UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATIVIDADE DA β-GALACTOSIDASE COMO PARÂMETRO QUANTITATIVO NA AVALIAÇÃO DA AUTÓLISE CELULAR DE *Lactobacillus helveticus*.

Analice Cláudia de Azevedo

Daise Aparecida Rossi

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Dezembro- 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATIVIDADE DA β-GALACTOSIDASE COMO PARÂMETRO QUANTITATIVO NA AVALIAÇÃO DA AUTÓLISE CELULAR DE *Lactobacillus helveticus*.

Analice Cláudia de Azevedo

Aprovado Pela Banca Examinadora em 3/12/04 Nota 100

Daise Aparecida Rossi

Jupyracyara Jandyra de Carvalho Barros

Cláudia Ribeiro Borges

Uberlândia, 03 de dezembro de 2004

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela felicidade de encontrar tantas pessoas amigas durante a realização deste trabalho. À minha mãe que é minha força, meu exemplo e esteve mesmo sem saber sempre presente neste projeto.Também à minha família pela ajuda incondicional. À minha amiga e co-orientadora Jupys pela cumplicidade; pelos conhecimentos, que não foram poucos e pela oportunidade de conhecer a Família Carvalho Barros, tão importantes na conclusão do trabalho. Agradeço a Daise minha orientadora pela oportunidade e atenção.Aos colegas do LABIO em especial às amigas Francesca, Renatinha, Liliane e Cristiane Moreira pelos momentos de felicidade. Aos amigos e funcionários da UFU, Sônia, Hugney, Odécio, Ronaldo e José Maria pela amizade e ajuda. Agradeço também às amigas Fafá, Antoniete e Luciana pelo carinho e paciência.

RESUMO

No Brasil, devido aos altos custos da maturação de queijos, uma alternativa, seria a adoção de fermentos autolíticos de microrganismos, como o *Lactobacillus helveticus*, em substituição a culturas tradicionais ou como aceleradores da maturação de queijos . Esse microrganismo é a espécie predominante em soro-fermento natural de laticínios brasileiros, destacando-se por sua característica autolítica e outras aptidões tecnológicas de interesse. Considerando a importância do estudo *in vivo* das cepas de *L. helveticus* para a elaboração de fermento, este trabalho teve como objetivo mensurar a intensidade da autólise desses microrganismos isolados de soro-fermento natural a partir da atividade da enzima β-galactosidase. Foram utilizadas 5 cepas de *Lactobacillus helveticus* endógenas e 2 cepas comerciais, que foram repicadas em caldo Man Rogosa Sharp (MRS) e incubadas a 37 °C/24horas. Posteriormente, 1% das culturas (DO_{650nm} 1.0) foi inoculada em 100 mL de caldo MRS e mantida nessa mesma temperatura por 48 horas. A cada 6 horas, alíquotas eram retiradas para mensurar o crescimento microbiano, atividade autolítica e abaixamento do pH. as características das cepas comerciais Cc1, Cc2 e cepas endógenas A, D_1, D_3, E_4 e E_5 foram mantidas mesmo após sucessivos repiques.O monitoramento do crescimento microbiano foi capaz de classificar o caráter autolítico de todas as cepas estudas em autolíticas; Cc_1 e E_5; intermediárias; A e D_1 e não autolíticas; Cc_2, D_3, E_2. A análise da atividade enzimática da β-galactosidase permitiu confirmar o perfil autolítico da cepa comercial Cc_1 e E_5, portanto, pode empregada como parâmetro quantitativo da lise celular.

Palavras-chave: *Lactobacillus helveticus*,autólise e β-galactosidase

Abstract

In Brazil, which had to the high costs of the maturation of cheeses, an alternative, would be the adoption of autolíticos fermentos of microrganismos, as the *Lactobacillus helveticus*, in substitution the traditional cultures or as accelerating of the maturation of cheeses. This microrganismo is the predominant species in serum-leavens natural of Brazilian laticínios, being distinguished for its autolítica characteristic and other technological aptitudes of interest. Considering the importance of the alive study in of cepas of L. helveticus for the elaboration of I leaven, this work had as objective mensurar the intensity of autólise of these isolated microrganismos of serum-I leaven natural from the activity of the enzyme β-galactosidase. *Lactobacillus Helveticus* endogenous and 2 had been used 5 strains of commercial, that they had been in broth Man Rogosa Sharp (MRS) and the 37 °C/24hs. Later, 1% of the cultures (DO650nm 1,0) were inoculated in 100 mL of broth MRS and kept in this same temperature for 48 hours. To each 6 hours, aliquot were removed to mensurar the microbiano growth, autolítica activity and abaixamento of pH. the commercial characteristics of cepas Cc1, endogenous Cc2 and cepas, exactly after successive D1, D3, E4 and E5 had been kept repiques.O monitoramento of the microbiano growth were capable to classify the autolítico character of all cepas study in autolíticas; Cc1 and E5; intermediate; And the D1 and not autolíticas; Cc2, D3, E2. The analysis of the enzymatic activity of?-galactosidase allowed to confirm the autolítico profile of cepa commercial Cc1 and E5, therefore, can used as quantitative parameter of lise cellular.

Keywords: *Lactobacillus helveticus*, autolysis and β-galactosidase

1. INTRODUÇÃO

Na tecnologia de queijos o emprego de fermento lático autolítico e autolisado representa um importante impacto na maturação desses produtos. O primeiro é composto por células em que a autólise se processa espontaneamente; o segundo é constituído por cepas previamente submetidas ao tratamento com sais, choques térmicos e/ou pressurização (HANNON et al., 2003; O'REILLY et al., 2002). Ambos aceleram a maturação em queijos, pois durante a lise endoenzimas são liberadas, podendo atuar mais rápido e facilmente sobre o substrato, sem necessitar do crescimento dos microrganismos (FOX; LAW, 1991; LAW, 2001; O'REILLY et al., 2002).

Segundo Hannon et al. (2003), os *Lactobacillus helveticus* destacam-se entre as demais cepas homofermentativas, pois possuem um forte sistema enzimático, em qual estão presentes a β-galactosidase e a lactato desidrogenase (LDH). Essas são liberadas durante a autólise e agem ativamente na conversão da lactose. A β-galactosidase hidrolisa esse dissacarídeo à glicose e galactose, enquanto a LDH catalisa a reação de oxidação do piruvato a lactato. O desdobramento da lactose a ácido lático por *Lactobacillus helveticus* acarreta a diminuição do pH, facilita a ação do coalho, inibe a multiplicação da microbiota indesejável, auxilia na expulsão do soro e atua na maturação (FORTINA et al. 2003; OZKAYA et al. 2001).

Diversos estudos têm sido realizados com intuito de verificar o caráter autolítico das células bacterianas (CAPPA; BOTAZZI, 1996; CARVALHO, 1994; KEMPER; DOYLE, 1993; ROSSI, 2001). Esses trabalhos tiveram como respaldo a análise gráfica do crescimento microbiano. Os autores consideraram que a rápida passagem da fase estacionária para a fase de declínio, seguida de alterações na parede celular designava essas bactérias como autolíticas. No entanto, esses métodos não foram efetivos para verificar a intensidade da lise celular.

O aumento gradativo ou abrupto dos níveis de β-galactosidase no meio extracelular é diretamente proporcional à atividade autolítica das bactérias láticas (MONTANARI et al., 2000; ZÁRATE et al., 1999). Portanto, conforme sugerido por Montanari et al. (2000) detectar os níveis dessa enzima implica em quantificar o processo autolítico.

Em trabalhos desenvolvidos por Hébert et al. (2000) e Montanari et al., (2000) a atividade autolítica foi mensurada a partir da hidrólise do complexo *o*-nitrophenil galactopiranosídeo (ONPG) pela ação da enzima β-galactosidase. O produto formado, *o*-

nitrophenol (ONP), é detectável ao comprimento de onda a 420nm (DO_{420nm}), permitindo correlacionar a quantidade de enzima no meio, pois cada 1 unidade da enzima é equivalente a 1 mol de ONP liberado/minuto/mL da amostra (HÉBERT et al., 2000; MONTANARI et al., 2000; ZÁRATE et al., 1999).

Durante a hidrólise da lactose, são liberadas na mesma proporção galactose e glicose. A partir desse princípio, dosando a glicose por meio de leitura colorimétrica, é possível determinar a atividade da enzima β-galactosidase (RIBEIRO et al.,1998)

A aceleração da maturação de queijos suíços foi constatada por Valence et al. (2000) quando empregado *L. helveticus* autolíticos na fabricação desses produtos. Essa característica somada ao notório desempenho dessa espécie na tecnologia de produtos lácteos revela a necessidade de investigar o caráter autolítico desses microrganismos. Portanto, esse trabalho possui como objetivo mensurar a intensidade da autólise em *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento natural a partir da atividade da enzima β-galactosidase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 5 cepas de *Lactobacillus helveticus* endógenas, previamente isoladas, identificadas e caracterizadas por Rossi (2001) e 2 cepas comerciais da mesma espécie (controle). As cepas endógenas A, D_1, D_3, E_4 e E_5; e as cepas comerciais Cc_1 e Cc_2, foram descongeladas, repicadas (1%) por três vezes em caldo Man Rogosa Sharp (MRS) e incubadas a 37 °C/24horas. Posteriormente, 1% das culturas (DO_{650nm} 1.0) foi inoculada em 100 mL de caldo MRS e mantida nessa mesma temperatura por 48 horas. A cada 6 horas, alíquotas eram retiradas para mensurar o crescimento microbiano, atividade autolítica e abaixamento do pH.

O crescimento microbiano foi determinado conforme sugerido por Montanari et al. (2000) e Zárate et al. (1999). Foram realizadas leituras a 650nm (DO_{650nm}) e o resultado utilizado na análise gráfica Tempo(horas)xDO_{650nm}.

A autólise celular foi mensurada a partir do monitoramento da β-galactosidase utilizando o kit GLICOSE PAP Liquiform - Labtest Diagnóstica® (RIBEIRO et al., 2002). Os índices de glicose foram determinados por leitura espectrofotométrica a 520nm (DO_{520nm}) e a concentração obtida pela curva de regressão linear.

O pH do meio foi mensurado com auxílio do pHmetro digital previamente calibrado.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (SAMPAIO, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do crescimento microbiano demonstraram similaridade aos encontrados por Rossi (2001). Assim, as cepas Cc_1 e E_5 foram caracterizadas como autolíticas (Figura 1a); A e D_1 como intermediárias (Figura 1b) e Cc_2, D_3, E_2 identificadas como não autolíticas (Figura 1c).

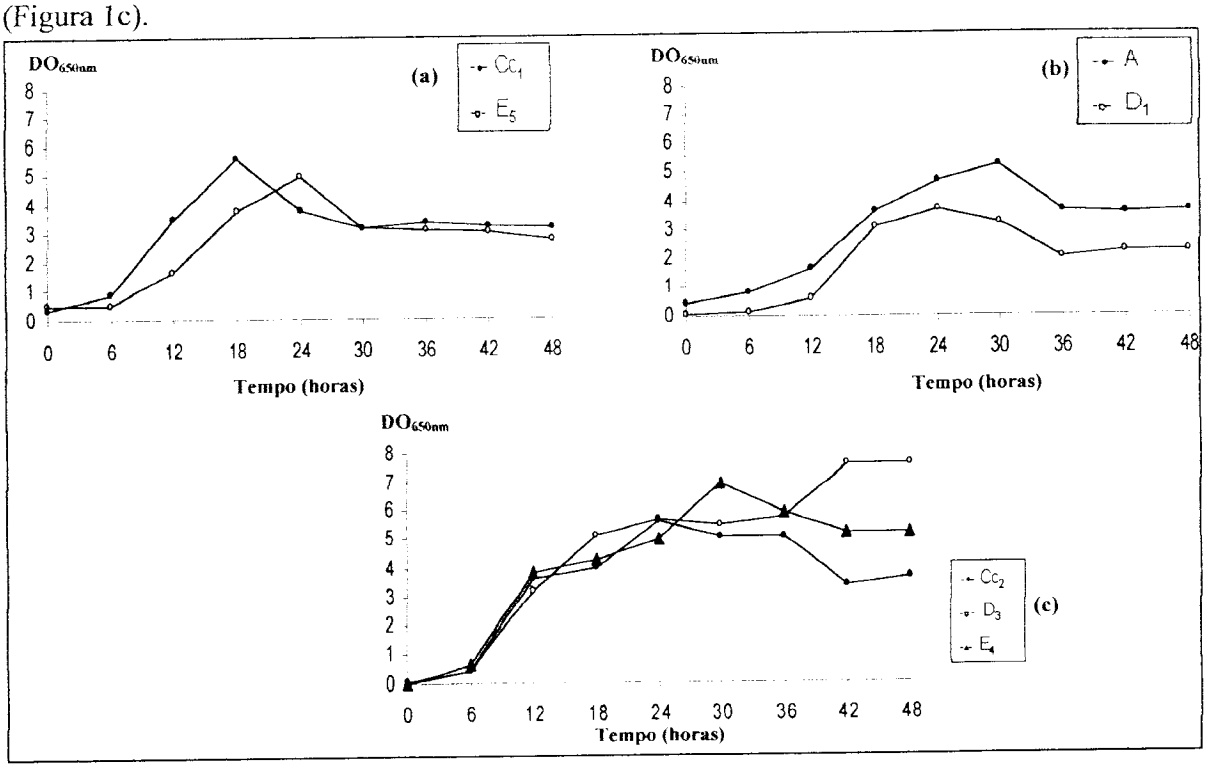

Figura 1. Monitoramento do crescimento microbiano de cepas de *Lactobacillus helveticus*. (a) cepas com caráter autolítico, (b) cepas com caráter autolítico intermediário, (c) cepas com caráter não autolítico.

A queda abrupta da densidade óptica das cepas Cc_1 e E_5 permitiu classificá-las em autolíticas (CAPPA; BOTAZZI, 1996; CARVALHO, 1994; KEMPER; DOYLE, 1993; ROSSI, 2001). Esses microrganismos, assim como as cepas não autolíticas, atingiram a fase exponencial no tempo máximo de 6 horas. No entanto, foi observado crescimento contínuo somente para as cepas não autolíticas, em quais, mesmo após 36 horas, era verificado um aumento da densidade óptica. Na indústria laticinista, essa característica pode dificultar a padronização dos produtos, pois o crescimento prolongado pode acarretar, dentre outros fatores, acidez indesejável, devido à elevada produção de ácido lático (FURTADO,1997).

No monitoramento da intensidade autolítica, foi utilizado como limite de detecção o tempo de 24 horas (T_{24}), que corresponde à leitura imediatamente após o valor máximo de desenvolvimento da cepa comercial autolítica. Conforme observado na tabela 1, os maiores índices de atividade autolítica foram observados para a cepa comercial Cc_1 e cepa endógena E_5, com diferença estatística significante entre essas espécies ($p<0,05$).

Tabela. Monitoramento da intensidade autolítica de *Lactobacillus helveticus* a partir da determinação da atividade da β-galactosidase*.

Cepas	T_0	T_6	T_{12}	T_{18}	T_{24}
Cc_1	$0,093535^a$	$0,368921^a$	$0,721432^a$	$1,989994^a$	$2,926704^a$
Cc_2	$0,001209^d$	$0,155204^d$	$0,532137^d$	$0,842924^c$	$0,677081^c$
A	$0,067638^b$	$0,08448^e$	$0,594835^c$	$0,676623^d$	$0,742843^c$
D_1	$0,004639^d$	$0,280604^b$	$0,509552^e$	$0,641045^d$	$0,787453^c$
D_3	$0,044859^c$	$0,049685^f$	$0,4483^f$	$0,559911^e$	$0,746297^c$
E_4	$0,050397^c$	$0,257406^c$	$0,59799^c$	$0,659152^d$	$0,772653^c$
E_5	$0,06726^b$	$0,288893^b$	$0,65254^b$	$1,850423^b$	$1,130068^b$

*Média de 3 repetições.
a,b...Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$)
T-tempo em horas.

Ribeiro et al. (2002) e Martini et al. (1987) concordam que a partir de 40 °C e pH inferior a 6,0 podem afetar a estabilidade da enzima β-galactosidase. Considerando o poder acidificante da espécie *L. helveticus* e pretendendo aumentar a confiabilidade da análise realizada, leituras superiores ao tempo de 24 horas foram desprezadas, pois, após esse período, o pH do meio, para todas as culturas, apresentaram índices inferiores a 4,5, fato que poderia mascarar resultados reais referentes a intensidade autolítica.

No tempo de 24 horas as cepas não autolíticas e intemediárias não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$). Esses resultados eram esperados, pois nessa fase, a análise gráfica revelou crescimento contínuo dessas culturas. Convém mencionar que, em 24 horas, a redução máxima do pH foi de 4,5 e 4,6, para as cepas não autolíticas e intermediárias, respectivamente. O contrário foi observado nas cepas autolíticas, que nesse mesmo intervalo apresentaram um valor médio de 3,5.

4. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que:

- as características das cepas comerciais Cc1, Cc2 e cepas endógenas A, D_1, D_3, E_4 e E_5 foram mantidas mesmo após sucessivos repiques;

- o monitoramento do crescimento microbiano foi capaz de classificar o caráter autolítico de todas as cepas estudas em autolíticas; Cc_1 e E_5; intermediárias; A e D_1 e não autolíticas; Cc_2, D_3, E_2;

- a análise da atividade enzimática da β-galactosidase permitiu confirmar o perfil autolítico da cepa comercial Cc_1 e E_5, portanto, pode empregada como parâmetro quantitativo da lise celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPPA, F.; BOTAZZI, V. Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus casei subsp. casei* 1 St 261. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia.** v.46, n.2, p.299-310, 1996.

CARVALHO, A.F. **Systématique des bactéries propioniques laitèires: classification, nomenclature et identification.** Rennes, ENSA, 227p., 1994. (Tese Doutorado).

FOX, P.F.; LAW, J. Enzimology of cheese Ripening. **Food Biotechnology.** v.5, n.3, p.239-262, 1991

HANNON, J. A.; WILKINSON, M. G.; C. DELAHUNTY, M.; WALLACE, J. M.; MORRISSEY, P. A. BERESFORD, T. P. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. **International Dairy Journal.** v. 13, Issue 4, p.313-323, 2003.

KEMPER, M. A.; DOYLE, R. J. **The cell wall of *Bacillus subtilis* is protonated during growth . In: Dans Bacterial growth an lysis.** New York: Plenum Press, p.245-252, 1993

LAW, B.A., Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. **International Dairy Journal.** v. 4–7, n. 11, p.383–398, 2001.

MARTINI, M. C.;BOLLWEG, G.L.; LEVITT, M. D.;SAVAIANO, D.A.Lactose digestion by yogurt beta-galactosidase:influence o pH and microbial cell integrity.**American Journal of Clinical Nutrition.** v. 45, p. 432-436, 1987

MONTANARI G.;ZAMBONELLI, C; GRAZIA, L.; BENEVELLI, M.; CHIAVARI, C. Realease of β-galactosidase from Lactobacilli. **Food Technol.Bioetechnol.** v.38, p.129-133, 2000.

O'REILLY, C. E.; O'CONNOR, P. M.; MHUPHY, P. M.; KELLY, A. L.; BERESFORD, T. P. Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria an proteolysis in Cheddar cheese. **International Dairy Journal.** v.12, p.915-922, 2002.

OZKAYA, D. F.;XANTHOPOULOS, V.;TUNAIL, N.; TSANETAKI, L. E.Technologically important properties of lactic acid bactéria isolates from Beyaz cheese made from raw ews'milk. **Journal of Applied Microbiology.** v. 91, p.861-870, 2001

VALENCE, F.; DEUSTSCH, S.M.; RICHOUX, R.; GAGNAIRE, V.; LORTAL, S. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Dairy Research.** Cambridge, v. 67, n. 2, p. 261-71, May, 2000.

RIBEIRO, E. J.; LEITE, M. T.; EIRAS, S. P.; ARAÚJO, E. J.; RIBEIRO U. H. Esterificação de ácidos graxos catalisada por lipase. **Revista Ciência & Engenharia.** v. 2, p. 41-44, 1998.

ROSSI, D A. **Isolamento, identificação e caracterização da biodiversidade de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento de laticínios brasileiros.** Lavras: UFLA, 99p., 2001. (Tese-Doutorado em Ciência dos Alimentos).

SAMPAIO, I. B. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia , p.221,1998.