohn's disease involving the ileum: Are there reasons for failure. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 1, p. 47-52, 2007.
- FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; CALLEWAERT, R.; DEVREESE, B.; VANBEEUMEN, J.; DEVUYST, L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Microbiology**, n.94, p.214-229, 2003.
- HUANG, Y.; ADAMS, M.C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p.253-260, 2004.
- LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.266–272, 2009.
- MARRA, A.; DIB-HAJJ. F.; LAMB, L.; KACZMAREK, F.; SHANG, W.; BECKIUS, G.; MILICI, A.J.; MEDINA, I.; GOOTZ, T.D. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology**, v.58, p.59-65, 2007.
- OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n.2, p. 351-358, 1979.
- TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, n.4, p.305-316, 2004.