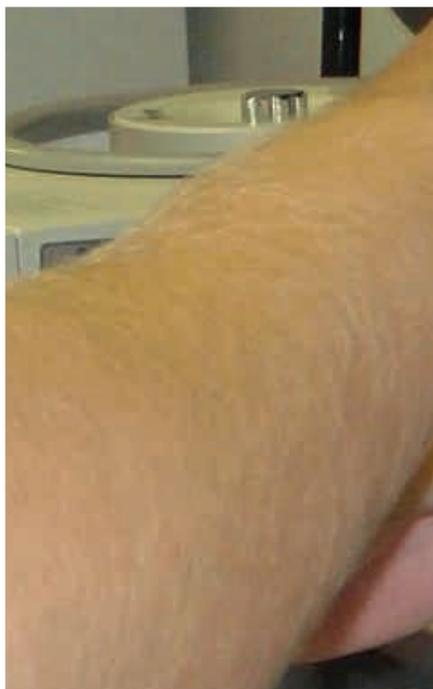


**Bactérias lácticas com aptidão tecnológica:
recomendações para triagem e
seleção pela atividade proteolítica**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
17**

**Bactérias lácticas com aptidão tecnológica:
recomendações para triagem e
seleção pela atividade proteolítica**

*Hévila Oliveira Salles
Karina Maria Olbrich dos Santos
Ana Márjory Paiva Sousa
Samuel Carneiro de Barcelos
Adriano Rodrigues Lima
Antônio Silvio do Egito*

**Embrapa Caprinos e Ovinos
Sobral, CE
2021**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos
Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/
Groaíras, Km 4 Caixa Postal: 71
CEP: 62010-970 - Sobral, CE
Fone: (88) 3112-7400
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Caprinos e Ovinos

Presidente
Cícero Cartaxo de Lucena

Secretário-Executivo
Alexandre César Silva Marinho

Membros
Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Carlos José Mendes Vasconcelos, Fábio Mendonça Diniz, Máira Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Marcos André Cordeiro Lopes, Tânia Maria Chaves Campêlo, Zenildo Ferreira Holanda Filho

Supervisão editorial
Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto
Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica
Tânia Maria Chaves Campêlo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Máira Vergne Dias

Foto da capa
Hévilá Oliveira Salles

1ª edição
On-line (2021)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Caprinos e Ovinos

B131 Bactérias lácticas com aptidão tecnológica: recomendações para triagem e seleção pela atividade proteolítica / Hévilá Oliveira Salles... [et al.]. – Sobral : Embrapa Caprinos e Ovinos, 2021.

PDF (23 p) : il. color. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Caprinos e Ovinos, ISSN 0101-6008; 17).

1. Alimentos funcionais. 2. Probióticos. 3. *Lacticaseibacillus Rhamnosus*. 3. Proteína. 4. Leite. I. Salles, Hévilá Oliveira. II. Santos, Karina Maria Olbrich. III. Sousa, Ana Márjory Paiva. IV. Barcelos, Samuel Carneiro de. V. Lima, Adriano Rodrigues. VI. Egito, Antônio Silvío do. VII. Embrapa Caprinos e Ovinos. VII. Série.

CDD (21.ed.) 664.07

Sumário

Introdução.....	8
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	13
Conclusões.....	21
Agradecimentos.....	21
Referências	21

Bactérias lácticas com aptidão tecnológica: recomendações para triagem e seleção pela atividade proteolítica

Hévila Oliveira Salles¹

Karina Maria Olbrich dos Santos²

Ana Márjory Paiva Sousa³

Samuel Carneiro de Barcelos⁴

Adriano Rodrigues Lima⁵

Antônio Silvio do Egito⁶

Resumo: Os probióticos são culturas de micro-organismos que, quando utilizadas por animais ou pelo homem, trazem benefícios à saúde promovendo melhora nas características da microflora intestinal natural em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. Probióticos com atividade proteolítica podem gerar peptídeos com propriedades funcionais e tecnológicas permitindo a criação de novos produtos. O método o-ftaldialdeído (OPA) é a técnica padrão utilizada para seleção de micro-organismos com essa habilidade. O presente trabalho objetivou caracterizar o perfil proteolítico de isolados de *Lactocaseibacillus rhamnosus* por diferentes metodologias e indicar uma es-

¹ Médica-veterinária, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

² Engenheira de alimentos, doutora em Ciência da Nutrição, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

³ Bióloga, doutora em Biotecnologia, sócia-proprietária Empresa Agreenvir Indústria de Adubos Ltda., Sobral, CE.

⁴ Tecnólogo de alimentos, mestre em Tecnologia de Alimentos, estudante de doutorado em Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

⁵ Estatístico, especialista em Matemática Financeira e Estatística, analista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

⁶ Médico-veterinário e farmacêutico, doutor em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Núcleo Nordeste, Campina Grande, PB.

tratégia para realizar a triagem e a seleção de cepas com potencial proteolítico de uma forma rápida e eficaz. Diante da alta correlação da técnica do OPA com o pH, esse último pode ser utilizado como uma medida indireta de atividade proteolítica para uma triagem rápida de cepas com potencial proteolítico, para posterior refinamento com o método OPA. A partir do conjunto de dados obtidos com as diferentes formas de expressar o resultado de atividade proteolítica pelo método OPA, a atividade específica (U/mg de proteína) se mostrou mais eficaz para seleção de cepas, ao associar dois parâmetros importantes para sua obtenção, ou seja, a quantidade de peptídeos gerados após degradação de substrato proteico sob a quantidade de substrato proteico residual. Dessa forma, através da atividade específica as cepas selecionadas como mais proteolíticas geram mais peptídeos ao degradarem o máximo de substrato proteico durante a fermentação láctica

Palavras-chave: *Lactocaseibacillus rhamnosus*, probiótico, proteína, leite.

Lactic bacteria with technological ability: recommendations for screening and selection for proteolytic activity

Abstract: Probiotics are cultures of microorganisms that, when used by animals or humans, bring health benefits by improving the characteristics of the natural intestinal microflora at the expense of the proliferation of harmful bacteria, supporting the host's natural defense mechanisms. Probiotics with proteolytic activity can generate peptides with functional and technological properties allowing the creation of new products. The o-phthaldialdehyde (OPA) method is the standard technique used to select microorganisms with this ability. The present work aimed to characterize the proteolytic profile of *Lactocaseibacillus rhamnosus* isolates by different methodologies and to indicate a strategy to carry out the screening and selection of strains with proteolytic potential in a fast and efficient way. From the set of data obtained with the different ways of expressing the result of proteolytic activity, the specific activity (U/mg of protein) proved to be more effective for strain selection, by associating two important parameters for its obtainment, that is, the number of peptides generated after protein substrate degradation under the amount of residual protein substrate. Thus, through the specific activity, the strains selected as more proteolytic generate more peptides by degrading the maximum amount of protein substrate during lactic fermentation.

Keywords: *Lactocaseibacillus rhamnosus*, probiotic, protein, milk.

Introdução

A busca por produtos que tragam benefícios ao ser humano por meio da alimentação impulsionou o crescimento dos alimentos funcionais. Stanton et al. (2001) destacaram a linha de produtos com probióticos como um forte nicho de mercado. Raud (2008) destacou que os alimentos funcionais estavam deixando de ser um nicho de mercado para se transformarem uma nova fronteira do mercado de alimentos. Mais recentemente, Nataraj et al. (2020) apontam os parabióticos e pós-bióticos como os novos horizontes de alimentos funcionais.

Conforme a Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) e World Health Organization (WHO), os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro para além da nutrição básica, (Probiotics..., 2006). Os parabióticos são definidos como o conjunto de bactérias não viáveis (intactas ou rompidas) e os pós-bióticos as biomoléculas derivadas dos organismos probióticos, ou seja, a complexa mistura de produtos metabólitos secretados por probióticos em sobrenadantes livres de células, como enzimas, proteínas, ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas, biossurfatantes, aminoácidos, peptídeos, ácidos orgânicos, dentre outros (Nataraj et al., 2020).

Os probióticos mais comumente estudados e utilizados como suplementos em alimentos são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, habitantes naturais do cólon humano. Estas bactérias atuam melhorando o equilíbrio da microflora intestinal, estimulando a multiplicação de bactérias benéficas em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro contra patógenos, trazendo benefício à saúde humana (Wang et al., 2004; Juntunen et al., 2001).

A reclassificação do gênero *Lactobacillus* foi proposta por Zheng et al. (2020), com base no estudo taxonômico de *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* com apoio em sequências do genoma completo. Foram propostos vinte e cinco gêneros, incluindo o gênero emendado *Lactobacillus*, que inclui organismos adaptados ao hospedeiro que foram referidos como o grupo *Lactobacillus delbrueckii* e outros como *Lactocaseibacillus*, *Lactiplantibacillus* e *Limosilactobacillus*. Os autores também propuseram

ajustar a descrição da família *Lactobacillaceae* para acrescentar todos os gêneros que foram incluídos anteriormente nas famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. O termo genérico “lactobacilos” foi mantido para designar todos os organismos que foram classificados como *Lactobacillaceae*.

O gênero *Lacticaseibacillus* pertence ao grande grupo de bactérias lácticas (BAL) que são organismos Gram-positivos, produzem ácido láctico por fermentação e têm capacidade de colonizar uma variedade de habitats como uma consequência direta da ampla versatilidade metabólica. Como exemplo, as BAL têm sido usadas há décadas na preservação de alimentos, como iniciadores para produtos lácteos, vegetais fermentados, peixes e salsichas, bem como inoculantes de silagem (Giraffa et al., 2010).

As BAL quando utilizadas na produção de derivados lácteos, têm seu crescimento dependente da quantidade de aminoácidos livres e peptídeos de baixa massa molecular no meio, mas como as concentrações desses compostos são baixas, a presença de um sistema proteolítico funcional é de grande importância (Brown et al., 2017). As BAL altamente proteolíticas apresentam várias aplicações como: melhoria da qualidade do queijo; aceleração do amadurecimento do queijo; desenvolvimento de sabor de queijo e quebra de hidrolisados proteico de sabor amargo (Takafuji et al., 1995). Em adição, durante a fermentação do leite por enzimas proteolíticas produzidas por várias BAL, peptídeos bioativos podem ser gerados com a hidrólise das proteínas (Donkor et al., 2007). Muitas propriedades funcionais têm sido associadas a esses peptídeos gerados pela hidrólise das proteínas do leite como: ação anti-hipertensiva, antimicrobiana, imunomoduladora, antioxidante, anti-inflamatória dentre outras (Brown et al., 2017). E essa funcionalidade dos peptídeos tem atraído interesse da indústria de alimentos, principalmente, por representar uma fonte de componentes com grande potencial para preparações nutracêuticas. Nesse contexto, a possibilidade de selecionar cepas de BAL com potencial proteolítico pode contribuir tanto para formulação de produtos lácteos que tragam efeitos benéficos à saúde, mas também gerar produtos comerciais com um alto valor agregado.

Dentre os *Lacticaseibacillus*, podemos destacar a espécie *L. rhamnosus*, que faz parte da flora intestinal saudável do homem (Gorbach, 2002). Seus benefícios em relação à prevenção de distúrbios intestinais são amplamente estudados, uma vez que promovem a defesa do hospedeiro reduzindo a sina-

lização para apoptose, bloqueiam a sinalização para inflamação, estimulam a maturação das barreiras no epitélio intestinal imaturo (Jakaitis; Denning, 2014), além de aumentar a resposta celular imune não específica (Ashraf; Shah, 2014). Em adição, ao ser comparado a outros micro-organismos probióticos, *L. rhamnosus* mostrou maior tolerância às condições do trato gastrintestinal e melhor sobrevivência, quando adicionado em alimentos funcionais (Landersjö et al., 2002).

Na busca por BAL potencialmente probióticas, dezenas de cepas são testadas nas rotinas dos laboratórios. Um procedimento comumente aceito para estimar a atividade das proteases é determinar a quantidade de material peptídico solúvel em ácido tricloroacético após a liberação dos peptídeos de um substrato proteico pela ação da enzima. Esses materiais peptídicos podem ser estimados pela medição da absorção de luz em 280 nm (Kunitz, 1947) ou, mais frequentemente, por ensaio espectrofotométrico de o-ftaldialdeído, o método OPA (Church et al., 1983).

Para as equipes que trabalham com essas cepas, seria interessante dispor de uma metodologia que possibilitasse o teste de um maior número de cepas simultaneamente, ou seja, que agilizasse a triagem de cepas potenciais probióticas. Em adição, técnicas que elevassem a eficácia da seleção pelo método OPA poderiam também contribuir para melhores escolhas.

Sabendo-se que a presença de alta atividade proteolítica permite que micro-organismos cresçam e produzam ácido e peptídeos mais rapidamente no leite, ocasionando uma maior aptidão tecnológica, o presente trabalho buscou um parâmetro que melhor representasse essa correlação para seleção de micro-organismos com potencial para produção de derivados lácteos. Nesse contexto, técnicas capazes de inferir direta ou indiretamente a atividade proteolítica de cepas de *L. rhamnosus* foram avaliadas e correlacionadas, assim como a forma de expressar o resultado de suas atividades proteolítica. Os parâmetros analisados foram: massa seca, concentração de proteína, concentração de peptídeos pelo método OPA e por absorbância a 280 nm, determinação de pH e atividade proteolítica específica.

Material e Métodos

Foram avaliadas dezesseis cepas de bactérias nativas isoladas de queijos tipo coalho bovino da Região do Jaguaribe, Ceará, Brasil, molecularmente identificadas como *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Lr) conforme metodologia descrita por dos Santos et al. (2015). O acesso ao patrimônio genético foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob protocolo SisGen A925322. Como controle positivo (C+) foi utilizada uma cepa comercial sabidamente proteolítica de *Lacticaseibacillus casei*. Cada cepa foi avaliada em triplicata. A avaliação consistiu no crescimento das bactérias em 5 mL de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Biolog), a 37 °C por 24h em estufa bacteriológica. Ao final da ativação, as bactérias foram lavadas três vezes com solução salina 0,15 M. Para induzir a produção de proteases, o pellet obtido após as lavagens foi dissolvido em 10 mL de leite em pó bovino desnatado a 10% (p.v-1) estéril (Leite). Em seguida, foi incubado a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica, juntamente com os controles positivo (C+) e negativo (C-), sendo este último o leite não fermentado, ou seja, leite em pó bovino desnatado a 10%, estéril, submetido ao ensaio sem bactéria. Ao término do cultivo foi determinado o pH do meio através do uso de um pHmetro (Jenway, Modelo 3510). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante separado do pellet para as análises.

Concentração de peptídeos no leite fermentado pelo método OPA

O ensaio foi realizado conforme descrito por Church et al. (1983) usando o reagente o-ftaldialdeído (OPA), com adaptações no volume das amostras, mas mantendo a proporção preconizada. Resumidamente, uma alíquota de 250 µL do sobrenadante obtido após centrifugação a 10.000 x g por 30 min a 4 °C, do leite fermentado a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica, foi misturada a 50 µL de água destilada acrescida de 500 µL de 0,75 N de ácido tricloroacético (TCA) e agitado em vórtex a 3000 rpm. Após 15 min à temperatura ambiente (\pm 24 °C), a mistura foi centrifugada a 13.000 x g durante 15 min, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Desse sobrenadante, 100 µL foram misturados a 2 mL de reagente OPA. Após dois minutos à temperatura

ambiente, a absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro em luz UV a 340 nm. A atividade proteolítica das cepas após fermentação no leite foi expressa como a absorbância (Abs) de grupos amino livres medidos a 340 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento de 0,001 de diferença em densidade óptica a 340 nm entre o leite fermentado e não fermentado (controle negativo ou C-), ou seja:

$$U = \frac{(\text{Abs a 340 nm do leite fermentado pela cepa}) - (\text{Abs a 340 nm do C-})}{0,001}$$

A atividade específica foi obtida a partir da divisão do valor de unidade de atividade proteolítica pela concentração de proteína (U/mg de proteína).

Concentração de proteínas

A concentração proteica foi estimada pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

Concentração de peptídeos no leite fermentado pela medida de absorbância a 280 nm

O método adotado foi o de Kunitz (1947) com modificações. Amostra de 100 µL do sobrenadante foi adicionada à 2 mL de ácido tricloacético a 10%. O sobrenadante obtido após centrifugação a 13.000 x g por 15 min foi lido em espectrofotômetro com luz UV a 280 nm.

Atividade proteolítica no leite fermentado por zimograma

Para avaliar a presença de enzimas proteolíticas extracelulares, 100 µg de proteína do sobrenadante foram submetidos a zimograma. Foi realizada análise por eletroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, como descrito por Laemmli (1970), contendo caseína a 0,1% como substrato proteico. Para renaturação das enzimas após a SDS-PAGE, os géis foram tratados com Triton-X 100 a 2,5% (2 x por 30 min cada), lavados com água grau Milli-Q e incubados a 37 °C por 48h em solução tampão, em diferentes faixas de pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8). Os tampões utilizados

foram: citrato-fosfato 0,1 M para pH 3, 4 e 5, e tampão fosfato 0,1 M para pH 6, 7 e 8. Os géis foram corados com azul de Coomassie G-250 (Neuhoff et al., 1985). A presença de bandas descoloridas nos géis indicou a presença de atividade proteolítica.

Determinação do crescimento celular

Os *pellets* obtidos após centrifugação do cultivo das cepas em leite em pó bovino desnatado a 10% e dos controlos do meio não incubado (Leite) e do meio não fermentado (C-) foram ressuspensos em 5 mL de água autoclavada, retiradas quatro alíquotas de 1 mL, transferidas para tubos previamente pesados, levados para estufa a 105 °C por 48h, e depois novamente pesados para determinar o crescimento celular baseado no peso da massa seca (g/mL).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à técnica multivariada de Análise de Componentes Principais (ACP), usada para analisar inter-relações entre um grande número de variáveis e explicar essas variáveis em termos de suas dimensões inerentes (Componentes). Como critério de retenção das componentes, baseou-se na regra do *eigenvalue* maior que 1 (Marôco, 2010). O software estatístico utilizado para as análises foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows, versão 21.0 (IBM Corp., 2012).

Resultados e Discussão

O cultivo de *L. rhamnosus* (Lr) em leite em pó bovino desnatado a 10% permitiu induzir proteases bacterianas e hidrolisar a proteína do leite.

As cepas foram organizadas na Figura 1 em ordem decrescente do valor de pH do meio após o cultivo, ou seja, da cepa que pouco alterou o pH no cultivo até a que produziu o pH mais baixo. Essa mesma ordem de pH foi utilizada para apresentar as cepas nos demais gráficos com os parâmetros avaliados.

Dentre os métodos que avaliam a atividade proteolítica diretamente, ou seja, o OPA e a leitura a 280 nm, o método OPA se mostrou mais confiável.

Na leitura a 280 nm o controle positivo (C+) ficou abaixo do controle negativo (C-), mostrando a falta de precisão desse método (Figura 1), o que pode ser também observado na Tabela 1 com a baixa correlação da leitura a 280 nm com todos os parâmetros analisados. A absorção a 280 nm se deve à presença de anéis aromáticos nos aminoácidos (Zaia et al., 1998). Talvez os peptídeos gerados no controle negativo por ação da plasmina, enzima proteolítica do leite, possuam maior número de resíduos aromáticos do que os peptídeos gerados no controle positivo, justificando a maior absorção do controle negativo a 280 nm.

A análise de componentes principais corrobora essa afirmação, onde o componente principal 1 explicou 64,6% da variação nos dados, sendo caracterizado, principalmente, pelas variáveis pH e pelo método OPA (Abs 340/mg PTN, U/mg PTN, Abs 340 nm e U). Já a componente principal 2 explicou 18,8% da variação nos dados, sendo que as variáveis com mais peso para este componente foram MS (g), mg PTN/mL e Abs 280 nm.

Ao comparar a atividade proteolítica específica (U/mg de proteína) das cepas de *L. rhamnosus* pelo método OPA, sete (7/16) cepas se destacaram das demais, além do controle positivo *L. casei*, cepa referência neste trabalho como sabidamente proteolítica (Figura 1). Associando esse resultado à concentração de proteína, estas sete cepas proteolíticas mostraram mais de 90% de degradação das proteínas solúveis no leite após fermentação.

Dentre as formas de representar a atividade proteolítica pelo método OPA a atividade específica (U/mg de proteína) permitiu reunir informações importantes em um único dado. Para calcular a unidade de atividade (U) é subtraído o valor obtido no controle negativo (C-) o que permite retirar a diferença entre experimentos com o preparo e a origem do leite utilizado como meio de cultivo. Segundo, dividindo esse valor pela quantidade de proteína ainda remanescente após o cultivo, retira-se o erro das repetições, ou seja, relaciona-se o produto da reação com a quantidade de substrato consumido pela cepa. Ressalta-se também a elevada correlação negativa entre a massa seca e a concentração de proteína (-0,8292), reforçando a importância da concentração de proteína no cálculo da atividade proteolítica. Como um exemplo para explicar esse fato, pode-se analisar os resultados obtidos com a cepa Lr12. Quando se avalia a atividade proteolítica dela apenas pela absorvância em 340 nm, esta cepa pode ser considerada como uma cepa proteolítica (Figura

1). Porém, esta mesma cepa apresentou uma das menores taxas de fermentação, com baixo crescimento e alto pH, o que resultou em uma baixa taxa de degradação proteica. Quando se insere a concentração de proteína no cálculo da atividade proteolítica, se retira esse erro da avaliação da atividade e a cepa deixa de ser classificada como uma cepa proteolítica (Figura 1).

O pH inicial do leite foi de 6,61 e após a incubação sem cepa (C-) foi de 5,34. Ao final do cultivo, sete cepas produziram um baixo pH no meio, entre 3,57 e 4,27, e foram associadas à alta atividade proteolítica (> 90% de degradação proteica). Quanto às demais cepas, cinco delas com média atividade proteolítica (> 50% de degradação da proteína, mas < 90%) apresentaram pH entre 4,16 e 4,96, e nas quatro cepas com baixa atividade proteolítica (< 50% de degradação da proteína) o pH estava entre 5,11 e 5,36.

Esses resultados mostram a capacidade das cepas proteolíticas de produzir ácido no cultivo, bem como de reduzir a concentração de proteínas no extrato livre de células, que são dois parâmetros importantes para serem considerados na seleção de cepas. Kholif et al. (2011), também relataram comportamento semelhante de *L. rhamnosus* em seu estudo, observando alta atividade proteolítica e baixo pH (3,88) após 24h de incubação a 37 oC. Moraes et al. (2017), também relataram a acidificação de leite desnatado de cabra com maior atividade proteolítica de cultura de cepa de *L. mucosae*, o que sugere ser uma correlação também possível para outros meios de cultivo e espécies de lactobacilos.

Somado a essas descobertas, dentre os parâmetros analisados, o que apresentou elevada correlação com o maior número de parâmetros foi o pH (Tabela 1), o que reforça a medida do pH como um importante indicador para inferir tanto o crescimento celular (correlação de -0,5981, $p < 0,001$) quanto a atividade proteolítica (correlação entre -0,6787 e -0,8475, $p < 0,001$) após cultivo no leite desnatado a 10%. Essa correlação é visível analisando os gráficos desses parâmetros apresentados na Figura 1, ou seja, quanto menor o pH maior o crescimento celular e a atividade proteolítica.

Para avaliar se a atividade proteolítica das cepas de *L. rhamnosus* era influenciada por enzimas extracelulares foi verificada a presença de enzimas ativas nos extratos sem células, em diferentes pH, utilizando zimograma. Os resultados apresentados na Tabela 2 levam a concluir que a atividade das enzimas presentes no meio extracelular depende do pH, mas a participação

delas é de pouca importância, pois há cepas com alta atividade proteolítica (U/mg de proteína) no ensaio do OPA, como a Lr10 e a Lr14 (Figura 1), que independentemente do pH, não apresentaram atividade de proteases extracelulares (Tabela 2). Já o *L. casei* (C+), além da elevada atividade proteolítica no ensaio do OPA (Figura 1), mostrou que essa atividade pode ser também devido à presença de proteases extracelulares associada ao pH 4, 5 e 6 (Figura 2). No entanto, vale ressaltar, que de acordo com a literatura, as proteases de lactobacilos se localizam principalmente no envelope celular (Gobbetti et al., 1996; Brown et al., 2017). Dessa forma, não se pode descartar que a presença de atividade proteolítica extracelular observada nos géis possa ser devido à liberação de proteases e peptidases após lise e morte celular.

Diante da perspectiva de utilizar as BAL como fábricas de células para a produção de peptídeos bioativos derivados de proteínas alimentares (Brown et al., 2017), o presente trabalho mostra uma alternativa metodológica interessante para facilitar e elevar a eficácia da seleção de cepas proteolíticas.

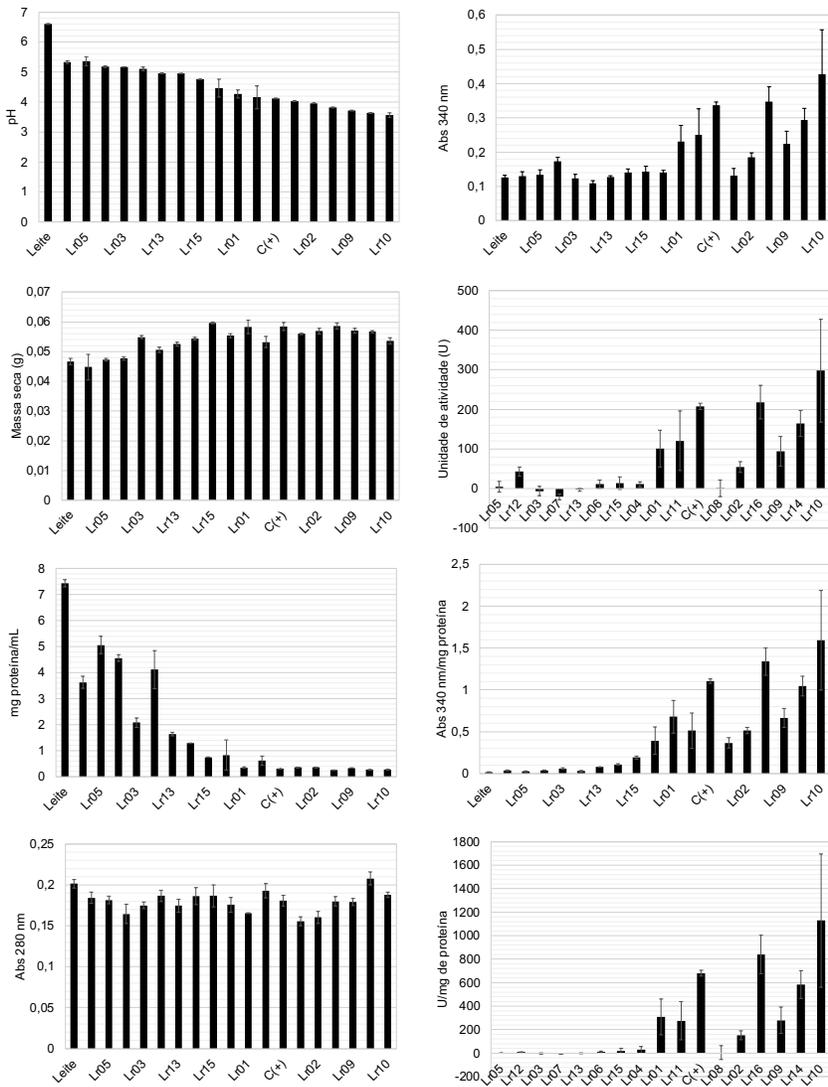


Figura 1. pH, massa seca (g), concentração de proteína (mg de proteína/mL) e concentração de peptídeos pela medida de absorvância a 280 nm e pelo reagente o-ftaldialdeído (OPA), de dezesseis cepas de *Lactocaseibacillus rhamnosus* (Lr01 a Lr16) e uma de *L. casei* como controle positivo ou C(+) cultivadas em leite em pó desnatado a 10%. Foram utilizadas para expressar o resultado do método OPA a absorvância a 340 nm, Abs a 340 nm/mg de proteína, unidade de atividade (U) e atividade específica (U/mg de proteína). Leite: leite em pó bovino desnatado dissolvido em água a 10% (p.v⁻¹) e estéril. Controle negativo ou C(-): leite não fermentado, ou seja, leite incubado mas não inoculado com bactérias.

Tabela 1. Matriz de correlação entre os parâmetros absorvância a 340 nm (Abs 340 nm), unidade de atividade (U), concentração de proteína (mg de PTN/mL), pH, massa seca (MS, g), absorvância a 280 nm (Abs 280 nm), absorvância a 340 nm por mg de proteína (Abs 340/mg PTN) e unidade de atividade por mg de proteína (U/mg PTN), de cepas de *Lactocaseibacillus rhamnosus* cultivadas em leite em pó bovino desnatado a 10%.

Parâmetros	Abs 340 nm	U	mg PTN/mL	pH	MS (g)	Abs 280 nm	Abs 340/mg PTN	U/mg PTN
Abs 340 nm	1.0000	1.0000***	-.4457**	-.6787**	0.3003*	0.2111	0.9080***	0.9648***
U	1.0000***	1.0000	-.4457**	-.6787**	0.3003*	0.2111	0.9080***	0.9648***
mg PTN/mL	-.4457**	-.4457**	1.0000	0.7929***	-.8292***	-.0060	-.6446***	-.4631**
pH	-.6787***	-.6787***	0.7929***	1.0000	-.5981***	0.0440	-.8475***	-.6820***
MS (g)	0.3003*	0.3003*	-.8292***	-.5981***	1.0000	-.0522	0.4899***	0.3312*
Abs 280 nm	0.2111	0.2111	-.0060	0.0440	-.0522	1.0000	0.1298	0.2466
Abs 340/mg PTN	0.9080***	0.9080***	-.6446***	-.8475***	0.4899***	0.1298	1.0000	0.9497***
U/mg PTN	0.9648***	0.9648***	-.4631**	-.6820***	0.3312*	0.2466	0.9497***	1.0000

*Estatisticamente significativo a 5% ($p < 0,05$).

**Estatisticamente significativo a 1% ($p < 0,01$).

***Estatisticamente significativo a 0,1% ($p < 0,001$).

Tabela 2. Atividade proteolítica extracelular em extratos livres de células (100 µg de proteína) após fermentação do leite em pó bovino desnatado a 10% com cultura de cepas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* e *L. casei*. A análise foi realizada por zimograma, tendo a caseína (0,1%) como substrato, em diferentes pH, durante 72h a 37 oC.

Amostras	Atividade proteolítica extracelular em diferentes pH					
	3	4	5	6	7	8
C(-)	-	-	-	-	*	-
Lr01	-	-	-	-	-	-
Lr02	-	-	-	*	-	-
Lr03	-	-	-	-	-	-
Lr04	-	-	-	*	*	-
Lr05	-	-	-	-	-	-
Lr06	-	-	-	-	-	-
Lr07	-	-	-	-	-	*
Lr08	-	-	-	-	-	-
Lr09	-	-	-	-	-	-
Lr10	-	-	-	-	-	-
Lr11	-	*	*	*	*	*
Lr12	-	-	-	-	-	-
Lr13	-	-	-	-	-	-
Lr14	-	-	-	-	-	-
Lr15	-	-	-	-	-	-
Lr16	-	-	-	**	-	-
C(+)	-	*	*	**	-	-

C(-) ou controle negativo: Leite em pó bovino desnatado a 10% e estéril, não fermentado; Lr01 a Lr16: Cepas de *Lacticaseibacillus rhamnosus*; C(+) ou controle positivo: *L. casei*, cepa comercial sabidamente proteolítica;

(-) nenhuma atividade proteolítica; (*) atividade proteolítica, uma banda reativa; (**) atividade proteolítica, mais de uma banda reativa.



Figura 2. Zimograma do *Lactobacillus casei* (C+ ou controle positivo) em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, acrescido de 0,1% de gelatina, em pH 6, e corado com azul de Coomassie G-250. Aplicados 8 μ g de proteína no poço.

Conclusões

A atividade proteolítica das cepas estudadas foi pouco influenciada por enzimas extracelulares e, para uma avaliação mais rápida e eficaz, pode-se recomendar a seleção de cepas proteolítica em duas etapas: primeiramente uma etapa de triagem com a avaliação do pH do meio após crescimento das cepas em leite em pó bovino desnatado a 10%. Nessa etapa devem ser identificadas e selecionadas as cepas que alterarem o pH para faixas abaixo de 4,27 após 24h de incubação a 37 °C. As cepas selecionadas nessa primeira etapa passarão para a segunda fase de avaliação, onde deverá ser determinada a atividade proteolítica específica (U/mg de proteína). Esta medida se mostrou mais eficaz para seleção de cepas, ao associar dois parâmetros importantes para sua obtenção, ou seja, a quantidade de peptídeos gerados após degradação de substrato proteico sob a quantidade de substrato proteico residual. Dessa forma, através da atividade específica as cepas selecionadas como mais proteolíticas geram mais peptídeos ao degradarem o máximo de substrato proteico durante a fermentação láctica.

Agradecimentos

A equipe agradece a colaboração da técnica da Embrapa Caprinos e Ovinos Liana Maria Ferreira da Silva nos experimentos laboratoriais. Os recursos foram custeados pela Embrapa. Agradecemos também ao CNPq pelas bolsas de pesquisadores DT, bem como à Capes, pela bolsa de estudos do doutorando Samuel Carneiro de Barcelos.

Referências

- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938-956, 2014. DOI: 10.1080/10408398.2011.619671
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n. 1/2, p. 248-254, May, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- BROWN, L.; PINGITORE, E. V.; MOZZI, F.; SAAVEDRA, L.; VILLEGAS, J. M.; HEBERT, E. M. Lactic acid bacteria as cell factories for the generation of bioactive peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 2, p. 146-155, 2017. DOI: 10.2174/0929866524666161123111333

- CHURCH, F. C.; SWAISGOOD, H. E.; PORTER, D. H.; CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 6, p. 1219-1227, Jun. 1983. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. **Lait**, v. 87, n. 1, p. 21-38, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/lait:2006023>
- GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480-487, 2010.
- GOBBETTI, M.; SMACCHI, E.; CORSETTI, A. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3220-3226, 1996. DOI: [10.1128/aem.62.9.3220-3226.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3220-3226.1996).
- GORBACH, S. L. Probiotics in the third millennium. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, Suppl. 2, p. 2-7, Sep. 2002. DOI: [10.1016/s1590-8658\(02\)80155-4](https://doi.org/10.1016/s1590-8658(02)80155-4).
- IBM Corp. **Released. IBM SPSS Statistics for Windows**. Version 21.0. Armonk, NY, 2012.
- JAKAITIS, B. M.; DENNING, P. W. Commensal and probiotic bacteria may prevent NEC by maturing intestinal host defenses. **Pathophysiology**, v. 21, n. 1, p. 47-54, Feb. 2014. DOI: [10.1016/j.pathophys.2013.11.012](https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2013.11.012)
- JUNTUNEN, M.; KIRJAVAINEN, P.V.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.; ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 293-296, Mar. 2001. DOI: [10.1128/CDLI.8.2.293-296.2001](https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.293-296.2001)
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. **The Journal of General Physiology**, v. 30, n. 4, p. 291-310, Mar. 1947. DOI: [10.1085/jgp.30.4.291](https://doi.org/10.1085/jgp.30.4.291).
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
- LANDERSJÖ, C.; YANG, Z.; HUTTUNEN, E.; WIDMALM, G. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). **Biomacromolecules**, v. 3, n. 4, p. 880-884, Jul./Aug. 2002. DOI: [10.1021/bm020040q](https://doi.org/10.1021/bm020040q)
- MORAES, G. M. D. de; ABREU, L. R. de; EGITO, A. S. do; SALLES, H. O.; SILVA, L. M. F. da; NERO, L. A.; SANTOS, K. M. O. dos. Functional properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Brazilian goat milk. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 3, p. 235-245, 2017. DOI: [10.1007/s12602-016-9244-8](https://doi.org/10.1007/s12602-016-9244-8)
- MARÔCO, J. **Análise estatística com o PASW Statistics (ex-SPSS)**. Pêro Pinheiro: ReportNumber, 2010. 953 p.
- NATARAJ, B.H.; ALI, S.A.; BEHARE, P.V.; YADAV, H. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p.168, 2020. DOI: [10.1007/s12602-016-9244-8](https://doi.org/10.1007/s12602-016-9244-8)
- NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. **Electrophoresis**, v. 6, n. 9, p. 427-448, 1985. DOI:

<https://doi.org/10.1002/elps.1150060905>

PROBIOTICS in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper, 85, Rome: FAO: WHO, 2006. 50 p. (FAO. Food and Nutrition Paper, 85). Disponível em: <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2021.

RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar-análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista de Sociologia e Política**, v. 16, n. 31, p. 85-100, 2008.

SANTOS, K. M. O. dos; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; NASCIMENTO, J. C. F. do; MELO, M. E. S. de; BRUNO, L. M.; BORGES, M. de F.; ROCHA, C. R. C.; LOPES, A. C. de S.; FRANCO, B. D. G. de M.; TODOROV, S. D. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus* plantarum and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science & Technology**, v. 95, n. 2, p. 209-230, 2015.

STANTON, C.; GARDINER, G.; MEEHAN, H.; COLLINS, K.; FITZGERALD, G.; LYNCH, P. B.; ROSS, R. P. Market potential for probiotics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, Suppl. 2, p. 476S-483S, 2001. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.476s.

WANG, K.-Y.; LI, S.-N.; LIU, C.-S.; PERNG, D.-S.; SU, Y.-C.; WU, D.-C.; JAN, C.-M.; LAI, C.-H.; WANG, T.-N.; WANG, W. M. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 3, p. 737-741, Nov. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.3.737>

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C.M.A.P.; HARRIS, H.M.B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P.W.; POT, B.; VAN DAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G.E.; GÄNZLE, M.G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, Apr. 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107

Embrapa

Caprinos e Ovinos

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL