

OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE LACTOSE DE AMOSTRAS DE QUEIJOS E IOGURTES COMERCIALIZADOS EM MANAUS

Raissa Sayumy Kataki FONSECA¹

Cassiane MINELLI-OLIVEIRA²

Luiz Antonio de OLIVEIRA³

¹Bolsista Iniciação Científica PIBIC/CNPq;

²PPGBiotec/UFAM;

³Orientador COTI/INPA.

INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas têm mostrado que microrganismos encontrados na cavidade bucal e intestinos apresentam habilidade de degradar a lactose (Di Cagno *et al.* 2001; Fernandez-Feo *et al.* 2013). Em derivados do leite, como nos queijos e iogurtes, também foram encontradas bactérias com essa capacidade (Gobbetti 2005), abrindo perspectivas positivas de se obterem, através de isolamentos, novos gêneros e espécies de bactérias com essa habilidade.

A falta de infraestrutura e conhecimento técnico na fabricação aliada à má fiscalização em estabelecimentos e pontos de comercialização tornam esses alimentos ricos em diversidade de microrganismos, alguns patogênicos (Loguercio e Aleixo 2001), mas também possíveis fontes de bioprodutos de valor econômico.

A utilização de microrganismos não patogênicos capazes de degradar a lactose pode ser uma alternativa para pessoas que possuem intolerância à lactose. Essa utilização pode ser: a) pelas suas ingestões no trato digestivo (digestório); b) usando suas enzimas como um complemento medicamentoso, junto com a alimentação; c) usando suas enzimas para degradarem a lactose em alimentos antes que sejam digeridos pelos seres humanos.

O objetivo dessa pesquisa visou isolar e classificar o potencial de degradação de bactérias oriundas de queijos e iogurtes a temperatura de 37°C, simulando a reação enzimática destas na temperatura corporal.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de bactérias de queijos e iogurtes capazes de degradar a lactose

Amostras de 1,0 g queijos e iogurtes foram colocadas em tubos contendo 9mL de solução salina e em seguida, 0,2 mL da suspensão foram espalhados com alça de Drigalski em placas contendo meio YMA (Vincent 1970), onde se substituiu o manitol pela lactose (1%). As placas foram colocadas em estufa a 37°C e analisadas a cada 24 horas procurando-se selecionar as bactérias capazes de crescerem nesse meio.

Capacidade de crescimento dos isolados usando lactose como fonte de carbono

Cada um dos isolados selecionados foi estriado nas placas contendo meio com lactose, com quatro repetições, usando o método de Oliveira e Magalhães (1999) para as avaliações. Esse processo de avaliação consiste na atribuição de notas de 1,00 (sem crescimento visível na zona 1) a 4,00 (máximo crescimento até a zona 4) (Figura 1). A Figura 2 apresenta o sistema de pontuações de crescimento, atribuindo-se notas intermediárias, subdivididas em 0,25, ou seja, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00, etc., até 4,00.

Consideraram-se como os de melhores crescimentos, os que apresentaram notas médias acima de 3,06 (Tabela 1).

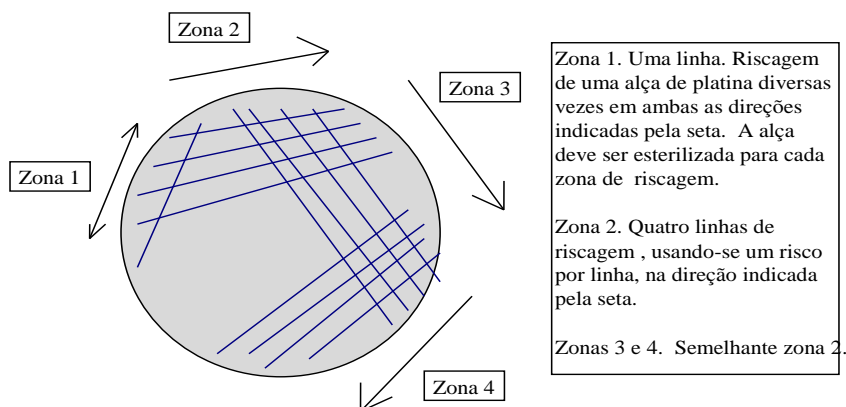


Figura 1. Método de avaliação do crescimento bacteriano segundo Oliveira e Magalhães (1999).

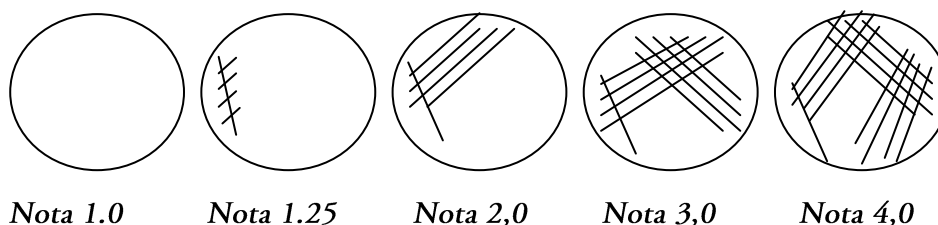


Figura 2. Pontuações (notas) aplicadas para o crescimento das bactérias segundo Oliveira e Magalhães (1999).

Tabela 1. Faixas de pontuação para avaliação do crescimento das bactérias.

Grau de crescimento	Faixa de pontuação
Baixo	1,00 – 2,00
Médio	2,06* - 3,00
Alto	3,06** - 4,00

* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25. ** Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25 (Oliveira e Magalhães 1999).

Caracterização morfológica dos isolados

Os isolados que foram positivos para a quebra da lactose foram caracterizados quanto à morfologia celular (Coloração de Gram) e colonial. A caracterização colonial foi realizada segundo as metodologias de Vincent (1970) e Malajovich (2015). Foi avaliado cada um dos isolados em meio sólido como: bactérias de crescimento lento (quatro a dez dias) e rápido (até três dias) e forma da colônia (circular ou irregular), borda (inteira ou irregular), transparência, coloração e consistência do muco (pastosa, aquosa ou viscosa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 52 bactérias de 25 tipos de queijos e iogurtes comercializados em supermercados e feiras de Manaus, utilizando meio de cultura ágar-lactose na temperatura de 37°C, sendo nomeados de acordo com a ordem de isolamento (Tabela 2).

Tabela 2. Isolamento das bactérias e suas origens.

Queijos e Iogurtes	Bactérias	Queijos e Iogurtes	Bactérias
1-Queijo Branco	1	14-Queijo artesanal de Búfalo	14.1, 14.2
2-Mini Babybel	2.1, 2.2 ,2.3	15-Queijo Artesanal Coroado	15.1, 15.2
3-Merci Chef	3	16-Polenguinho light	16.1, 16.2
4-Titolez	4	17-Nestlé- Morango	17.1, 17.2
5-Chandliche	5.1, 5.2	18-Nestlé-Consistência Cremosa	18
6-Levitare	6.1, 6.2.1, 6.2.2, 6.3.1	19- Nestlé Grego	19.1, 19.2
7-Serrabella	7	20-Nestlé Tradicional	20
8-Produto da casa	8.1, 8.2	21-Queijo 1	21.1, 21.2.1, 21.2.2
9- Não identificado	9.1, 9.2, 9.3	22-Coalhada Rio Preto da Eva	22.1, 22.2, 22.3, 22.4
10- Não identificado	10	23-Queijo Rio Preto da Eva	23.1, 23.2, 23.3
11- Não identificado	11.1, 11.2	24-Queijo com fungo	24.1, 24.2
12-Queijo artesanal amarelo	12.1, 12.2	25-Queijo 2	25.1, 25.2, 25.3
13-Queijo artesanal branco	13.1, 13.2.1		
Total			52

Capacidade de crescimento destes isolados usando lactose como fonte de carbono.

No teste de Oliveira e Magalhães (1999), observou-se que das bactérias isoladas, apenas 7 apresentaram nota 1 (sem crescimento visível), destas, 4 são oriundas de iogurtes.

As demais bactérias apresentaram média de crescimento igual ou acima de 3,06, ou seja, são de crescimento rápido, tornando-se assim, possíveis de serem utilizadas para a produção de medicamentos e alimentos para pessoas intolerantes à lactose.

As bactérias lácticas são essencialmente mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de crescerem num intervalo de temperaturas de 5 a 45°C (Naidu e Clemens 2000), sendo assim, a escolha da temperatura foi propícia para a ação degradante destas bactérias.

Caracterização morfológica dos isolados

O estudo das características culturais das bactérias diz respeito à avaliação do aspecto macroscópico das colônias em diferentes meios de cultura. Este estudo é um dos primeiros critérios para identificação de uma espécie bacteriana (Freitas *et. al.* 2012). A caracterização morfológica foi realizada apenas nos isolados que mostraram crescimento alto utilizando lactose como fonte de carbono. Neste teste, observou-se que há diferenças de caracterização fenotípica das colônias bacterianas; porém, constatou-se que a maioria possui elevação ondulada, borda e estrutura lisa, brilho opaco, aspecto úmido e coloração branca, cor do leite.

Foi feita a coloração de Gram das 20 bactérias que apresentaram melhor potencial de degradação. As bactérias ácido-láticas constituem um grupo de micro-organismos gram-positivos comumente utilizados na indústria de laticínios na elaboração de produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (Madeira *et al.* 2003), porém podem apresentar colônias gram-negativas devido o tipo de armazenamento (refrigeração). Dos 20 isolados selecionados 14 apresentaram coloração rosa (gram-negativa) e 6 coloração violeta (gram-positiva), sendo todas do tipo cocos. O maior número de gram-negativas apresentadas no trabalho devem-se a refrigeração do queijo e iogurte antes da coleta da amostra. Na Figura 3, tem-se exemplos de duas bactérias sendo uma gram-positiva (a) e outra gram-negativa (b).

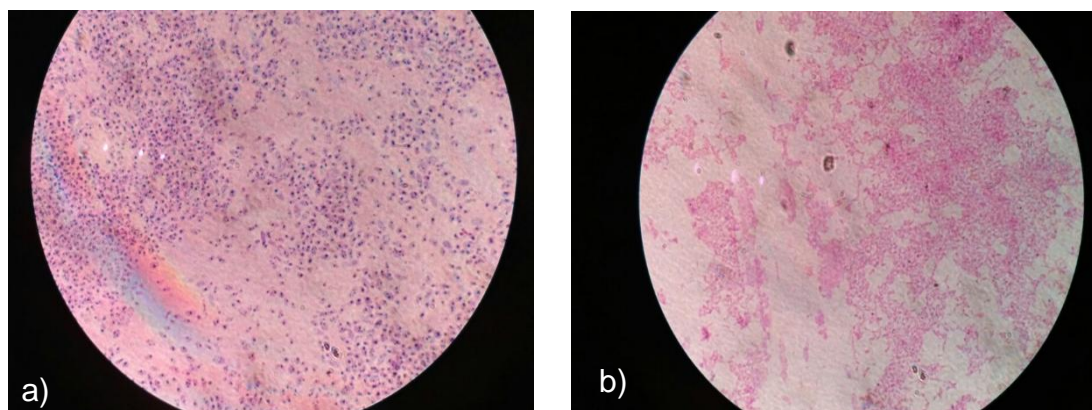


Figura 3. Fotos de duas bactérias. a) Bactéria com coloração violeta, caracterizando-se como gram-positiva (Bactéria 21.2.1). b) Bactéria com coloração rosa, caracterizando-se como gram-negativa (Bactéria 13.2.1)

CONCLUSÃO

Foram encontradas 52 bactérias diferentes nas amostras de queijos e iogurtes analisadas.

Do total das 52 bactérias isoladas, 45 apresentaram crescimento elevado no meio de cultura contendo lactose como fonte de carbono.

Das 20 bactérias selecionadas, 6 são gram-positivas e 14 gram-negativas.

REFERÊNCIAS

- Di Cagno, R.; De Angelis, M.; Lavermicocca, P.; De Vincenzi, M.; Giovannini, C.; Faccia, M.; Gobbetti, M. 2001. Proteolysis by Sourdough Lactic Acid Bacteria: Effects on Wheat Flour Protein Fractions and Gliadin Peptides Involved in Human Cereal Intolerance. *American Society for Microbiology*, 68(2).
- Fernandez-Feo, M.; Wei, G.; Blumenkranz, G.; Dewhirst, F.E.; Schuppan, D.; Oppenheim, F.; Helmerhorst, E.J. 2013. The Cultivable Human Oral Gluten-Degrading Microbiome and its Potential Implications in Celiac Disease and Gluten Sensitivity. *Clin Microbiol Infect*, 19(9): 386-394.
- Gobbetti, M.; De Angelis, M.; Corsetti, A.; Di Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 57-69.
- Loguercio, A.P.; Aleixo, J.A.G. 2001. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, 31(6): 1063-1067.
- Madera *et al.* 2003. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *International Journal of Food Microbiology*, 86(3): 213-222. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503000424>). Acesso em: 27/03/2016.
- Malajovich, M.A. 2015. (www.bteduc.bio.br/guias/58_Caracterizacao_morfologica_de_colonias_microbianas.pdf). Acesso em 06/10/2015.
- Naidu, A.S.; Clemens, R.A. 2000. Probiotics: natural food antimicrobial systems. *Boca Raton, CRC*: 431-462.
- Oliveira, L.A.; Magalhães, H.P. 1999. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30: 203-208.
- Vincent, J.M. 1970. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook, 15. London). 164 p.