

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS PROBIÓTICAS ISOLADAS DE DERIVADOS LÁCTEOS

PATRICIA DA ROCHA TIETZ¹; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI²; JULIA
UECKER³; SIMONE PIENIZ⁴; TIANE MARTIN DE MOURA⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – paty-rt@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – julia_uecker@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas – tianedemoura@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A busca por uma vida saudável e pelo bem-estar tem sido crescente e a alimentação é um importante papel neste cenário. Assim surgem os alimentos funcionais que, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), é todo aquele alimento ou ingrediente que produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benefícios à saúde, sendo seguro para consumo sem supervisão médica. Assim, os alimentos probióticos são considerados alimentos funcionais.

A palavra “Probiótico” deriva do grego e significa “para vida” (NEVES, 2005; BADARÓ, 2008) e segundo BAGCHI (2014), Lilly e Stilwell foram os primeiros a utilizar o termo para definir substâncias secretadas por um organismo que estimula o crescimento de outro”.

Alguns autores afirmam que os probióticos, em sua grande maioria, são bactérias ácido-láticas (BAL) que constituem um grupo diverso de micro-organismos que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal, respiratório superior e urogenital de diferentes espécies animais, naturalmente encontradas em habitats nutritivos (TANNOCK et al, 1999; COPPA et al, 2004; RESENDE et al, 2011).

A identificação de BAL pode ser realizada por técnicas microbiológicas clássicas e moleculares, bem como por meio da combinação de ambas (RESENDE et al, 2011). Para o isolamento clássico de bactérias com morfologia de cocos e bacilos, HASSAN et al (2001) e CARVALHO (2007) sugerem o ágar Rogosa acidificado (MRS) complementando com provas bioquímicas e fisiológicas para identificação detalhada (QUERE et al, 1997).

Probióticos inclusos na dieta, bem como o consumo adequado de fibras, são fundamentais no equilíbrio intestinal. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar o isolamento e a identificação molecular de BAL de alimentos lácteos, visando a descoberta de novas linhagens com potencial probiótico.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia e de Nutrifisiogenômica e Metabolômica da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas e as amostras de alimentos utilizados foram kefir, iogurte, leite de vaca *in natura*, ricota, queijo tipo Minas Frescal e leite fermentado sendo este o grupo controle.

Para o preparo das amostras foram pesadas 25g de cada alimento e transferidos para sacos estéreis e homogeneizadas em 225mL de água peptonada estéril obtendo-se a diluição 10⁻¹ com posterior diluições decimais seriadas. Para o isolamento, foi realizada inoculação de 100µL, em duplicata, em ágar MRS das diferentes diluições por plaqueamento em superfície e incubação a

$\pm 35^{\circ}\text{C}/48\text{-}72\text{h}$. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias por amostra e inoculadas em placas contendo BHI e incubadas a $\pm 35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ para avaliação de pureza, coloração de Gram, prova da catalase e avaliação da morfologia das colônias.

O DNA genômico foi extraído pela transferência de uma colônia para um microtubo de 1,5mL contendo 100 μL de EAR Buffer e 5 μL de Proteinase K (20mg/mL Invitrogen®) e incubado a $55^{\circ}\text{C}/4\text{h}$. Posteriormente foram adicionados 750 μL de Buffer TE e centrifugado por 5 minutos a 18.000Xg e o sobrenadante foi utilizado como *template* para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para a amplificação do gene 16S rRNA foram utilizados os oligonucleotídeos universais 27F e 1492R (LANE, 1991). As reações da PCR foram otimizadas em 20 μL de volume final contendo 17 μL de Master Mix 2X (GoTaq, Promega®), 1 μL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 μL de *template* e 1 μL de água deionizada ultrapura (Milli Q plus, Millipore®). As reações foram amplificadas em Termociclador Amplitherm® nas seguintes condições: desnaturação inicial 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em após coloração com Syber Safe (Invitrogen®) e purificados com KIT GFX® (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado em sequenciador modelo ABI 3130 (Applied Biosystems) utilizando o polímero POP6. Para a marcação foi utilizado o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), juntamente com o oligonucleotídeo iniciador 519R. A similaridade das sequências de nucleotídeos foi avaliada utilizando o software Geneious R9 alinhadas por ClustalW pela ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas 30 colônias aleatórias para purificação em agar BHI e os isolados com coloração Gram-positiva, testes negativos para catalase e morfologia característica de BAL, foram selecionados para a identificação molecular.

Doze isolados foram submetidos à amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, conforme dados apresentados na Tabela 1. Os isolados Y1 e Y2 foram utilizados como controle positivos por serem produtos já considerados probióticos.

Isolados	Fonte	Espécie	Similaridade	GenBank número de acesso
Y1	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	96,6%	LC188883
Y2	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	98%	LC188883
R1	Ricota	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95%	KF879126
R5	Ricota	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	92%	JQ953682
R7	Ricota	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99,8%	KF879126
R9	Ricota	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95,7%	KF879126
F3	Queijo Minas Frescal	<i>Lactococcus lactis</i>	98,2%	KF879126
F4	Queijo Minas Frescal	<i>Streptococcus parauberis</i>	98,1%	NR_043001
L1	Leite de vaca	<i>Leuconostoc citreum</i>	76%	HM803934.1
L2	Leite de vaca	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	96,5%	GQ994985
K1	Kefir	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	94,1%	KF879126
K2	Kefir	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	94,3%	KJ531392

Tabela 1: Identificação dos isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Os resultados encontrados nos isolados do grupo controle Y1 e Y2 foram identificados com *Lactobacillus casei*, confirmando o resultado esperado, visto

que a cepa comercial utilizada para este produto é *Lactobacillus casei* Shirota (YAKULT, 2017).

Isolados oriundos do leite de vaca *in natura* mostraram-se diferentes em gêneros, tendo a amostra L1 apresentado 76% de similaridade com *Leuconostoc citreum*, e o isolado L2 apresentou 96,5% de similaridade com *Aurantimonas altamirensis*. OMURA (2014) analisando leite humano encontrou micro-organismos pertencentes aos gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus*, e MEIRA (2011) analisando leite ovino identificou *Lactobacillus plantarum* e *paracasei*. Estes resultados sugerem que, embora seja o mesmo produto, o tipo de micro-organismo predominante em leites varia conforme a espécie produtora.

Os isolados da ricota apresentaram o gênero predominante *Lactococcus lactis* porém com subespécies distintas. R1, R7 e R9 foram identificados com similaridade de 95% a 99,8% com a subespécie *lactis*, enquanto R5 apresentou 92% de similaridade com a subespécie *cremoris*. O queijo tipo Minas Frescal também foi observado distinção nas espécies identificadas, F3 apresentou 98,2% de similaridade com *Lactococcus lactis* e o isolado F4 98,1% de similaridade com *Streptococcus parauberis*. Segundo NOMURA (2006) as subespécies *lactis* e *cremoris* são as mais empregadas na indústria de produtos lácteos, principalmente na produção de queijos, justificando nossos resultados.

Entre os isolados de kefir foi possível identificar 94% de similaridade a espécie *Lactococcus lactis* com variação na subespécie *lactis* e *cremoris*, respectivamente para K1 e K2. Com o mesmo propósito, CARNEIRO (2010) identificou 8 micro-organismos em 22 amostras de kefir, entre eles *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis* e subesp. *cremoris*; *Lactobacillus casei* e *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *mesenteroides*.

4. CONCLUSÕES

Após as análises foi possível observar que houve predominância de 70% de bactérias da espécie *Lactococcus lactis* entre as amostras de alimentos lácteos. Por ser uma espécie oriunda da própria microbiota do leite, espera-se que ela possa apresentar características de uma bactéria com potencial probiótico para o desenvolvimento de novos produtos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADARÓ, A.C.; GUTTIERRES, A.P.; BEZENDE, A.C.; STRINGUETA, P.C. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde humana - parte 1. **Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga, v.2, n.3, p.2–29, 2008.
- BAGCHI, T. Traditional food & modern lifestyle: Impact of probiotics. **Indian Journal of Medical Research**, Vadodara. v.140, n.3, p.333-5, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Acessado em 15 abr. 2008. Online. Disponível em: [http:// www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)
- CARNEIRO, R.P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos - Universidade Federal de Minas Gerais.
- CARVALHO, J.D.G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**.



2007. 182f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
- COPPA, G.V.; BRUNI, S.; MORELLI, L.; SOLDI, S.; GABRIELLI, O. The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. **Journal of clinical gastroenterology**, Ancona, v.38, n.6, p. 80-83, 2004.
- HASSAN, A.N.; FRANK, J.F. **Starter cultures and their use. Applied Dairy Microbiology**. 2ª ed. New York: Marcel Decker, 2001.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow MN (eds) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Wiley: Chichester; 1991
- MEIRA, S.M.M. **Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha**. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- NEVES, L. **Fermentado probiótico de suco de maçã**. 2005. 106f. Tese (Doutorado em Tecnologia) – Curso de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos Agroindustriais), Universidade Federal do Paraná.
- NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**. Tsukuba, v.101, n.2, p.396-405, 2006.
- OMURA, M.H. **Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano**. 2014. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos- Universidade Federal de Viçosa.
- QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M.C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, Talence, v.82, n.6, p.783-790, 1997.
- RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; CUNHA, A.F. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011
- TANNOCK, G.W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; NG, J.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and environmental microbiology**. Thailand, v.65, n.9, p.4264-4267, 1999.
- YAKULT. **Informações sobre o Leite Fermentado Yakult®**. Acessado em 20 abr. 2016 Online. Disponível em: <http://www.yakult.com.br/yakult/default.aspx?mn=217&c=229&s=0>