



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

---

Bactérias degradadoras de lactose e glúten presentes em queijos e iogurtes encontrados no mercado de Manaus: alternativas para a intolerância à lactose e à Doença Celíaca

Nome da aluna: Cassiane Minelli de Oliveira

**Manaus - AM  
2017**

CASSIANE MINELLI DE OLIVEIRA

Bactérias degradadoras de lactose e glúten presentes  
em queijos e iogurtes encontrados no mercado de Manaus:  
alternativas para a intolerância à lactose e à Doença  
Celíaca

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

**Orientador:** Charles R. Clement, PhD  
**Co-orientador:** Luiz Antonio de Oliveira, PhD

**MANAUS-AM**

**2017**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pela autora.

Minelli Oliveira, Cassiane

M664b Bactérias degradadoras de lactose e glúten presentes em queijos e iogurtes encontrados no mercado de Manaus: alternativas para a intolerância à lactose e à Doença Celíaca / Cassiane Minelli Oliveira. 2017

169 f.: il. Color; 31 cm.

Orientador: Charles Roland Clement

Co-orientador: Luiz Antonio de Oliveira

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.

1. Metabolismo microbiano. 2. Atividade enzimática. 3. Degradação de glúten. 4. Degradação de lactose. 5. Microbiota amazônica. I. Clement, Charles Roland II. Universidade Federal do Amazonas. III. Título

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar este curso de pós-graduação e ter aprendido, não só as matérias ensinadas, mas também, a ver o mundo com olhos mais experientes.

À Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos professores PhD. Charles R. Clement e PhD. Luiz Antonio de Oliveira por terem possibilitado a realização deste projeto, confiando no meu potencial desde o começo, pela amizade e o apoio durante todo o trabalho.

Aos queridos companheiros do Laboratório de Ecologia de Microrganismos do INPA, Luciana Lima de Brito Cáuper, Nadionara Costa Menezes, Karen de Oliveira, Mirna Sayuri Farias Miyamoto, Francisco Wesen, Fabiana de Oliveira pelo companheirismo nas horas de trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudo e suporte financeiro à pesquisa, através do projeto “Obtenção de microrganismos da Amazônia produtores de metabólitos de importância econômica e ecológica”, edital Bionorte.

À minha família, meu pai, Luiz Antonio de Oliveira, e à minha mãe Eliana Minelli de Oliveira. Vocês sempre me apoiaram e me ensinaram que com trabalho, dedicação e ética podemos alcançar todos os nossos objetivos.

Aos meus amigos Lígia Guimarães, Ravena Silva, José Martiniano Neto, Paulo Rocha Júnior, Caio Pio, Michelle Sachetto, Andréia Nascimento, Mário Rocha Neto, Marco Antônio Rodrigues, Nelma Miranda Rodrigues, Mauro Emiliano e Maurício Emiliano pela paciência por me escutarem a falar sobre este trabalho e por sempre me dizerem que eu tenho capacidade para fazer tudo que me propunha a fazer.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

Os microrganismos são fundamentais para a manutenção do equilíbrio dos organismos vivos e dos elementos químicos do nosso planeta. Eles ocorrem em todos os ambientes da natureza, inclusive em alimentos. Diversas pesquisas têm mostrado que microrganismos encontrados na cavidade bucal e intestinos apresentam habilidade de degradar componentes encontrados no leite e em alguns cereais, podendo degradar a lactose e o glúten. Esse trabalho teve como objetivo, isolar, purificar e caracterizar morfológicamente bactérias de queijos e iogurtes comercializados no município de Manaus, Amazonas, bem como testar seus extratos brutos capazes de degradar lactose e glúten visando uma alternativa para minimizar ou solucionar o problema de intolerância à lactose e doença Celíaca que afetam parte da população mundial. Foram isoladas 75 bactérias dos 10 tipos de queijo e 10 tipos de iogurtes usados para os testes. Todas as 75 bactérias apresentaram elevado crescimento nas primeiras 24 horas de avaliação em ambos os meios de cultura testados (glúten ou lactose). Das 75 bactérias testadas, 61 apresentaram formação de halo de degradação em meio contendo glúten. Pelo Índice de Degradação de Glúten (IDG), das 61 bactérias avaliadas, 30 apresentaram baixos IDG's, 9 IDG's médios e nenhuma apresentou IDG alto. O uso do glúten ou lactose nos meios de cultura influenciou as características morfológicas das colônias das 20 bactérias selecionadas como as melhores. Das 13 bactérias usadas na caracterização genética, foi possível identificar somente quatro ao nível de espécie. Quatro isolados são do gênero *Pseudomonas* sp., quatro do gênero *Bacillus* sp., duas do gênero *Stenotrophomonas* sp., uma do gênero *Brevibacillus* sp., uma do gênero *Achromobacter* sp. e uma do gênero *Burkholderia* sp. Foram realizados também, experimentos de laboratório em meio líquido contendo lactose ou glúten como fonte de carbono em pH's de 2,3 (semelhante ao do estômago) e 8,0 (semelhante ao dos intestinos) nas temperaturas de 37 °C e 55 °C. As bactérias BLG01 (*Pseudomonas* sp.), BLG02 (*Bacillus* sp.), BLG06 (*Pseudomonas* sp.), BLG16 (*Stenotrophomonas maltophilia*), BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.) mostraram potencial para serem usadas como probióticas, desde que não sejam patogênicas em testes futuros e/ou como supridoras de enzimas capazes de degradarem a lactose e o glúten. Todas mostraram sensibilidade à acidez e à alcalinidade equivalentes às do estômago e às dos intestinos humanos, indicando que essa bipolaridade acidez/alcalinidade pode ser um mecanismo de defesa do organismo humano contra a ação de bactérias patogênicas ou indesejáveis. Para que bactérias desejáveis sejam utilizadas como probióticas, elas precisam ser ingeridas em altas concentrações, acima de  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Das doze bactérias testadas, as com maiores potenciais de utilização como probióticas, desde que comprovadamente não sejam

patogênicas, são as BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.), por fazerem parte de gêneros com pouca possibilidade de patogenicidade e por apresentarem crescimento positivo nas duas primeiras horas em pH 2,3, semelhante ao do estômago. No entanto, elas precisam colonizar e fazer parte da flora intestinal, além de ajudarem no metabolismo da lactose e do glúten ingeridos como alimentos. Para avaliar se a fonte de carbono e a fase de crescimento das bactérias afeta a produção e qualidade de proteases capazes de degradar o glúten, foram realizados experimentos com os extratos brutos de nove dessas bactérias, BLG02, BLG25, BLG28, BLG33, BLG38, BLG45, BLG52, BLG56 e BLG73. Os extratos foram obtidos do cultivo dessas bactérias em dois meios de cultura (glúten e lactose como fontes de carbono) e coletados com 6, 12 e 24 horas de incubação. Diluições dos extratos também foram testadas quanto às suas capacidades de degradar o glúten. Todas as bactérias produziram extratos com capacidade de degradação do glúten. A fonte de carbono (lactose ou glúten) afetou a capacidade dessas bactérias em produzirem extratos capazes de degradarem o glúten. A maioria delas produziu mais proteases quando crescidas em meio contendo esse complexo proteico. O tempo de coleta dos extratos bacterianos também influenciou nas suas capacidades de degradarem o glúten, com os produzidos com 24 horas de crescimento sendo melhores para a maioria dessas bactérias quando comparados pelos produzidos com 6 e 12 horas. O maior percentual de degradação de glúten foi de 87,3 % usando o extrato obtido com 24 horas de crescimento da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) cultivada em meio de cultura contendo glúten. Com base na capacidade de degradação, nos tempos de coletas dos extratos bacterianos e meios de cultura, pode-se concluir que as nove bactérias apresentam diferentes proteases capazes de degradarem o glúten. Essa capacidade de degradarem o glúten variou com suas concentrações na solução de formas diferentes e essa característica pode servir como um teste a mais para diferenciar uma da outra. São necessários estudos mais detalhados, como o de purificação dos componentes dos extratos dessas bactérias, para avaliar cada uma dessas proteases individualmente, para escolher as de melhores potenciais biotecnológicos.

**Palavras chave:** Metabolismo microbiano, atividade enzimática, degradação de glúten, degradação de lactose, microbiota amazônica.

## Abstract

Microorganisms are of fundamental importance for maintaining the equilibrium of living organisms and the chemical elements of our planet. They occur in all nature environments, including in foods. Several researches have shown that microorganisms found in the oral cavity and intestines have the ability to degrade components found in milk (lactose) and in some cereals (gluten). This work had as objectives, to isolate, purify and morphologically characterize cheeses and yoghurt bacteria commercialized in the city of Manaus, Amazonas, as well as to test their crude extracts capable of degrading lactose and gluten, aiming as an alternative to minimize or solve the problem of lactose intolerance and Celiac disease that affect part of the world population. Seventy-five bacteria were isolated from the 10 types of cheese and 10 types of yogurts used for the tests. All 75 bacteria showed high growth in the first 24 hours of evaluation in both culture media tested (gluten or lactose). Of the 75 bacteria tested, 61 presented halo formation of degradation in medium containing gluten. For the Gluten Degradation Index (GDI), of the 61 bacteria evaluated, 22 did not present GID during the test, 30 had GIDs considered low, 9 GIDs were considered medium and none had GID considered high. The carbon source of the culture medium (gluten or lactose) influenced the morphological characteristics of the colonies of the 20 selected bacteria as the best ones. In the Gram staining test, 16 bacteria were Gram Negative and four Gram positive. Of the 13 bacteria used in the genetic characterization, it was possible to identify only four at the species level. Four isolates are of the genus *Pseudomonas*, four of the genus *Bacillus*, two of the genus *Stenotrophomonas*, one of the genus *Brevibacillus*, one of the genus *Achromobacter* and one of the genus *Burkholderia*. In order to evaluate twelve bacteria selected from previous tests, laboratory experiments were performed in a liquid medium containing lactose or gluten as a source of carbon at pH of 2.3 (similar to that of the stomach) and 8.0 (similar to that of the intestines) at temperatures of 37 ° C and 55 ° C. The bacteria BLG01 (*Pseudomonas* sp.), BLG02 (*Bacillus* sp.), BLG06 (*Pseudomonas* sp.), BLG16 (*Stenotrophomonas maltophilia*), BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), BLG28), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) and BLG73 (*Bacillus* sp.) showed potential to be used as probiotics after future confirmation of non-pathogenicity or as suppliers of enzymes capable of degrading lactose and gluten. All bacteria showed sensitivity to acidity and alkalinity equivalent to those of the human stomach and intestines, indicating that this acidity/alkalinity bipolarity can be a defense mechanism of the human organism against the action of pathogenic or undesirable bacteria. For desirable bacteria to be used as probiotics, they need to be ingested at high concentrations, above  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. From the 12 bacteria tested, those with the highest potential for use as probiotics, if not pathogens, are BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) and BLG73 (*Bacillus* sp.), since they are part of genera with little possibility of pathogenicity and because they present positive growth in the first two hours at pH 2.3, similar to that of the stomach. However, they need to colonize and participate of the intestinal flora, and to help to the lactose and gluten metabolism ingested as food. To evaluate if the carbon source and the growth phase of the bacteria affect the production and quality of proteases capable of degrading gluten, experiments were carried out on the crude extracts of nine bacteria, BLG02,

BLG25, BLG28, BLG33, BLG38, BLG45, BLG52, BLG56 and BLG73. The extracts were obtained from culture of these bacteria in two culture media (gluten and lactose as carbon sources) and collected with 6, 12 and 24 hours of incubation. Dilutions of the extracts were also tested for their ability to degrade gluten. All bacteria produced extracts with the ability to break down gluten. The source of carbon (lactose or gluten) has affected the ability of these bacteria to produce extracts capable of degrading gluten. The majority of them produced more proteases when growing in the medium with this proteic complex. The time of collection of bacterial extracts also influenced their ability to degrade gluten, with the 24 hour extracts from most of these bacteria showing the highest degradability when comparing with those produced with 6 and 12 hours. The highest percentage of gluten degradation was 87.3% using the extract obtained with 24 hours of growth of bacterium BLG56 (*Achromobacter* sp.) grown in culture medium containing gluten. Based on the degradability, collection times of bacterial extracts and culture media, it can be concluded that the nine bacteria present different proteases capable of degrading gluten. This ability to degrade gluten varied with their concentrations in the solution in different ways and this feature may serve as an additional test to differentiate one from the other. More detailed studies, such as the purification of the extracts components of these bacteria, are needed to evaluate each of these proteases individually to choose the best with biotechnological potential.

**Key words:** Microbial metabolism, enzymatic activity, gluten degradation, lactose degradation, Amazonic microbiota.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabelas</b>	<b>Pag.</b>
Tabela 1. Médias dos principais componentes do leite de diferentes espécies de mamíferos.	04
Tabela 2. Classificação do leite pasteurizado	07
Tabela 3. Brasil: Quadro de oferta e demanda de leite bovino de 2011 a 2016 em milhões de litros	08
Tabela 4. Faixas de pontuação para avaliação do crescimento das bactérias em meio sólido contendo glúten.	52
Tabela 5. Isolamento das bactérias e suas origens.	59
Tabela 6. Crescimento segundo metodologia Oliveira e Magalhães (1999).	60
Tabela 7. Bactéria com os maiores Índices de Degradação de Glúten.	63
Tabela 8. Caracterização fenotípica das bactérias em meios com glúten e lactose (a).	66
Tabela 9. Caracterização fenotípica das bactérias em meios com glúten e lactose (b).	67
Tabela 10. Teste de Catalase das Bactérias.	69
Tabela 11. Teste de Coloração de Gram	69
Tabela 12. Classificação das bactérias utilizadas no presente estudo	70
Tabela 13. Crescimento das bactérias em meio contendo lactose e glúten à temperatura de 37 °C e dois pH's.	85
Tabela 14. Crescimento das bactérias em meio contendo lactose na temperatura de 37 °C e pH 6,5.	86
Tabela 15. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com lactose na temperatura de 37 °C e pH 2,3 com concentração inicial de $10^7$ células.mL <sup>-1</sup> .	96
Tabela 16. Crescimento de células das bactérias BLG em meio contendo lactose na temperatura de 55 °C e pH 6,5. Médias de quatro repetições.	97
Tabela 17. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com lactose na temperatura de 55°C e pH 2,3	98
Tabela 18. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com lactose na temperatura de 55 °C e pH 8,0	99
Tabela 19. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com glúten na temperatura de 37 °C e pH 2,3 com concentração inicial de $10^6$ .	100
Tabela 20. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com glúten na temperatura de 37 °C e pH 2,3 com concentração inicial de $10^7$ .	101

Tabela 21. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com glúten na temperatura de 37 °C e pH 8,0	102
Tabela 22. Comparação entre os extratos das bactérias crescidas em glúten ou lactose em 6, 12 e 24 horas.	112
Tabela 23. Porcentagem de glúten degradado pelos extratos bacterianos com 6 horas de crescimento.	122
Tabela 24. Porcentagem de glúten degradado pelos extratos bacterianos com 12 horas de crescimento.	123
Tabela 25. Porcentagem de glúten degradado pelos extratos bacterianos com 24 horas de crescimento.	123

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Pag.</b>
Figura 1. Comparações da produção de leite entre estados brasileiros e principais países produtores (DEPEC, 2016).	09
Figura 2. Comparação entre produção e consumo mundial de leite fluido de vaca (DEPEC, 2016).	10
Figura 3. Comparação entre o consumo nacional de leite fluido de vaca, consumo nacional de leite para fins industriais e consumo nacional per capita de leite (DEPEC, 2016).	10
Figura 4. Importações e Exportações brasileiras de leite de derivados (DEPEC, 2016).	11
Figura 5. Preço médio de exportação de leite e produtos lácteos (DEPEC, 2016).	11
Figura 6. Estrutura molecular básica de uma molécula de $\alpha$ -lactose e $\beta$ -lactose (ALMEIDA, 2008).	18
Figura 7. Estruturas da lactose, galactose e glicose	19
Figura 8. Processos de Hidrólise da lactose	20
Figura 9. Hidrólise enzimática de lactose catalisada por $\beta$ -galactosidase	21
Figura 10. Constituição do glúten	36
Figura 11. Produção nacional de trigo por região (DEPEC, 2016).	38
Figura 12. Maiores produtores mundiais de trigo (DEPEC, 2016).	38
Figura 13. Maiores consumidores mundiais de trigo (DEPEC, 2016).	38
Figura 14. Preços internacionais de trigo (DEPEC, 2016).	39
Figura 15. Método de avaliação do crescimento bacteriano segundo Oliveira e Magalhães (1999).	52
Figura 16. Pontuações (notas) aplicadas para o crescimento das bactérias segundo Oliveira e Magalhães (1999).	52
Figura 17. Caracterização morfológica de colônias bacterianas segundo Malajovich.(2015).	54
Figura 18. Bactéria em meio ágar-glúten (apresentando halo de degradação) e em ágar-lactose com notas 4,00 pela metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).	61
Figura 19. Bactéria com coloração diferente entre meio ágar-glúten e ágar-lactose.	62
Figura 20. Demonstração da diferença da colônia bacteriana e do halo de degradação de glúten.	64
Figura 21. Modificação de tamanho, formas, elevação e bordos das colônias da bactéria INPA BLG 28 em meio com glúten ou lactose.	65
Figura 22. Modificação de tamanho, formas, elevação e bordos das	65

colônias da bactéria INPA BLG 38 em meio com glúten ou lactose.	
Figura 23. Aspectos das colônias da bactéria BLG18 em meios contendo glúten ou lactose.	68
Figura 24. Aspectos das colônias da bactéria BLG35 em meios contendo glúten ou lactose.	68
Figura 25. Curva de crescimento de células das bactérias BLG01 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	88
Figura 26. Curva de crescimento de células das bactérias BLG06 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	88
Figura 27. Curva de crescimento de células das bactérias BLG33 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	89
Figura 28. Curva de crescimento de células das bactérias BLG16 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	90
Figura 29. Curva de crescimento de células das bactérias BLG25 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	91
Figura 30. Curva de crescimento de células das bactérias BLG45 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	91
Figura 31. Curva de crescimento de células das bactérias BLG56 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	91
Figura 32. Curva de crescimento de células da bactéria BLG52 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	92
Figura 33. Curva de crescimento de células da bactéria BLG02 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	93
Figura 34. Curva de crescimento de células da bactéria BLG28 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	93
Figura 35. Curva de crescimento de células da bactéria BLG38 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	94
Figura 36. Curva de crescimento de células da bactéria BLG73 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.	94
Figura 37. Equação da reta para calcular a quantidade de glúten degradado no teste com os extratos.	110
Figura 38. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG02 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	114
Figura 39. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG25 ( <i>Stenotrophomonas</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	116
Figura 40. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG28 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	117
Figura 41. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG33 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	118

Figura 42. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG38 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	118
Figura 43. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG45 ( <i>Burkholderia</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	119
Figura 44. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG52 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> ), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	120
Figura 45. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG56 ( <i>Achromobacter</i> sp.) quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	120
Figura 46. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG73 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.	121
Figura 47. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG02 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	125
Figura 48. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG25 ( <i>Stenotrophomonas</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	126
Figura 49. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG28 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	127
Figura 50. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG33 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	128
Figura 51. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG38 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	128
Figura 52. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG45 ( <i>Burkholderia</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	129
Figura 53. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG52 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> ), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	130
Figura 54. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG56 ( <i>Achromobacter</i> sp.) quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	130
Figura 55. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG73 ( <i>Bacillus</i> sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.	131

## SUMÁRIO

	<b>Pag.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	03
2.1. Leite	03
2.1.1. Composição do leite	03
2.1.2. Leite de vaca	06
2.1.2.1. Tipos de leite	06
2.1.2.2. Mercado econômico do leite	08
2.2. Iogurtes	12
2.3. Queijos	14
2.4. Lactose	17
2.4.1. Hidrólise da lactose	19
2.4.2. Métodos de hidrólise da lactose	20
2.5. Enzimas	22
2.5.1. Atividade enzimática	24
2.5.2. Cinética enzimática	25
2.5.3. Estruturas e mecanismos das enzimas	26
2.5.4. Especificidade das enzimas	27
2.6. Lactase	28
2.6.1. Deficiência de lactase	29
2.6.2. Intolerância à Lactose	31
2.7. Doença Celíaca	33
2.8. Glúten	35
2.9. Trigo	37
2.10. Microrganismos	39
2.10.1. Bactérias	40
2.10.2. Flora gastrointestinal	40
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	43
<b>4. OBJETIVOS</b>	45
4.1. Objetivo geral	45
4.2. Objetivos específicos	45
<b>CAPÍTULO 1: Características morfológicas e bioquímicas de bactérias encontradas em produtos lácteos comercializados na cidade de Manaus, Amazonas.</b>	56

<b>1. Introdução</b>	49
<b>2. Material e Métodos</b>	51
2.1. Isolamento e purificação das bactérias	51
2.2. Teste de crescimento em meio ágar-glúten e em meio ágar-lactose	51
2.3. Habilidade das bactérias em degradarem o glúten	53
2.4. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos em meios com glúten e lactose	53
2.5. Teste da catalase	55
2.6. Coloração de Gram	56
2.7. Caracterização genética dos isolados bacterianos	56
2.7.1. Extração do DNA cromossomal	56
2.7.2. Identificação taxonômica das bactérias	57
2.7.3. Protocolo de identificação molecular	57
<b>3. Resultados e discussão</b>	59
3.1. Isolamento e purificação das bactérias	59
3.2. Teste de crescimento bacteriano em meio ágar-glúten e em meio ágar-lactose	59
3.3. Habilidade das bactérias em degradarem o glúten	62
3.4. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos em meios com glúten e lactose	64
3.5. Teste de catalase	68
3.6. Coloração de Gram	69
3.7. Caracterização genética dos isolados bacterianos	70
<b>4. Conclusões</b>	76
<b>CAPÍTULO 2: Crescimento das bactérias em meios de cultura contendo lactose ou glúten como fontes de carbono</b>	78
<b>1. Introdução</b>	81
<b>2. Material e Métodos</b>	83
2.1. Crescimento bacteriano em meios líquidos contendo lactose e ou glúten em diferentes pH's e temperaturas	83
<b>3. Resultados e discussão</b>	84
3.1. Crescimento das bactérias em meio líquido contendo lactose	85
3.2. Crescimento bacteriano em meio líquido contendo glúten.	99
<b>4. Conclusões</b>	103
<b>CAPÍTULO 3: Capacidade de degradação do glúten pelos extratos brutos das bactérias cultivadas em lactose ou em glúten</b>	104

<b>1. Introdução</b>	107
<b>2. Material e Métodos</b>	109
<b>3. Resultados e discussão</b>	111
3.1. Habilidade dos extratos bacterianos em degradarem o glúten: comparações entre as bactérias crescidas em lactose com as crescidas em glúten sem diluição	111
3.2. Capacidade de degradação do glúten pelos extratos diluídos coletados com 6, 12 e 24 horas de crescimento das bactérias crescidas em meio contendo lactose	114
3.3. Capacidade de degradação do glúten pelos extratos diluídos coletados com 6, 12 e 24 horas de crescimento das bactérias crescidas em meio contendo glúten	122
<b>4. Conclusões</b>	133
<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	134
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	139
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	141
<b>ANEXOS</b>	163

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A intolerância à lactose e a Doença Celíaca são duas anormalidades digestivas que causam problemas de saúde em uma parte da população mundial. Entre 5 % das pessoas do norte da Europa e 90 % em alguns países asiáticos sofrem de intolerância à lactose, que é uma inabilidade para digerir completamente esse dissacarídeo predominante no leite (TÉO, 2002). A intolerância à lactose pode ser classificada como primária, quando há um defeito intrínseco da enzima, ou secundária, quando ocorre um dano na mucosa intestinal com conseqüente falta da mesma. Algumas causas do distúrbio primário são: deficiência de lactase do prematuro, deficiência de lactase congênita, e deficiência de lactase do tipo adulto. O distúrbio secundário pode ter como causas: doença celíaca, fibrose cística, alergia à proteína heteróloga, desnutrição, retocolite ulcerativa, síndrome do cólon irritável, giardíase, utilização de algumas drogas, entre outras (SABRA; WILLS, 1994; TÉO, 2002). A lactose não digerida, conforme passa pelo cólon, é fermentada por colônias de bactérias, havendo produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e gases (TÉO, 2002). Isto resulta em diversos sinais e sintomas clínicos, como: diarreia significativa acompanhada de desidratação, principalmente nas crianças de baixa idade, evacuação explosiva logo após a ingestão do alimento, assadura perianal, distensão e dor abdominal, flatulência, desnutrição, acidose metabólica e enterite necrosante (SABRA; WILLS, 1994; MORIWAKI; MATIOLI, 2000; TÉO, 2002; LOPES *et al.*, 2008).

Por outro lado, a prevalência da Doença Celíaca varia entre 0,5-1,0 % da população mundial, mas entre os pacientes diabéticos é maior, variando entre 2,2 % e 13,8 %, com uma média de 4,1 % nos países europeus (MONT-SERRAT *et al.*, 2008). É uma doença autoimune desencadeada pela ingestão de cereais que contêm glúten por indivíduos geneticamente predispostos. Além do consumo do glúten e da suscetibilidade genética, é também necessária a presença de fatores imunológicos e ambientais para que a doença se expresse (SDEPANIAN *et al.*, 1999). O glúten é uma substância elástica, aderente, insolúvel em água, responsável pela estrutura das massas alimentícias, constituído por frações de gliadina e de glutenina, que, na farinha de trigo, totalizam 85 % da fração proteica. Forma-se pela hidratação dessas proteínas, que se ligam entre si e a outros componentes por meio de diferentes tipos de

ligações químicas. O trigo é o único cereal que apresenta gliadina e glutenina em quantidade adequada para formar o glúten. No entanto, essas proteínas podem estar presentes em outros cereais, como cevada, centeio e aveia (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Diversas pesquisas têm mostrado que microrganismos encontrados na cavidade bucal e intestinos apresentam habilidade de degradar esses dois componentes encontrados no leite (lactose) e em alguns cereais (glúten) (DI CAGNO *et al.*, 2001; FONDÉN, 2001; FUJIMURA *et al.*, 2010; ROWAT *et al.*, 2010; FERNANDEZ-FEO *et al.* 2013). Em derivados do leite, como nos queijos e iogurtes, também foram encontradas diversas bactérias com essa capacidade (HELLER, 2001; GOBBETTI, 2005; MASOTTI *et al.*, 2013), abrindo perspectivas de se obterem, através de isolamentos, novos gêneros e espécies de bactérias para resolverem ou minimizarem esse problema de saúde presente nas populações humanas de todas as regiões do planeta.

A utilização de microrganismos não patogênicos capazes de degradar a lactose e o glúten pode ser uma alternativa para a melhoria da qualidade de vida de pessoas que possuem intolerância à lactose e doença celíaca por meio da ingestão no trato digestivo (digestório), caso eles sejam compatíveis e possam fazer parte da flora intestinal; usando suas enzimas como um complemento medicamentoso, junto com a alimentação; usando suas enzimas na área industrial para degradarem a lactose e o glúten presentes em alimentos antes que sejam digeridos pelos seres humanos.

Uma das propriedades dos microrganismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos como pH, temperatura, pressão e concentração de sal diferentes dos padrões para a maioria dos seres vivos (LASA; BERENGER, 1993). A temperatura é o que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas (MADIGAN; OREN, 1999). Testes com diferentes temperaturas foram realizados, principalmente acima de 45 °C (para produção industrial, onde altas temperaturas são desejáveis por dificultarem a presença de microrganismos oportunistas sensíveis a elevadas temperaturas) e testes com diferentes pH's foram realizados, pois os pH's da cavidade bucal (alcalino), estômago (ácido) e intestinos (alcalino) são diferentes (MUNDO EDUCAÇÃO, 2016).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Leite**

O leite é um líquido branco produzido pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos e é levemente viscoso. Sua composição e características físico-químicas variam entre as espécies animais, e inclusive entre diferentes raças (SILVA, 2009).

Segundo Valsechi (2001), Becchi (2003) e Teichmann (2009), de acordo com a Instrução Normativa N° 51, de 18/09/02, o leite é um produto íntegro, não alterado, ou alterado e sem colostro, higienicamente ordenhado, de procedência regular, completa e ininterrupta das fêmeas mamíferas, domésticas, sadias e bem alimentadas.

O leite, obtido em circunstâncias naturais, segundo Valsechi (2001) e Almeida (2008), é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto ligeiramente adocicado. Do ponto de vista biológico, pode ser considerado um dos alimentos mais completos, por apresentar alto teor de proteínas e sais minerais, entre outras características. Por tratar-se de um produto perecível, merece atenção especial na sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo, pois estará sempre sujeito a uma série de alterações (DOMARESKI *et al.*, 2010).

É indispensável aos mamíferos nos primeiros meses de vida, pois ainda não podem digerir e assimilar outras substâncias necessárias à sua sobrevivência. A qualidade do leite, como alimento e matéria-prima para a indústria de laticínios, depende de sua composição nutritiva, sendo comum em países de pecuária leiteira desenvolvida, o pagamento do leite pela qualidade microbiológica e composição nutricional (BECCHI, 2003).

#### **2.1.1. Composição do Leite**

A composição do leite varia com a espécie produtora (Tabela 1), raça, individualidade, alimentação, tempo de gestação e muitos outros fatores (VALSECHI, 2001). O leite em média, está formado por 7/8 de água e 1/8 de

substâncias sólidas, o que se denomina Extrato Seco Total e representa a parte nutritiva do leite. Isso significa que, em 100 litros de leite, 87 litros são de água e 13 kg de substâncias sólidas, que são a gordura, a lactose, as proteínas e os sais minerais (VALSECHI, 2001).

A média dos principais componentes do leite de diferentes espécies de forma mais detalhada é a seguinte:

Tabela 1. Médias dos principais componentes do leite de diferentes espécies de mamíferos.

<b>Leite</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gordura</b>	<b>Lactose</b>	<b>Minerais</b>	<b>Total</b>
Ovelha	4,7	7,6	4,8	1,0	18,1
Búfala	3,6	7,8	4,9	0,8	17,1
Vaca	3,4	4,4	4,6	0,7	13,1
Cabra	2,9	4,5	4,4	0,8	12,6
Camela	2,8	4,0	5,4	0,4	12,6
Égua	2,2	2,5	5,9	0,5	11,1
Mulher	1,9	3,8	5,8	0,2	11,7
Jumenta	1,7	1,6	5,6	0,5	9,4

Fonte: <http://www.revistaberro.com.br>

O Extrato Seco Total (EST), que compreende todos os elementos do leite menos a água, é em média 12,5 % da composição do leite. O Extrato Seco Desengordurado (ESD), que engloba todos os elementos do leite menos a água e a gordura, compreendem em média 8,9 %, sendo importante destacar que a sua variação é devido a diferenças do rendimento industrial do produto utilizado como matéria-prima (BECCHI, 2003).

O leite, além do seu importante conteúdo em lactose, proteína, gordura e minerais, é fonte de elementos essenciais para a nutrição, como vitaminas A e D, lipossolúveis, B e C, hidrossolúveis (BEHMER, 1984).

Os principais componentes do leite apresentam características individuais e indispensáveis para a qualidade do produto, sendo a água o principal componente em volume (87,5 %) e influencia o peso específico do leite. Esta água se encontra como água livre, que age como solvente e como água ligada, que está aderida às substâncias insolúveis e não atua como solvente. A água ligada (menos de 4 % do total da água) não é fixa em proporção e está em equilíbrio com a água livre. A retenção da água ligada se dá em 50 % pela caseína e 15 % pelos fosfolípidos da membrana dos

glóbulos de gordura. Os fosfolípidos podem reter até 600 % do seu peso em água e a caseína 50 % do seu peso (BECCHI, 2003).

No caso da água livre, a fase hídrica é formada por um conjunto de substâncias dissolvidas. Entre elas proteínas, sais dissolvidos (principalmente fosfatos), cloretos, sulfatos e bicarbonato de cálcio, magnésio, sódio, potássio e lactose (ERFCL, 1981; BECCHI, 2003).

Segundo Valsechi (2001), os minerais encontrados no leite, especialmente o cálcio e o fósforo, são essenciais para a estrutura dos ossos e dentes de indivíduos de todas as idades, sobretudo lactantes e crianças, importantes para o sangue e para a saúde do sistema nervoso e muscular. Na falta desses minerais, há aumento do nervosismo e os ossos ficam mais frágeis. Também contém ácido linoleico, que previne o câncer.

Outros minerais, como o potássio, o sódio e o cloro permitem realizar com a lactose um equilíbrio da pressão osmótica do leite na glândula mamária face à pressão sanguínea. Elementos como zinco, ferro, iodo, molibdênio, flúor, selênio, cobalto e magnésio servem para a formação e manutenção do esqueleto e para o equilíbrio de muitas funções orgânicas (VALSECHI, 2001).

Entre as vitaminas, encontra-se em maior quantidade a vitamina A e algumas do complexo B. A vitamina A é responsável pela proteção da pele e dos olhos, mantém os cabelos saudáveis e ajuda na formação dos tecidos do corpo. Já as vitaminas do complexo B são importantes para a proteção do sistema nervoso, função normal dos músculos e coração, para a digestão e para a proteção da pele e dos olhos (VALSECHI, 2001).

Nenhuma das espécies pecuárias exploradas para a produção de leite recebe tanto destaque quanto a vaca. A ovelha, a cabra e a búfala também são importantes produtoras de leite em algumas regiões do mundo, como o Extremo Oriente (búfala) e Mediterrâneo (ovelha). Já outras espécies, como o camelo, lhama, rena, iaque e outros, mesmo sendo usadas como fonte de alimento lácteo, possuem somente importância regional limitada, não entrando nas estatísticas mundiais de produção de leite (VALSECHI, 2001).

## **2.1.2. Leite de vaca**

O leite de vaca é considerado um dos alimentos de maior importância na alimentação humana. É rico em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas A e D, dentre outros (SILVA, 2009).

O leite oferece, também, elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura, como o ácido linoléico conjugado, esfingomiéline, ácido butírico e betacaroteno. Também são encontradas no leite enzimas que são catalizadoras em determinadas reações para decompor, sintetizar ou transformar algumas características. As enzimas são: lipase, fosfatase, oleinase, butirase, salolase, peptidase, galactase, lactase, amilase, aldolase, xantín oxidase, peroxidase e catalase (SILVA, 2009).

### **2.1.2.1. Tipos de leite**

#### **a) Leite Pasteurizado**

Segundo a Instrução Normativa N° 51, de 18 de setembro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do leite cru refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, coleta e qualidade dessa matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador.

Também é definido como leite natural, inteiro ou desnatado, submetido a um aquecimento uniforme e a uma temperatura compreendida entre 72 e 78 °C durante não menos que 15 segundos, garantindo a destruição dos microrganismos patogênicos e da quase totalidade da flora microbiana, sem modificações sensíveis da natureza físico-química, das características e das qualidades nutritivas do produto. Refrigeração imediata a não mais que 4 °C, sendo embalado em seguida, em embalagens limpas e perfeitamente higienizadas, fechadas, impedindo contaminações e adulterações do produto. O leite pasteurizado pode ser classificado de três formas (Tabela 2) (TEICHMANN, 2009):

Tabela 2. Classificação do leite pasteurizado

Leite tipo A	Leite tipo B	Leite tipo C
Proveniente de granja leiteira	Proveniente de estábulos ou instalações apropriadas	Proveniente de fazendas leiteiras com inspeção sanitária periódica
Deve atender a todas as técnicas higiênicas e sanitárias	Deve atender a todas as técnicas higiênicas e sanitárias	Deve atender a todas as técnicas higiênicas e sanitárias
Proveniente de gado leiteiro em constante controle veterinário	Proveniente de vacas com controle veterinário permanente	-----
Vacas identificadas, com exames e fichas individuais de acompanhamento	-----	-----
Pasteurizado imediatamente no local, logo após a ordenha e envasado mecanicamente	Pasteurizado em usinas de beneficiamento e envasado	Pasteurizado e envasado em usinas de beneficiamento, distribuição por caminhão, em caixas
Integral e atender às exigências físicoquímicas e bacteriológicas do padrão	Deve ser integral e atender às exigências físicoquímicas e bacteriológicas	Deve ser integral e atender às exigências físicoquímicas e bacteriológicas
Transportado e conservado em até 10 °C e entregue ao consumo no máximo após 12 horas	Pasteurização e distribuição ao consumo no prazo máximo de 24 horas da chegada da usina	Distribuição até 24 horas após a chegada à usina; usina autorizada a fazer a padronização da gordura do leite para %;
Ausência de coliformes	Tolerância de coliformes em 0,5 ml	Tolerância de coliformes em 0,2 ml

Fonte: TEICHMANN (2009).

## b) Leite Esterilizado

Pode ser integral (3,2 % de gordura) ou desnatado (0,3 % de gordura). É o produto que, após ter sido envasado, é submetido a um processo de aquecimento de 110 a 120 °C por um período de 20 minutos, o que garante a destruição de todos os microrganismos e esporos presentes (TEICHMANN, 2009).

## c) Leite esterilizado UHT (Ultra High Temperature)

Leite natural, integral ou desnatado, submetido a um processo de aquecimento em temperatura de 135 a 150 °C durante dois a oito segundos, garantindo a destruição de todos os microrganismos e inativando seus esporos,

sendo após envasado assepticamente, com resfriamento imediato à temperatura da embalagem (24 a 26 °C) (TEICHMANN, 2009).

#### d) Leite em pó

É o leite do qual foi eliminada a maior parte da água de sua composição (95 %), o restante de 5 %, combinado com os outros nutrientes, formará o total do produto. A cor deve ser uniforme, branca cremosa ou amarelo pálido, o cheiro e sabor de leite fresco, antes e após sua constituição (TEICHMANN, 2009).

#### 2.1.2.2. Mercado econômico do leite

Segundo CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2016), estima-se que a produção de leite bovino diminuiu -1 % em 2015, acompanhando a redução de -2,8 %, publicado pelo IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, da produção sob inspeção federal, estadual e municipal, que situou-se em 24,0 bilhões de litros (Tabela 3).

Entre os vinte sete estados e o Distrito Federal, apenas seis aumentaram a sua produção em 2015: Rio Grande do Sul (+1,7 %), São Paulo (+3,3 %), Santa Catarina (+0,4 %), Rio de Janeiro (+5,5 %), Pernambuco (+6,1 %), e Acre (+5,0 %). O mercado interno absorveu aproximadamente 98 % da produção sob inspeção nos últimos anos (CONAB, 2016).

Tabela 3. Brasil: Quadro de oferta e demanda de leite bovino de 2011 a 2016 em milhões de litros.

Ano	Produção total		Produção sob inspeção			Exportações			Importações			Consumo per capita	
	Total	Var. %	Total	Var. %	Sob insp/ total(%)	Total	Var. %	Xs/Prod. Insp. %	Total	Var. %	Ms./Prod. Insp. %	Litros/h ab.	Var. %
	2011	32.096	4,5	21.795	3,9	67,9	126	-70,6	0,6	1.219	54,5		
2012	32.304	0,6	22.338	2,5	69,1	117	-7,5	0,5	1.278	4,85	5,7	168,0	-0,1
2013	34.255	6,0	23.553	5,4	68,8	134	14,6	0,6	1.071	-16,2	4,5	175,1	4,2
2014	35.174	2,7	24.747	5,1	70,4	450	237,4	1,8	727	-32,1	2,9	175,2	0,1
2015	34.823	-1,0	24.050	-2,8	69,1	441	-2,0	1,8	1.094	50,5	4,5	173,6	-0,9
2016	35.171	1,0	24.435	1,6	69,5	485	10,0	2,0	1.203	10,0	4,9	173,9	0,2

Ainda segundo a CONAB (2016), o nível de produção em 2016 irá depender do cenário interno, onde vários fatores podem modificar as estimativas de evolução da atividade nos próximos meses. A recente redução da oferta da produção sob inspeção em 2015, em - 2,8 % na comparação com o ano anterior deve oferecer algum suporte aos preços pagos ao produtor, evitando maiores quedas da produção, mesmo com os produtores enfrentando aumento dos custos.

Pelo lado da demanda, a expectativa da continuidade de queda do PIB em -3,8 % em 2016, com perda de renda e emprego, mantendo-se a inflação em patamares altos, com retração do consumo de derivados lácteos, induz à redução da produção e incentiva os produtores a reduzirem seus custos.

Segundo levantamento feito pela DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos do BRADESCO (2016) pôde-se observar que o estado brasileiro que mais produziu leite em 2015 foi Minas Gerais com 25,6 %, seguido do Rio Grande do Sul com 15,0 % e Paraná com 11,9 %; e que houve um aumento na produção brasileira de leite fluido de vaca entre os anos de 2004 e 2016 (Figura 1). A DEPEC utilizou dados publicados pelo IBGE e pelo USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

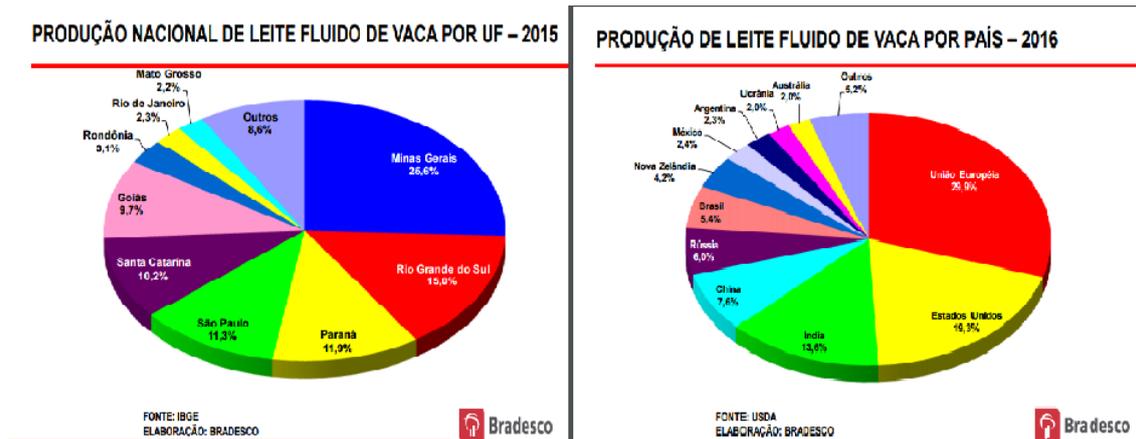


Figura 1. Comparações da produção de leite entre estados brasileiros e principais países produtores (DEPEC, 2016).

Pelo levantamento feito pela DEPEC (2016), pode-se observar aumento da produção mundial de leite fluido de vaca entre os anos de 1997 a 2016, assim como o aumento do consumo mundial deste produto entre os anos de 2003 a 2016 (Figura 2).

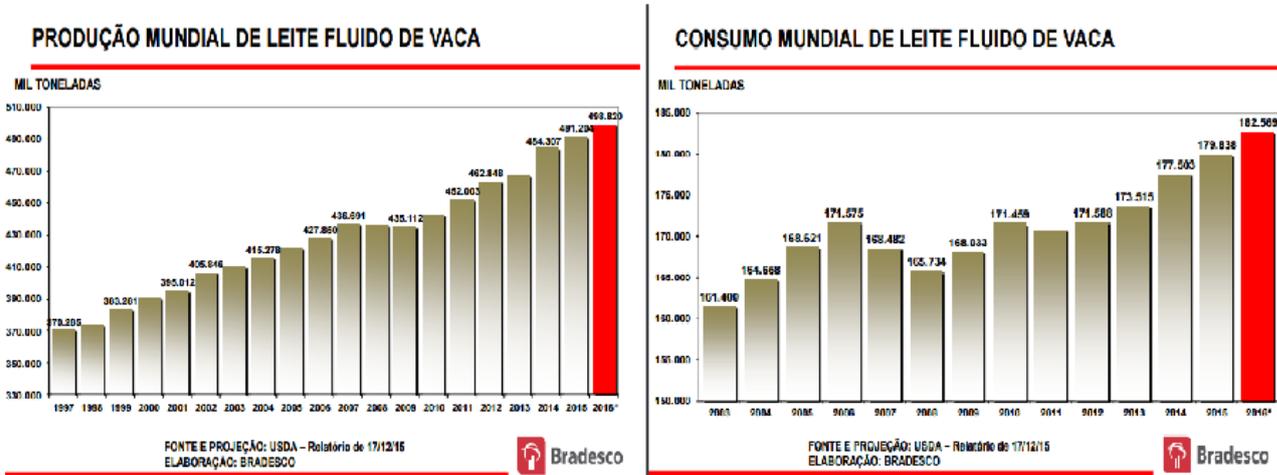


Figura 2. Comparação entre produção e consumo mundial de leite fluido de vaca (DEPEC, 2016).

O consumo nacional de leite aumentou consideravelmente entre os anos de 2007 e 2016, assim como o consumo nacional de leite para fins industriais e o consumo nacional per capita de leite (Figura 3) (DEPEC, 2016).

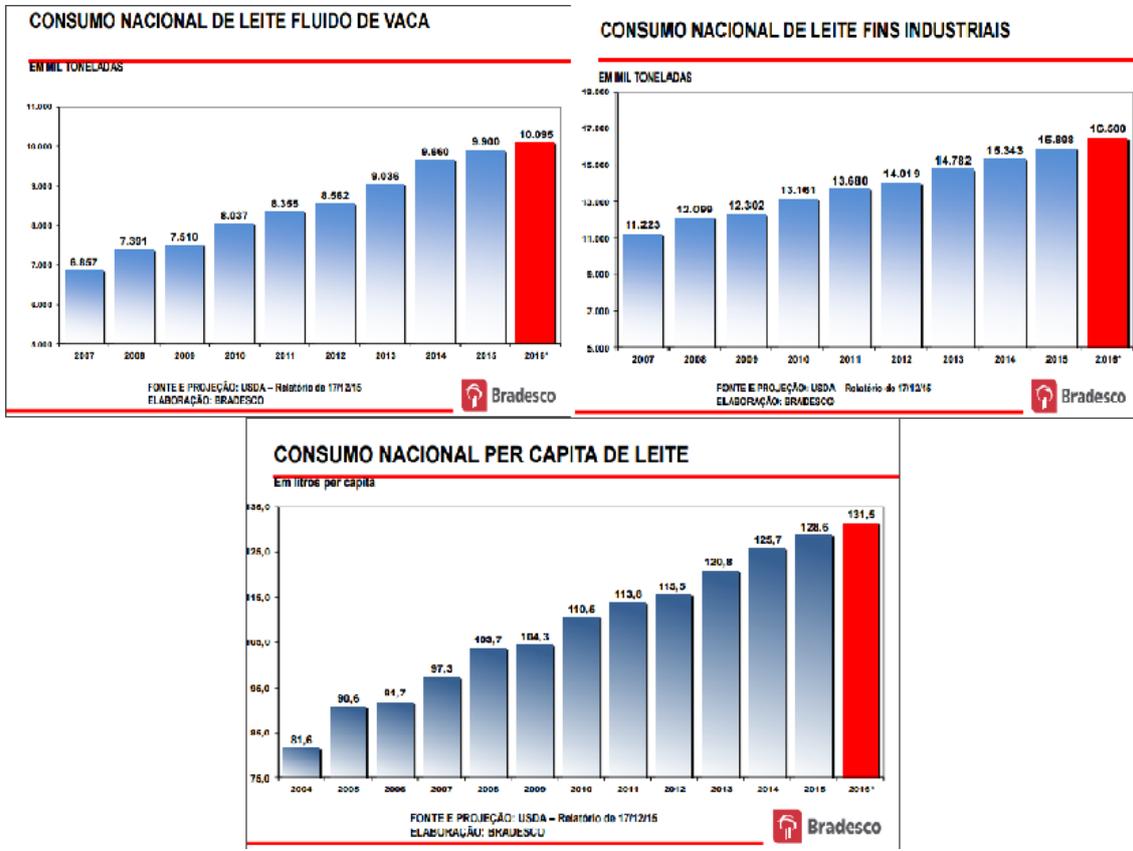


Figura 3. Comparação entre o consumo nacional de leite fluido de vaca, consumo nacional de leite para fins industriais e consumo nacional per capita de leite (DEPEC, 2016).

O Brasil está gastando muito mais em importação do leite e seus derivados do que ganhando com a exportação destes (Figura 4), ou seja, que a produção nacional não está sendo o suficiente para as necessidades do país (DEPEC, 2016).

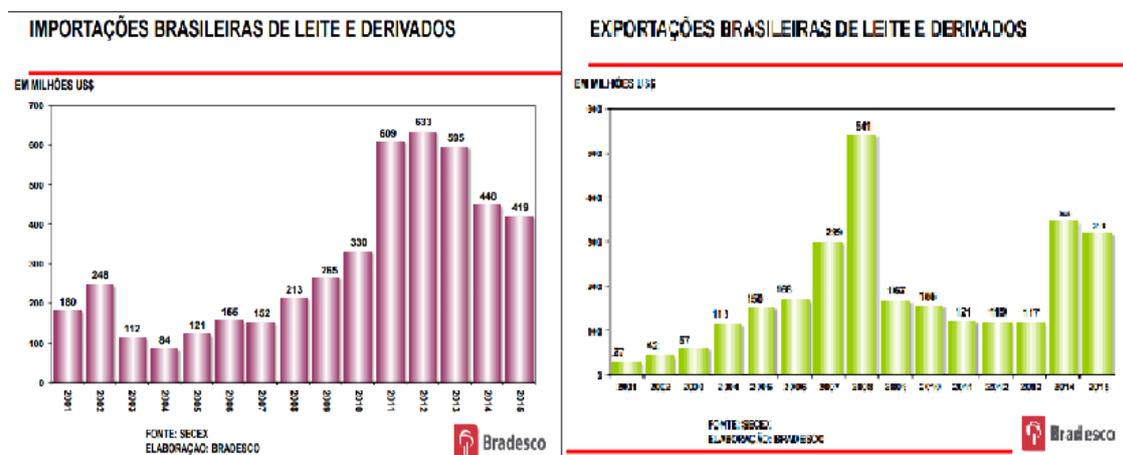


Figura 4. Importações e Exportações brasileiras de leite e derivados (DEPEC, 2016).

Com relação ao preço médio de exportação de leite e produtos lácteos, o valor subiu consideravelmente entre os anos 2011 (1,363 US\$/tonelada) e 2016 (4,155 US\$/tonelada) (Figura 5) (DEPEC, 2016).

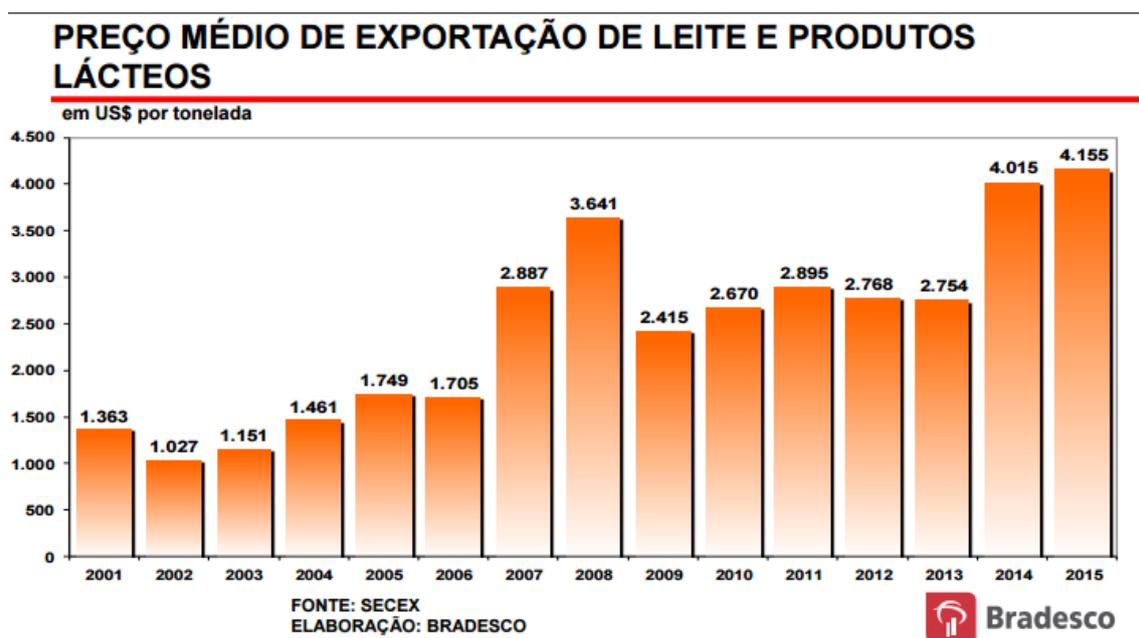


Figura 5. Preço médio de exportação de leite e produtos lácteos (DEPEC, 2016).

## 2.2. Iogurtes

O iogurte é leite fermentado por bactérias, usualmente *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, e possui uma consistência que o diferencia de outros produtos derivados de laticínios. Contém todos os constituintes nutricionais do leite, com exceção da lactose, reduzida durante a fermentação, revelando-se vantajoso para quem não digere bem o leite. Pode ser consumido como pequeno-almoço, almoço, lanche ou até mesmo jantar ou ceia (SILVA *et al.*, 2010).

A origem do iogurte não é um fato consolidado, mas existem alguns episódios espalhados pelo mundo que indiciam a idade deste alimento. Um destes episódios está relacionado com a descrição deste alimento como sendo mais digestivo quando comparado ao leite e o seu efeito benéfico e purificador no excesso de bÍlis e nos problemas de estômago. Este laticínio era considerado um medicamento, vendido apenas em farmácias, no entanto, o seu consumo generalizou-se na Europa, incluindo Portugal, e entrou nos consumos alimentares, a partir da década de 1950 (SILVA *et al.*, 2010).

Inicialmente, o consumo desse produto foi limitado, restringindo-se apenas a certos grupos étnicos. Em meados de 1960, a adição de frutas ao produto com o objetivo de atenuar o seu sabor ácido buscava conquistar maior aceitação popular. Ao mesmo tempo, aumentava-se o conhecimento de suas qualidades nutritivas e terapêuticas, levando a um grande aumento no seu consumo (MARAFON, 2010; TAMIME; ROBINSON, 2007).

Pela legislação brasileira (Resolução N° 5, de 13 de novembro de 2000) o iogurte é definido como um produto adicionado ou não de outras substâncias alimentÍcias, obtido por coagulação e redução do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctea mediante a ação proto-simbiótica de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, aos quais se pode acompanhar outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (ALMEIDA, 2008; BARBOSA *et al.*, 2013; BRASIL, 1998; BRASIL, 2000; BRASIL, 2007).

De acordo com a textura, pode-se dividir o iogurte em três categorias: iogurte de massa firme, de massa batida e de textura líquida, conhecidos como

tradicional, batido e líquido, respectivamente. O tradicional adquire consistência mais firme devido a fermentação ocorrer na própria embalagem final e não ocorrer quebra da massa. O batido resulta em um produto menos firme que o anterior pelo fato de ser incubado em fermenteiras, seguindo-se à quebra do coágulo para o envase (GRANATO, 2007; MARAFON, 2010).

A presença ou não de polpa de fruta e aroma adicionado também diferencia o iogurte, classificando-o como natural (ausência de fruta/aroma), com frutas (aromatização natural) ou aromatizado (flavorizantes) (MARAFON, 2010).

A preocupação da classe média e superior em manter um hábito de vida saudável está aumentando cada vez mais e esse comportamento se reflete na procura por alimentos que, preferencialmente, possuam efeitos fisiológicos e benefícios à saúde (BATISTA *et al.*, 2014). Os produtos lácteos se enquadram neste quesito, sendo uns dos mais vendidos dentre os alimentos funcionais no Brasil, contribuindo com 73 % do total de vendas (LOPES, 2010). Na última década, o brasileiro, principalmente a classe C, passou a incrementar os itens da alimentação. Com mais dinheiro no bolso, os iogurtes entraram para o carrinho de compras e desde 2000 o consumo do alimento quase triplicou no país. A demanda em alta abriu espaço para o lançamento de novos produtos e crescimento da concorrência (CASTRO, 2014).

Um dos fatores que contribuem com a aceitação do iogurte é a aromatização. Esta pode ser realizada com a adição de polpa de frutas *in natura*, sucos, ou saborizantes artificiais. Comumente, este alimento é comercializado com sabor de frutas temperadas como morango, ameixa e pêsego, sendo poucas as frutas tropicais utilizadas, a exemplo do coco. A exploração de novos sabores tropicais como o de banana, cajá, maracujá e umbu, pode conquistar o consumidor e contribuir com a diversificação do produto no mercado (BATISTA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012).

A elaboração do iogurte é uma técnica que cresce cada vez mais no mundo inteiro, antes preparado de forma simples e que atualmente vem se transformando em um processo bastante sofisticado (BARBOSA *et al.*, 2013). O sabor do iogurte é obtido pela reação simbiótica das culturas lácteas uma vez que as culturas empregadas na fermentação do iogurte levam à produção de ácido láctico, além do acetaldeído, diacetil, ácido acético e outras

substâncias voláteis, que são fundamentais para a qualidade sensorial do produto. O *Streptococcus termophilus* promove o crescimento dos *Lactobacillus*, removendo o oxigênio e promovendo a liberação de substâncias estimulantes, como ácido fórmico, pirúvico e CO<sub>2</sub>. Por outro lado, os *Lactobacillus* também estimulam os *Streptococcus* pela liberação de certos aminoácidos, principalmente glicina e histidina, necessárias para o seu crescimento e que são originados da degradação das proteínas do leite (BARBOSA *et al.*, 2013; TAMINE; ROBINSON, 1991).

De acordo com Tamine e Robinson (1991), o processo bioquímico que gera a alta acidez do iogurte é devido ao desenvolvimento do aroma e do sabor; no entanto, o pH normalmente usado para iogurte é de 4,2 - 4,4, pois uma produção exagerada de ácido conduz à alta acidificação durante a incubação, resfriamento e armazenamento do produto, o que não é desejável. As culturas clássicas podem ser adicionadas de *L. acidophilus* e bifidobactérias ou ambos, as quais contribuem com uma acidez não agressiva e com um sabor característico, além de apresentarem benefícios probióticos (TAMINE; ROBINSON, 1991).

Para a obtenção de um produto final com qualidade é necessária uma matéria-prima adequada e dentro dos padrões legais vigentes. Como em todo produto a ser desenvolvido, a matéria-prima a ser utilizada para a fabricação de iogurte deve ser de qualidade, obtida e manipulada adequadamente para evitar contaminações, além de ser de procedência confiável (ALMEIDA, 2008). Isolar microrganismos existentes no iogurte, além de estarem adaptados às condições existentes no corpo humano, não são patogênicos. Em adição a isso, pretende-se verificar quais desses microrganismos já utilizados na indústria de alimentos têm capacidade de degradar o glúten e a lactose, acrescentando assim no futuro duas qualidades desejáveis a mais nesses alimentos.

### **2.3. Queijos**

O queijo é um dos alimentos processados mais antigos da humanidade. Acredita-se que tenha originado há aproximadamente 8.000 anos no Iraque, entre os rios Tigre e Eufrates. Existem referências aos queijos nos escritos da

Grécia antiga, do Império Romano e da Bíblia. Uma das hipóteses sobre o início da fabricação de queijos propõe que a acidificação causada pelo crescimento de microrganismos no leite armazenado em clima quente causava sua coagulação. Outra propõe que a coagulação enzimática de leite armazenado em recipientes feitos com estômago de animais para viagens de nômades árabes resultava acidentalmente na produção de queijo (KOSIKOWSKI 1970 apud LIMA, 2005).

O queijo é um concentrado protéico-gorduroso constituído por caseína em forma de gel, matéria-graxa, ácido láctico e substâncias minerais, resultante de coagulação do leite (BEHMER, 1984). A caseína é o principal componente dos queijos e das coalhadas e é, juntamente com a albumina, fonte de certos aminoácidos essenciais ao organismo, como metionina, lisina e valina. Obtém-se a caseína pela precipitação natural (fermentação) ou com o auxílio de coalhos e ácidos (BECCHI, 2003; BEHMER, 1984; BOBBIO; BOBBIO, 1992).

O queijo é um alimento com alto valor nutritivo e pode ser armazenado por um período superior ao do leite, com menos riscos de perda do produto. Representa fonte de alimento e de renda para milhares de famílias que encontram nesta atividade seu principal meio de subsistência. A produção artesanal de queijos apresenta, além das relevantes questões sociais e econômicas, grande importância cultural. A extensão da fabricação em pequena escala ou caseira pode ser superficialmente avaliada pela quantidade de queijos artesanais ou semi artesanais que se encontra a venda em feiras populares, em todo o país, quase sempre vendidos frescos ou semi curados (LIMA, 2005).

Os queijos de um modo geral podem conter microrganismos desejáveis e indesejáveis. Os desejáveis são aqueles que podem contribuir positivamente para o desenvolvimento das características organolépticas do produto, podendo desta forma, exercer um efeito benéfico no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo por meio de sua atividade metabólica. Entretanto, alguns microrganismos indesejáveis podem ocorrer. São os assim chamados deteriorantes e/ou patogênicos, os quais vão exercer um efeito indesejável na qualidade sensorial do produto, podendo, em alguns casos, provocar doenças. A contaminação microbiana de queijos possui um importante impacto sócio-econômico ao se considerar as alterações organolépticas que podem ocorrer

no produto, além do risco de veiculação de microrganismos capazes de causarem infecções e toxinfecção alimentar (PEREIRA, 2007).

Os queijos regionais brasileiros obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras. A elevada proporção de casos de mastite no rebanho leiteiro, ao lado das deficiências na higiene da ordenha, são as principais causas da produção de leite com elevados teores de patógenos, notadamente *Staphylococcus aureus*, e conseqüentemente a produção de queijos frescos, com elevados níveis de contaminação bacteriana. Contribuem, também, para a má qualidade desses produtos, os processos improvisados de fabricação, geralmente em instalações deficientes e sem higiene, e o armazenamento, transporte e exposição a altas temperaturas. No comércio varejista, a contaminação pode ocorrer por manipulação, durante o retalho do produto e embalagem, ou no armazenamento em depósitos ou balcões não refrigerados (PINTO *et al.*, 1996).

O queijo, além de preservar o valor nutricional do leite aumentando o prazo comercial, é um produto mais estável, palatável e adaptado às necessidades do mercado, sendo recomendado em dietas de todas as faixas etárias (CORTEZ; CORTEZ, 2008). Esse derivado lácteo é o mais difundido em todo o mundo, e embora tenha um conceito de fabricação comum, a origem da matéria fluida e diferentes técnicas aplicadas em seu processamento, possibilitaram o surgimento de aproximadamente 2.000 tipos de variações (ALVES, 2013).

A indústria de queijo expandiu no Brasil nas últimas décadas (ARAÚJO *et al.*, 2001; SAPATA *et al.*, 2008) e a elaboração de queijo constitui uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios, sobretudo, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, cuja produção se concentra principalmente em indústrias de pequeno e médio porte. Sua fabricação originou-se no estado de Minas Gerais com procedimentos caseiros (OKURA, 2010; QUINTANA; CARNEIRO, 2007; SAPATA *et al.*, 2008).

No Brasil, a indústria de laticínio é expressiva, sendo que, em 2008, foram produzidos 22.654.082 litros de leite, destes 6.153.228 (27,2 %) litros foram produzidos no estado de Minas Gerais. Em 2002, foram produzidas

31.762 toneladas de queijo Minas e, em 2008, houve um aumento na produção de 4,5 % de queijo no Brasil (ANUALPEC, 2009).

No Brasil, os tipos de maior consumo compreendem o minas frescal e o mussarela, cuja produção concentra-se principalmente em indústrias de pequeno e médio porte das regiões Sul e Sudeste (BARROS *et al.*, 2004). O queijo minas frescal destaca-se entre os mais consumidos, principalmente pela sua disponibilidade nos pontos de venda, preço acessível, alto rendimento, processamento simples e breve período necessário para a maturação do produto final, possibilitando um retorno rápido do investimento e um incremento na renda em unidades de produção familiar (PINTO *et al.*, 1996; ZEGARRA *et al.*, 2009).

A microbiota presente e/ou a quantidade de microrganismos no queijo pode sofrer influência do estado de saúde do animal, das condições de higiene e limpeza do estábulo, dos equipamentos em contato com o leite, e das condições de higiene e saúde do pessoal que atua desde a ordenha até a elaboração do produto final. Também a forma de conservação do leite, o tipo de processamento, as condições de armazenamento e a qualidade microbiológica da água influenciam a flora microbiana presente no queijo (FURTADO, 1991; ZEGARRA *et al.* 2009). Os queijos, com exceção dos frescos, apresentam apenas traços de lactose, podendo ser ingeridos por mau absorvedores de lactose (ANTUNES; OLEJ, 2009).

Os estudos de bactérias presentes nos queijos e iogurtes são de interesse, visando obter isolados com potencial na produção de enzimas com aplicações na indústria alimentícia e biotecnológica.

## **2.4. Lactose**

A lactose (Galactose  $\beta$ -1,4 glucose) é o carboidrato característico do leite, sendo o constituinte predominante e menos variável da sua matéria seca. É o mais importante em quantidade dos sólidos não graxos (ALMEIDA, 2008; VEISSEYRE, 1988). É um dissacarídeo redutor sintetizado nas células alveolares das glândulas mamárias, formado por dois monossacarídeos, uma molécula de  $\alpha$ -d-glucose e uma de  $\beta$ -d-galactose, sendo um dos componentes quase que exclusivos do leite (5 % da composição molecular) e tem como

principal função melhorar a absorção de cálcio, ferro e fósforo (BARBOSA; ANDREAZZI, 2010; CARMINATTI, 2001; PERATI *et al.*, 2014; VOGEL, 2000).

Sua concentração no leite de vaca é de 4,6 %, cabra e búfala de 4,2 %, elefante 8,8 %, coelha e baleia em torno de 1,8 %, enquanto que no leite humano é de 6,8 % (BACELAR JUNIOR, 2013). A lactose é o composto sólido em maior quantidade no leite desnatado, aproximadamente 50 %, e no soro em torno de 70 a 80 % (CARMINATTI, 2001). Industrialmente, a fermentação da lactose por ação de microrganismos que a transforma em ácido láctico ocupa grande lugar de destaque, sendo utilizada para a obtenção de vários derivados lácteos como iogurte, leite fermentado, queijos, requeijões e outros (ALMEIDA, 2008; VEISSEYRE, 1988).

A lactose apresenta-se em duas formas anoméricas, alfa e beta (que são responsáveis pelas diferentes propriedades deste açúcar). Na temperatura do corpo do animal, encontra-se em equilíbrio, com duas partes de  $\alpha$ -lactose e três de  $\beta$ -lactose (FISCHER, 2010). A estrutura molecular básica de uma molécula de  $\alpha$ -lactose e  $\beta$ -lactose está representada na figura 6.

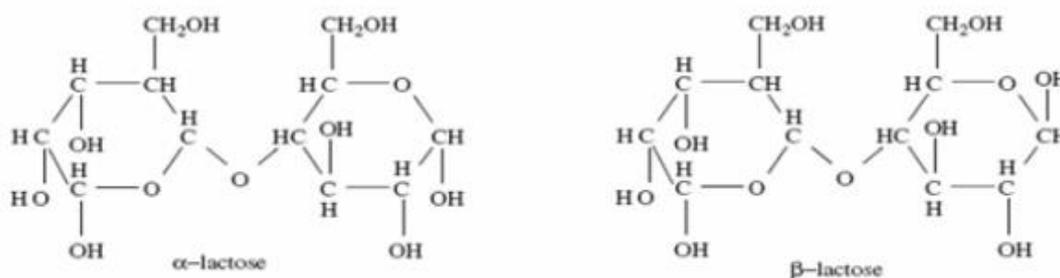


Figura 6. Estrutura molecular básica de uma molécula de  $\alpha$ -lactose e  $\beta$ -lactose (ALMEIDA, 2008).

A lactose, quando em solução, está sujeita ao fenômeno de mutarrotação, ou seja, pode ocorrer uma mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio do grupo redutor da lactose, fazendo com que a forma  $\alpha$  se transforme em  $\beta$  e vice-versa. Essa mutarrotação é muito importante no processo de cristalização da lactose (FISCHER, 2010).

### 2.4.1. Hidrólise da lactose

É um processo promissor a nível industrial, pois possibilita o desenvolvimento de novos produtos para consumidores intolerantes a esse carboidrato, além de oferecer certas vantagens tecnológicas, como a diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos (leite condensado e iogurte) e o aumento do poder adoçante (FISCHER, 2010).

A reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose (Figura 7). Na prática, dependendo das condições, a mistura isomolecular não é alcançada, pois a galactose pode polimerizar ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos (GEKAS; LÓPES-LEIVA, 1985).

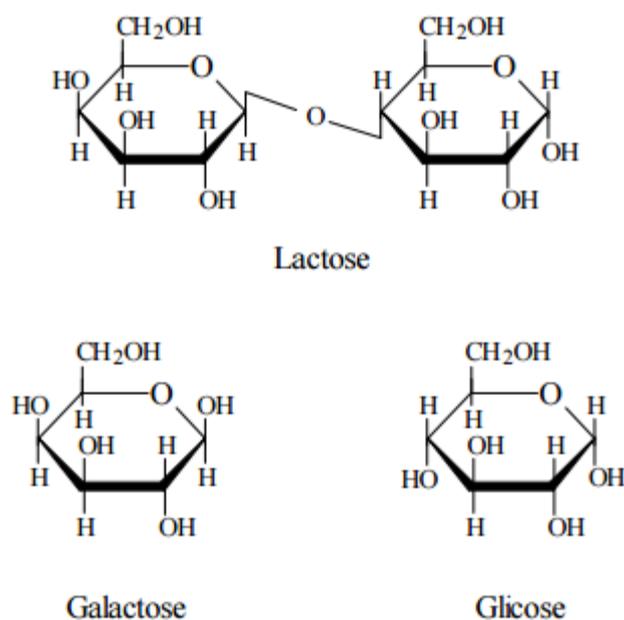


Figura 7. Estruturas da lactose, galactose e glicose (CARMINATTI, 2001).

A hidrólise da lactose pode ser aplicada para evitar a intolerância à lactose em humanos, prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvete, ou na produção de produtos fermentados, como iogurte. Dependendo do nível da hidrólise, o leite com lactose pré-digerida terá um gosto ligeiramente mais doce pelo poder do adoçante mais elevado da glicose + galactose em comparação com a lactose (CARMINATTI, 2001; OBÓN *et al.*, 2000).

## 2.4.2. Métodos de hidrólise da lactose

Existem dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose: o método ácido e o método enzimático (Figura 8). A reação é muito rápida quando são utilizados ácidos como catalisadores. A temperatura da reação no tratamento ácido é muito maior que no tratamento enzimático (100-150 °C vs 30-40 °C, respectivamente), mas os produtos adquirem cor e odor que impedem sua utilização direta em alimentos, além de causar desnaturação das proteínas do leite (FISCHER, 2010; LADERO *et al.*, 2000;).

A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou soro sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as suas propriedades, aumentando seu poder adoçante relativo (FISCHER, 2010; LADERO *et al.*, 2000).

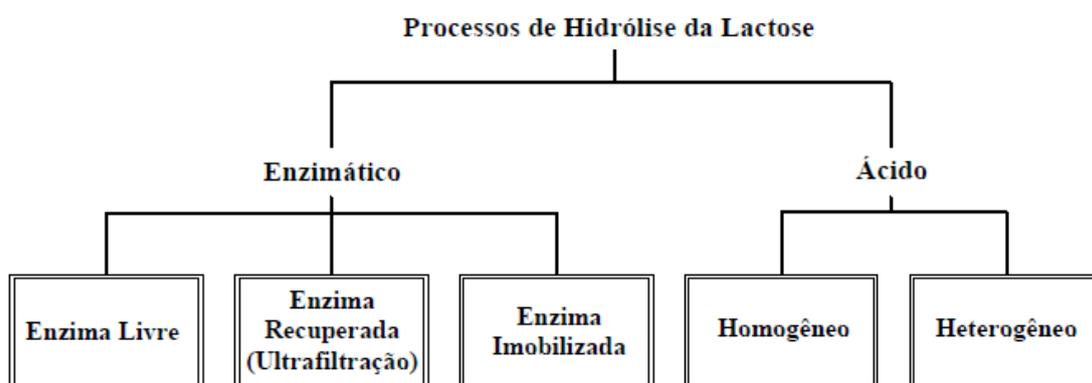


Figura 8. Processos de Hidrólise da lactose (HOBMAN, 1984).

O uso de enzimas permite condições mais moderadas de temperatura e pH e não causa problemas nos produtos obtidos, como a desnaturação das proteínas, que podem estar presentes na solução de lactose, a produção de uma cor marrom na solução, e o rendimento de subprodutos indesejáveis, normais nos métodos ácidos. Assim, para aplicações na indústria de alimentos, o método mais recomendável é o enzimático (SANTOS *et al.*, 1998; CARMINATTI, 2001).

A hidrólise enzimática da lactose é um processo complexo que envolve uma grande quantidade de reações sequenciais, formando sacarídeos como produtos intermediários (CARMINATTI, 2001).

Com o desenvolvimento das lactases comerciais, houve uma grande melhora nas técnicas empregadas na hidrólise enzimática. A enzima pode ser utilizada de três formas: em batelada (*single use*), recuperada por membrana ou imobilizada. Nos processos em batelada, a enzima adicionada no início do processo de hidrólise é perdida quando o hidrolisado é pasteurizado. A recuperação por membrana é utilizada quando se tem interesse em impedir que a enzima seja perdida, de modo a poder reutilizá-la, mantendo a enzima na forma livre. No processo de imobilização, a enzima é fixada fisicamente ou quimicamente a um suporte sólido, de modo a impedir a sua livre circulação (FODA; LOPES-LEIVA, 2000).

O processo da hidrólise enzimática é conhecido e utilizado em escala industrial, onde a enzima  $\beta$ -galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação  $\beta(1-4)$  da molécula de lactose, dando origem aos seus monômeros, glicose e galactose (FODA; LOPES-LEIVA, 2000; FISCHER, 2010) (Figura 9).

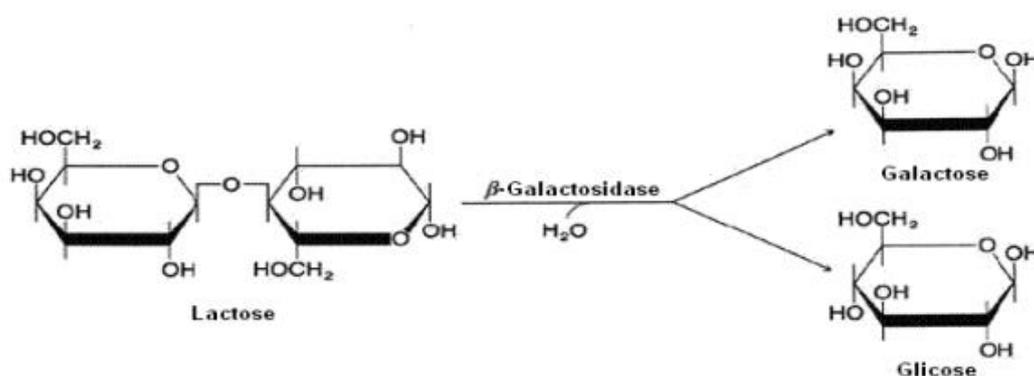


Figura 9. Hidrólise enzimática de lactose catalisada por  $\beta$ -galactosidase (CARMINATTI, 2001).

As  $\beta$ -galactosidases usadas em escala industrial devem ser provenientes de microrganismos *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. As enzimas obtidas de fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) e de leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*) possuem grande uso comercial. Algumas características importantes para uso da enzima em processos industriais são o pH ótimo de atuação, a termoestabilidade e a elevada atividade enzimática a baixas temperaturas (HUSAIN, 2010).

Diversos trabalhos sobre a hidrólise da lactose têm sido apresentados na literatura:

Xuemei Li, Zhou e Chen (2007) estudaram a hidrólise da lactose do leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em tecido de algodão e ligação cruzada com glutaraldeído em reator de leito fixo. Apesentaram 95 % de conversão da lactose após 2 horas de operação em batelada com reciclo.

Bakken, Hill e Amudson (1990) imobilizaram a  $\beta$ -galactosidase obtida de *Aspergillus oryzae* em um reator de fluxo axial-anular para hidrolisar a lactose de leite desnatado. Utilizando um tempo de resistência de 10 minutos e temperatura de 40 °C, 70 % da lactose foram hidrolisados no reator.

Yang e Okos (1989) estudaram a hidrólise da lactose utilizando  $\beta$ -galactosidase obtida de *Aspergillus niger* imobilizada em uma resina de fenol-formaldeído. Os resultados mostraram que a temperatura ótima de operação para este método depende do tempo de operação, mas é independente da concentração inicial ou da conversão de lactose.

## 2.5. Enzimas

A ação dos microrganismos é através de enzimas, que são um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente proteica (existem também enzimas constituídas de RNA, as ribozimas), com atividade intra ou extracelular que catalisam reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam. Isso é conseguido por meio do abaixamento da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou na alimentar (JAYANI *et al.*, 2005).

Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um conjunto de enzimas, o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI *et al.*, 2005). Além disso, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001).

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos e que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos. São substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas, desde os mais simples, como vírus, bactérias e outras formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos, como as plantas e animais. A maioria das enzimas se encontra e atua no interior das células (endocelulares), enquanto algumas são excretadas para fora da célula viva (exocelulares) para atuarem externamente, como por exemplo, as amilases fúngicas (SPIER, 2005). As enzimas de origem microbiana representam as melhores fontes de uso biotecnológico, devido à sua ampla diversidade bioquímica e sua susceptibilidade de manipulação genética (ALTAMIRANO *et al.*, 2000).

Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não dependem das intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo são finamente controladas por monitores eletrônicos. Some-se a este fato a enorme biodiversidade de microrganismos disponíveis nos mais variados habitats da natureza. Microrganismos que vivem em condições extremas, por exemplo, de pH ou temperatura, sintetizam enzimas que propiciam sua sobrevivência nestas condições (SAID; PIETRO, 2004).

As enzimas de origem microbiana ocupam lugar de destaque no mercado biotecnológico, sendo inúmeras as aplicadas em processos industriais e comercializadas em grandes quantidades, como as proteases bacterianas na indústria de detergentes e couro, as amilases fúngicas e bacterianas na indústria do amido e panificação, as celulases e pectinases na indústria têxtil e de sucos naturais entre outras (SAID; PIETRO, 2004).

No caso das indústrias de leite, iogurte e queijos, as enzimas têm uma importância substancial, pois são elas que dão os diferentes sabores e texturas desses produtos. As lactases são as mais importantes, pois degradam a lactose presente nos leites.

As enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de microrganismos. As enzimas são proteínas vitais que catalisam reações bioquímicas com grande especificidade, sendo capazes de aumentar

em até  $10^{14}$  vezes a velocidade de algumas reações sem necessitar de condições extremas de pH, pressão e temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em muitos processos, as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para os processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio de sua biodegradabilidade e do menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas (PALMA-FERNANDEZ; GOMES, 2002).

### **2.5.1. Atividade Enzimática**

Segundo Radzicka e Wolfenden (1995), as enzimas convertem uma substância, chamada de substrato, em outra denominada produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. Isso significa que, em geral, uma enzima catalisa um e só um tipo de reação química. Consequentemente, os tipos de enzimas encontradas numa célula determinam o tipo de metabolismo que a célula efetua. A velocidade da reação é catalisada por uma enzima e aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação necessária para converter o substrato no produto. O aceleração da reação pode ser da ordem dos milhões de vezes: por exemplo, a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase diminui o tempo da reação por ela catalisada de 78 milhões de anos para 25 milissegundos.

Como são catalisadores, as enzimas não são consumidas na reação e não alteram o equilíbrio químico dela. A atividade enzimática pode depender da presença de determinadas moléculas, chamadas de cofatores. A natureza química dos cofatores é muito variável, podendo ser, por exemplo, um ou mais íons metálicos (como o ferro), ou uma molécula orgânica (como a vitamina B12). Estes cofatores podem participar ou não diretamente na reação enzimática. Algumas substâncias podem inibir a atividade de algumas enzimas, diminuindo-a ou eliminando-a totalmente; são os chamados inibidores enzimáticos.

Pelo fato de serem proteínas com estrutura terciária ou quaternária, as enzimas são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas cadeias polipeptídicas, o que lhes confere uma forma característica e exclusiva. Assim, diferentes enzimas têm diferentes formas e, portanto, diferentes papéis

biológicos. Para que uma enzima atue, é necessário que os substratos "se encaixem" na enzima. Esse "encaixe", porém, depende da forma, isto é, do "contorno" da enzima. Por isso, substratos que se "encaixam" em uma determinada enzima não se "encaixam" em outras diferentes, e a reação não ocorre; daí a especificidade das enzimas quanto aos substratos em que atuam. Uma vez ocorrido o "encaixe", forma-se o complexo enzima-substrato, que se assemelha ao sistema "chave-fechadura".

O local da enzima onde o substrato se "encaixa" é denominado sítio ativo (ou centro ativo). No caso de substâncias que reagem entre si, sob a ação catalisadora das enzimas, a reação é facilitada, tornando-se mais rápida, pois a proximidade entre as moléculas "encaixadas" acelera o processo reativo; após a reação, a enzima desliga-se do substrato e permanece intacta.

### 2.5.2. Cinética enzimática

Cinética enzimática é definida como o estudo da velocidade da reação enzimática e como ela é alterada devido às mudanças nas condições experimentais, principalmente em respeito à concentração de enzima, concentração de substratos, inibidores e ativadores, pH, força iônica e temperatura. O estudo da cinética enzimática se faz necessário para conhecer as melhores condições para a ação da enzima e os efeitos de diversos fatores sobre ela, visando medir as velocidades das transformações que se processam, estudar a influência de condições de trabalho (pH, temperatura e outros), correlacionar as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam, colaborar com a otimização e estabelecer critérios para o controle do processo, e projetar o reator mais adequado (FISCHER, 2010; SEGEL, 1993).

A equação mais adequada para medir a velocidade da reação enzimática é a de Michaelis-Menten (FISCHER, 2010):

$$v = \frac{V_m * S}{K_m + S}$$

Sendo:

$v$ = velocidade de reação;

$V_m$ = velocidade limitante de uma reação catalisada por enzima nas condições de saturação, sendo denominada velocidade ou taxa máxima da reação;

$K_m$ = constante do modelo de Michaelis-Menten;

$S$ = substrato.

A hidrólise de lactose em glicose e galactose tem sido descrita por diversos autores utilizando enzimas obtidas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Em geral, a modelagem utiliza alguma forma da equação de Michaelis-Menten, que fornece a relação entre a velocidade de hidrólise do substrato e a concentração do substrato limitante (FISCHER, 2010; GHALY; BEN-HASSAN, 1995; SORENSEN; NOVAK, 1996).

### **2.5.3. Estruturas e mecanismos das enzimas**

Trabalhos publicados pela The Catalytic Site Atlas at The European Bioinformatics Institute (2015) afirmam que as enzimas são proteínas, e podem ter um tamanho desde 62 resíduos de aminoácidos, como é o caso do monômero da enzima 4-oxalocrotonato tautomerase, até um tamanho de 2.500 resíduos, como é o caso da sintase de ácidos graxos. A atividade das enzimas é determinada pela sua estrutura quaternária. A maioria das enzimas é maior do que o substrato sobre o qual atuam, e só uma pequena porção da enzima (cerca de 3-4 aminoácidos) está envolvida na catálise. A região que contém estes resíduos catalíticos, que se liga ao substrato e que desempenha a reação, é denominada de sitio ativo.

As enzimas também podem ter sítios onde se ligam cofatores, que são necessários às reações catalíticas. Algumas enzimas também podem ter sítios de ligações para pequenas moléculas, que são produtos ou substratos, diretos ou indiretos, da reação catalisada. Estas ligações servem para aumentar ou diminuir a atividade da enzima, providenciando um meio de regulação por *feedback*.

Tal como todas as proteínas, as enzimas são formadas por longas cadeias lineares de aminoácidos que sofrem um enovelamento que tem como resultado um produto com estrutura tridimensional. Cada sequência única de aminoácidos produz também uma estrutura tridimensional única que tem

propriedades específicas. Cadeias individuais de proteínas podem por vezes agrupar-se para formar um complexo proteico. A maioria das enzimas pode sofrer desnaturação, isto é, a sua estrutura pode sofrer desagregação e inativação pelo aumento de temperatura, o que provoca alterações na conformação tridimensional da proteína. Dependendo da enzima, a desnaturação pode ter efeitos reversíveis ou irreversíveis.

#### **2.5.4. Especificidade das enzimas**

As enzimas possuem normalmente uma alta especificidade em relação às reações que catalisam e aos substratos que estão envolvidos nessas reações. A forma complementar, carga e características hidrofílicas ou hidrofóbicas, são responsáveis por esta especificidade. As enzimas exibem também elevados níveis de estereoespecificidade, regioselectividade e quimioselectividade. Algumas das enzimas que apresentam maior especificidade e precisão estão envolvidas na cópia e expressão do genoma. Estas enzimas possuem mecanismos de *proof-reading* (revisão). Um destes casos é a DNA polimerase, que catalisa uma reação num primeiro passo, para em seguida confirmar, num segundo passo, se o produto é o correto. Este processo em duas etapas resulta em médias de taxa de erro muito diminutas, na ordem de uma para cem milhões de reações, no caso de polimerases de mamíferos. Mecanismos de revisão similares também podem ser encontrados na RNA polimerase, na aminoacil-tRNA sintetases e em ribossomas (BERG *et al.*, 2002).

Algumas enzimas que produzem metabolitos secundários são descritos como *promiscuos*, visto que podem atuar num largo espectro de diferentes substratos. Tem sido sugerido que este tipo de especificidade alargada é importante nos processos de evolução de novas vias de biossíntese (BERG *et al.*, 2002). Este fato explica como a enzima produzida por um microrganismo pode atuar tanto no glúten quanto na lactose.

## 2.6. Lactase

Lactase, também conhecida como lactase florizina hidrolase, é o nome utilizado para a enzima  $\beta$ -D-galactosidase ou mais formalmente  $\beta$ -D-galactosidase galactohidrolase. Essa enzima catalisa a hidrólise de lactose e arabinoses, sendo capaz ainda de catalisar a síntese de certos oligossacarídeos (CARMINATTI, 2001; RICHMOND *et al.*, 1981).

A lactase é uma enzima que se localiza na superfície da borda em escova da mucosa intestinal, embora seus níveis sejam mais altos no jejuno proximal e mais baixos no duodeno e íleo distal, de tal sorte que alterações morfológicas, de qualquer etiologia, podem levar a uma deficiência de lactase, o que diminui a capacidade do organismo de hidrolisar a lactose (AURICCHIO; TRONCONE, 2000; COROZOLLA; RODRIGUES, 2016; FARIAS; FAGUNDES NETO, 2004; PERATI *et al.*, 2014), condição conhecida por intolerância à lactose.

Nos seres humanos, a atividade da lactase é detectada por volta do terceiro mês de gestação, mas com valores muito baixos, só aumentando a partir da 26ª semana. Na 34ª semana atinge 30 % dos valores do recém-nascido, aumenta rapidamente entre a 36ª e 38ª semanas, e ao termo os seus valores equivalem aos de uma criança de um ano de idade (BULHÕES, 2006; MOBASSALECH *et al.*, 2003).

As propriedades das  $\beta$ -galactosidases dependem da sua fonte, sendo possíveis fontes para sua obtenção plantas (pêssego, amêndoa, algumas espécies de rosas selvagens), órgãos animais (intestino, cérebro e tecido da pele), bactérias (*Escherichia coli*, *Bacillus sp*, *Lactobacillus bulgaricus* e outras), enzimas intracelulares – leveduras (*Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces fragiles*) e enzimas extracelulares – fungos (*Aspergillus niger*, *A. foetidus*, *A. oryzae* e outros) (CARMINATTI, 2001).

Diversos estudos sobre a lactase foram conduzidos, incluindo tópicos como: fontes para obtenção da enzima, métodos de isolamento e purificação, técnicas de ensaio, propriedades físico-químicas (tamanho, forma, desnaturação pelo calor, influência do pH), problemas relativos à hidrólise da lactose (biológicos e industriais) e disposição dos resíduos gerados na hidrólise (RICHMOND *et al.*, 1981)

Nem todas as lactases são aceitas ou reconhecidas como seguras para utilização na indústria de alimentos. Enzimas extraídas de *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *Saccharomyces* sp. são consideradas seguras, devido ao histórico de suas aplicações e aos numerosos estudos realizados (CARMINATTI, 2001; GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985).

### 2.6.1. Deficiência de lactase

Há três tipos de deficiência de lactase:

*Deficiência genética, primária congênita ou primária:* é uma disfunção rara resultante de herança autossômica recessiva (SHUKLA, 1997). Há poucos casos documentados no mundo, quase todos na Finlândia (VESA *et al.*, 2000) e nenhum no Brasil. Os bebês que apresentam essa condição nascem saudáveis e apresentam os sintomas nos primeiros dias de vida (distensão abdominal, vômitos, diarreia líquida volumosa e de odor ácido) quando amamentados com leite materno ou alimentados com fórmulas lácteas. Outros sintomas que podem ocorrer são: dermatite perianal e parada do crescimento se o leite for mantido (AGGETT *et al.*, 2003). O diagnóstico deve ser precoce em razão do elevado risco de desidratação e risco de morte.

*Deficiência secundária:* é decorrente de condições patológicas que afetam a integridade da mucosa gastrointestinal, sejam elas permanentes (doença celíaca, galactosemia, doença de Crohn, retrocolite ulcerativa, fibrose cística, grandes ressecções intestinais) ou transitórias (parasitoses, gastroenterites, infecção por rotavírus, subnutrição proteico-calórica). Em todas essas condições as alterações histológicas da mucosa intestinal se tornam evidentes. Nas condições transitórias observa-se intolerância temporária à lactose que se normaliza com a cura da infecção (VESA *et al.*, 2000).

*Hipolactasia do adulto:* caracteriza-se por diminuição da quantidade de lactase produzida após o desmame. Essa condição é geneticamente determinada e permanente (RUSYNYK; STILL, 2001) e é um caráter autossômico recessivo, enquanto que a persistência da atividade da enzima ao longo da vida é um traço autossômico dominante (MONTGOMERY *et al.*, 1991). As manifestações dessa deficiência costumam ser evidentes por volta dos 2 aos 15 anos de idade, dependendo de condições raciais e culturais (DUMOND *et al.*, 2006).

Alguns dos sintomas são distensão abdominal, flatulência e cólica abdominal do tipo recorrente, em cólica espasmódica, periumbical ou difusa no abdome, de intensidade variável (FARIAS; FAGUNDES NETO, 2004).

Um estudo publicado pela Mathieson (2015) relata a comparação da análise genômica de antigos restos humanos com a de humanos atuais, na qual identifica genes específicos que mudaram durante e depois da transição na Europa da caça para a agricultura cerca de 8.500 anos atrás. Muitos dos genes estão associados com a altura, a imunidade, a digestão da lactose, a pigmentação da pele, cor dos olhos azul e risco de doença celíaca. A introdução da agricultura para a Europa mudou a forma como as pessoas viviam e até o seu DNA. Usando as melhores técnicas de extração de DNA e acumulando o que é até hoje a maior coleção de conjuntos de dados do genoma de antigos restos humanos, a equipe de Harvard foi capaz de identificar genes específicos que mudaram durante e após a transição da caça e repleção para a agricultura, onde muitas das variantes ocorreram em ou perto de genes que têm sido associados com a altura, a capacidade de digerir lactose na fase adulta, metabolismo de ácidos graxos, os níveis de vitamina D, a pigmentação da pele e cor dos olhos azul. Duas variantes aparecem em genes que têm sido associados a um maior risco de doença celíaca, mas que podem ter sido importantes na adaptação a uma dieta agrícola. Esse estudo explica o porquê de algumas pessoas terem intolerância, já que seus genes, e dos seus antepassados, não se adaptaram a essa mudança na alimentação.

A lactose não digerida, conforme passa pelo cólon, é fermentada por bactérias, havendo produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e gases (TÉO, 2002). Isto resulta em diversos sinais e sintomas clínicos, como: diarreia significativa acompanhada de desidratação, principalmente nas crianças de baixa idade, diarreia explosiva logo após a ingestão do alimento, assadura perianal, distensão e dor abdominal, flatulência, desnutrição, acidose metabólica, e enterite necrosante (LOPES *et al.* 2008; MORIWAKI; MATIOLI, 2000; SABRA; WILLS, 1994; TÉO, 2002;).

Diante de um quadro clínico que leve a suspeita de intolerância à lactose, deve-se iniciar a investigação diagnóstica por uma anamnese dirigida, seguida de exame físico detalhado e testes que avaliem a digestão e absorção desse carboidrato. Os exames complementares disponíveis são a pesquisa de

açúcar nas fezes, a determinação do pH fecal, o teste de tolerância com sobrecarga oral de lactose, o teste de hidrogênio expirado, a biópsia intestinal, entre outros (LOPES *et al.*, 2008; TEVES *et al.*, 2001).

### **2.6.2. Intolerância à Lactose**

A intolerância à lactose vem chamando atenção dos órgãos públicos de saúde devido ao aumento dos casos, principalmente em adultos. No entanto, é necessário saber diferenciá-la da alergia ao leite. No caso de o indivíduo ter alergia, os sintomas podem ser mais graves, incluindo congestão respiratória, edema, coceiras, vermelhidão pelo corpo e vômito. Dependendo do grau de alergia e da quantidade de proteína de leite que a pessoa consumir, o problema pode ser ainda pior. Neste caso, como existem diferentes formas de manifestação dos sintomas, o tratamento consiste em retirar todos os alimentos que contenham ou possam conter leite em sua formulação (leite de vaca, leite de cabra, queijo fresco, manteiga, requeijão, creme de leite, iogurtes, bolachas, bolos e pudins, adoçantes em pó) e substituí-los por produtos específicos para pessoas com intolerância (leite sem lactose, leite de soja, leite de arroz e outros produtos sem lactose) (VILATI, 2014).

A remoção da lactose do leite tem sido estudada devido aos problemas nutricionais (intolerância à lactose) e aos interesses tecnológicos (solubilidade, poder adoçante e funcionalidade) envolvido no desenvolvimento de produtos baseados na indústria laticínica (leite deslactosado, iogurte adoçado, produtos derivados de leite com baixa concentração de lactose, xaropes alimentícios e produtos adoçados, tratamento enzimático com lactose extraída durante a produção de queijo e outros) (RICHMOND *et al.*, 1981)

A má absorção ou má digestão de lactose é a diminuição na capacidade de hidrolisar a lactose, que é resultante da hipolactasia, que significa diminuição da atividade de enzima lactase na mucosa do intestino delgado, também denominada recentemente de “lactase não persistente”. O aparecimento de sintomas abdominais por má absorção de lactose caracteriza a intolerância à lactose (MATTAR; MAZO, 2010; PERATI *et al.*, 2014).

Bezerra (2015) fala que a alergia à lactose ocorre devido a uma resposta do sistema imunológico a algo não reconhecido pelo organismo, causando

intoxicação, irritações na pele e, quando se trata de uma alergia alimentar, reações gastrointestinais. Com a intolerância é diferente, pois não ocorre essa mobilização do sistema imunológico, e sim a ausência parcial ou total da enzima lactase, fazendo com que a lactose chegue intacta ao intestino, onde será fermentada pelas bactérias ali presentes, causando os sintomas característicos como produção de gases, dores abdominais e outros.

A má absorção de lactose nem sempre provoca sintomas de intolerância. Após o desmame, ocorre uma redução geneticamente programada e irreversível da atividade da lactase na maioria das populações do mundo, resultando em má absorção primária de lactose. Porém, a hipolactasia também pode ser secundária a doenças que causem dano na borda em escova da mucosa do intestino delgado ou que aumentem o tempo de trânsito intestinal, como nas enterites infecciosas, giardíase, doença celíaca, doença inflamatória intestinal, enterites induzidas por drogas ou radiação, doença diverticular do cólon e anemia (estudo em ratos, mostrando diminuição na expressão gênica). Diferentemente da hipolactasia primária do adulto, a hipolactasia secundária é transitória e reversível (MATTAR; MAZO, 2010).

Segundo Siddiqui e Osayande (2011), a prevalência da intolerância à lactose é a seguinte:

- 95 a 100 % das populações da Ásia;
- 80 a 100 % das populações nativas americanas;
- 60 a 80 % de judeus Ashkenazi e populações africanas;
- 50 a 80 % das populações hispânicas;
- 60 a 70 % das populações do sul do subcontinente indiano;
- Apenas 6 a 22 % da população branca sofre de deficiência primária tipo adulto de lactase.

Os estudos de Mathieson (2015) citados anteriormente tinham o objetivo de melhorar o entendimento sobre a mudança alimentar do ser humano e sua adaptação a ela, explicando o porquê de ocorrerem intolerâncias e alergias alimentares.

Estudos vêm sendo realizados com vistas a tentar resolver esse problema de intolerância à lactose. Duas principais estratégias podem ser usadas:

- a) Eliminar a lactose dos alimentos antes que sejam ingeridos.
- b) Introduzir uma microbiota no trato digestório dos indivíduos intolerantes, para que ela atue durante o processo de digestão, possibilitando ingerir alimentos que contêm essas duas substâncias.

Exemplos de estudos realizados sobre a estratégia “b” são os de De Graaf e Venema (2007), Egert *et al.* (2007), He *et al.* (2008) e Lomer *et al.* (2007).

## 2.7. Doença Celíaca

A primeira alusão à doença celíaca (DC) remonta ao ano 200 da era cristã, mas foi só em 1888 que Samuel Gee a descreveu nos termos atuais. Em meados do século XX, Willem Karel Dicke (1950), um pediatra Holandês, estabeleceu uma relação entre a DC e a ingestão de trigo (FARO, 2008; RODRIGUES, 2013). Em 1953, Van de Kamer e colaboradores demonstraram que o agente responsável pela lesão intestinal era a fração proteica do trigo, o glúten. Em 1954, Paulley descreveu pela primeira vez as lesões intestinais causadas pela DC.

A doença celíaca, também conhecida como enteropatia sensível ao glúten, é uma doença intestinal inflamatória crônica, autoimune permanente, que se manifesta em indivíduos com predisposição genética através da ingestão de prolaminas (MEIRINHO, 2009; MORÓN *et al.*, 2009). É causada por uma intolerância permanente ao glúten (HILL *et al.*, 2005). A fração tóxica do glúten é a gliadina, sendo esta a responsável pelas manifestações clínicas da doença (MCGOUGH; CUMMINGS, 2005). Tem prevalência entre 0,5-1,0 % da população mundial, mas entre os pacientes diabéticos é maior, variando entre 2,2 % e 13,8 % (3,4), com uma média de 4,1 % nos países europeus (MONT-SERRAT *et al.*, 2008).

A toxicidade está relacionada com a inativação inadequada das células-T intestinais, que reconhecem os péptidos de gliadinas modificados pela enzima transglutaminase tisidular (tTG ou TG2) nos indivíduos que apresentam moléculas celulares HLA-DQ2/DQ8 ativadas pelos péptidos da gliadina do trigo e prolaminas relacionadas da cevada e centeio (MEIRINHO,

2009). O tratamento para essa doença é basicamente dietético e consiste na exclusão completa de todos os alimentos feitos com ingredientes que contenham o glúten pelo resto da vida (SILVA, 2010a). A exclusão do glúten não cura a doença, mas a mantém sob controle (PIETZAK, 2005).

Nos últimos anos, tem-se verificado uma melhoria significativa no diagnóstico da doença, não só pela compreensão e descoberta de uma variedade de manifestações associadas a esta patologia, mas também pelo desenvolvimento de testes mais específicos e sensíveis (FASANO; CATASSI, 2001; RODRIGUES, 2013). O diagnóstico deve ser baseado no exame clínico, por meio de exame físico e anamnese detalhada, além de análise histopatológica do intestino delgado, e dos marcadores séricos. O diagnóstico final deve ser pela biópsia intestinal, a qual deve revelar a anormalidade da mucosa do intestino delgado proximal, com vilosidades atrofiadas ou ausentes, aumento no comprimento das criptas e no número de linfócitos intra-epiteliais (FARO, 2008).

Alguns sintomas de DC, segundo Faro (2008), são:

- Em crianças: deficiência do desenvolvimento, perda de peso, baixa estatura, vômitos, diarreia, dor abdominal recorrente, enfraquecimento muscular, intestino irritável, hipoproteinemia, irritabilidade e tristeza.
- Em adultos: diarreia crônica, perda de peso, anemia, distensão abdominal, cansaço e mal-estar.

O tratamento deve ser realizado tanto em pacientes sintomáticos quanto nos assintomáticos com alterações histológicas, sendo que na maioria dos casos os sintomas desaparecem. A substituição dos alimentos com glúten geralmente é realizada usando milho, fubá, arroz, batata, mandioca, polvilho doce e azedo (derivados da fécula da mandioca), soja e suas farinhas (SILVA, 2010a). Também é permitido o consumo de laticínios, ovos, carnes, vegetais e frutas (FARO, 2008).

A lei federal N° 10.674, de 16 de maio de 2003, exige que as embalagens dos produtos alimentícios contenham a informação de contem ou não contem glúten, como tentativa de medida preventiva e de controle para a DC (FARO, 2008; PLANALTO DO GOVERNO, 2016).

Estudos usando microrganismos para amenizar os efeitos da doença já estão sendo realizados. Um exemplo é o artigo de Di Cagno *et al.* (2002) em que bactérias lácticas foram utilizadas na hidrólise de proteínas, incluindo uma que é tóxica para os celíacos, e verificaram resultados positivos. Outros exemplos são os trabalhos de Auricchio *et al.* (1984) e Picarelli *et al.* (1999), nos quais foram realizados testes para facilitar a identificação de peptídeos tóxicos e estimar sua danificação sobre o intestino de pessoas celíacas, além do efeito de ácido láctico produzidas por bactérias lácticas sobre esses peptídeos.

## **2.8. Glúten**

A importância do glúten na indústria alimentar deve-se essencialmente às propriedades das suas proteínas. Estas desempenham um papel fundamental na determinação da qualidade do trigo, especialmente no cozimento ao conferir capacidade de absorção da água, retenção de gás, coesividade, viscosidade e elasticidade à massa (MEIRINHO, 2009). Está presente em cereais como o trigo, o centeio, a cevada e a aveia (HILL *et al.*, 2005).

As proteínas presentes no glúten podem ser divididas em duas frações principais de acordo com a sua solubilidade numa solução de etanol e água: gliadinas, caso sejam solúveis, e gluteninas, caso sejam insolúveis. Ambas as frações apresentam elevados conteúdos em glutamina e prolina (MEIRINHO, 2009; WIESER, 2007).

As propriedades reológicas das massas são condicionadas pelo teor em gliadinas e gluteninas. As gluteninas quando hidratadas são coesas e elásticas, e são responsáveis pela força e elasticidade da massa. Em contraste, as gliadinas quando hidratadas têm pouca elasticidade e são menos coesas que as gluteninas; contribuem principalmente para a viscosidade e extensibilidade da massa (DONG *et al.*, 2009; WIESER, 2007).

Glúten de trigo é um termo geral para as proteínas da farinha de trigo pouco solúveis em água. De um ponto de vista bioquímico, o glúten é uma mistura de quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e globulinas são aproximadamente 15 % das

proteínas. Os restantes 85 % correspondem às proteínas monomérica e polimérica, denominadas gliadina e glutenina (Figura 10), dos quais 40 % são gliadinas (PALMU, 2003).

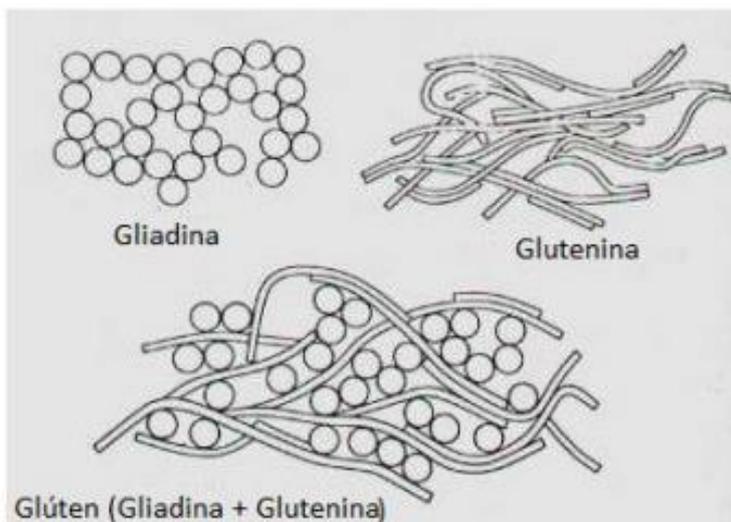


Figura 10. Constituição do glúten (QUAGLIA; MATEOS-NEVADO, 1991).

As gliadinas e gluteninas se encontram em quantidades aproximadamente idênticas no glúten de trigo e podem ser diferenciadas se tendo em conta a solubilidade de cada fracção em etanol: as gliadinas são solúveis numa solução aquosa de etanol (por exemplo 60 %), enquanto as gluteninas são insolúveis nesta mesma solução. Estas duas fracções são caracterizadas por elevadas quantidades de glutamina e prolina, e por baixas quantidades de aminoácidos com grupos laterais carregados (WIESER, 2007).

A patogênese da DC deve-se à presença de peptídeos de gliadina não degradados que exibem elevada imunotoxicidade. A degradação destes peptídeos de gliadina impediria o desenvolvimento da DC, pois o agente imunotóxico deixaria de existir (CRESPO PEREZ *et al.*, 2012; LERNER, 2010; RODRIGUES, 2013; SHAN *et al.*, 2002). Desta forma, é ponderada a hipótese de se utilizar um suplemento oral com enzimas, as quais promoverão a hidrólise completa do glúten e evitar a sua atividade no intestino (RODRIGUES, 2013).

Para que uma terapêutica enzimática oral seja considerada ideal para DC, devem-se considerar as seguintes características (GORDON *et al.*, 2012):

- Resistência ao pH gástrico;
- Resistência às proteases digestivas;
- Especificidade para os peptídeos de gliadina.

É importante lembrar que a principal preocupação, em todas as terapias experimentais, é determinar *in vivo* a dose de glúten que é realmente desintoxicada por uma determinada quantidade de enzima (SOLLID; KHOSLA, 2011).

## 2.9. Trigo

Embora não se saiba exatamente quando o trigo passou a fazer parte da alimentação humana, estudos permitiram identificar trigos com, aproximadamente, 6.700 anos a.C., encontrados em escavações arqueológicas na cidade de Jarmo, no Iraque. No passado, foi fundamental para a sobrevivência de várias civilizações predominantemente rurais (TOMASINI; AMBROSI, 1998).

A capacidade da farinha de trigo ser transformado em diferentes alimentos é determinada pelas proteínas do glúten. Os grãos de trigo contêm 8 % a 20 % de proteínas. As proteínas do glúten constituem 80 % a 85 % do total das proteínas da farinha, e conferem propriedades de elasticidade e extensibilidade que são essenciais para a funcionalidade da farinha de trigo (ANJUM *et al.*, 2007; MEIRINHO, 2009).

Atualmente, o trigo ainda é parte importante da alimentação humana. Os derivados de trigo são fundamentais para a alimentação e dificilmente a humanidade encontrará outro alimento semelhante, com qualidade e preço competitivo, que o substitua (TOMASINI; AMBROSI, 1998).

O trigo é a mais importante cultura de cereais a nível mundial, em termos de produção e utilização na alimentação humana. É uma importante fonte de energia, proteína e fibra. É consumido em muitas formas diferentes, principalmente no pão, massas, bolachas, bolos, pizzas, entre outros (ANJUM *et al.*, 2007; MEIRINHO, 2009).

Segundo levantamento feito pela DEPEC (2016), a maior região brasileira produtora de trigo é a Sul, com 89,2 % (Figura 11). Já o maior produtor mundial é a China, com 30,5 %, seguida da Índia, com 21,8 % (Figura 12), e o maior consumidor mundial é a União Europeia, com 17,7 %, seguida de perto da China, com 16,0 % (Figura 13).

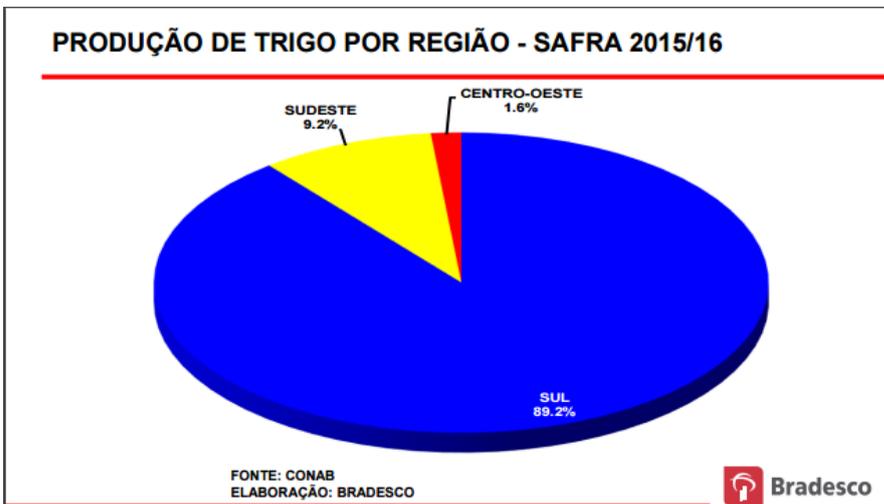


Figura 11. Produção nacional de trigo por região (DEPEC, 2016).

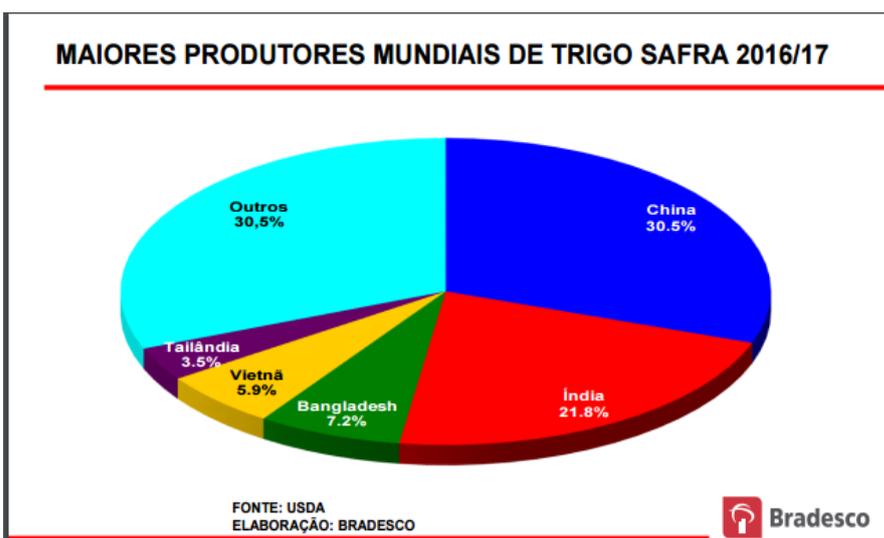


Figura 12. Maiores produtores mundiais de trigo (DEPEC, 2016).



Figura 13. Maiores consumidores mundiais de trigo (DEPEC, 2016).

Ainda pelo levantamento feito pela DEPEC (2016), pode-se observar que os destinos da farinha de trigo no mercado interno são: 54 % para panificação, 24 % para farinha de uso doméstico, 13 % para fabricação de massas, 6 % para fabricação de biscoitos e 3 % outras. Já os preços internacionais de trigo variaram muito entre 2000 e 2016 (Figura 14).

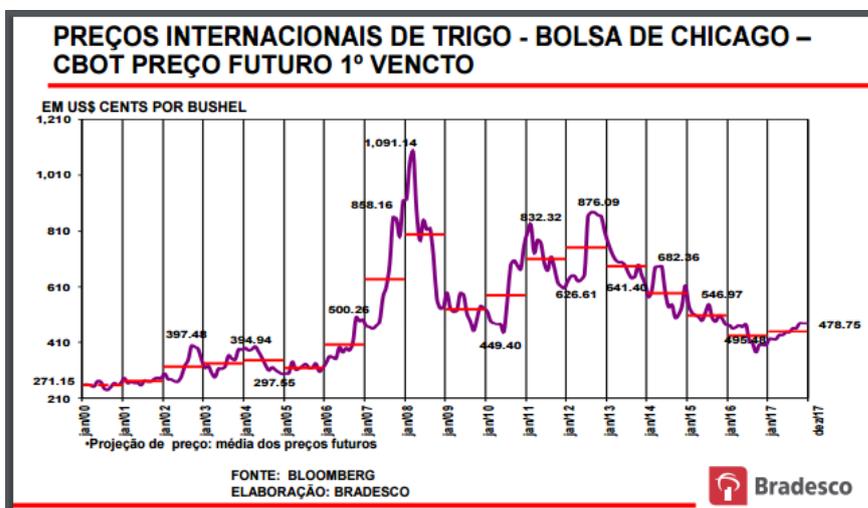


Figura 14. Preços internacionais de trigo (DEPEC, 2016).

## 2.10. Microrganismos

Os micróbios, também chamados de microrganismos, são formas de vida diminutas individualmente muito pequenas para serem vistas a olho nu e são encontrados em quase todos os lugares. O grupo inclui bactérias, fungos, protozoários e algas microscópicas. Neste grupo também estão os vírus, entidades acelulares algumas vezes consideradas a fronteira entre seres vivos e não vivos (TORTORA *et al.*, 2012).

A maioria dos microrganismos contribui de modo essencial na manutenção do equilíbrio dos organismos vivos e dos elementos químicos do nosso ambiente. Microrganismos marinhos e de água doce constituem a base da cadeia alimentar em oceanos, lagos e rios. Os existentes em solos ajudam a degradar detritos e incorporam nitrogênio gasoso do ar em compostos orgânicos, reciclando os elementos químicos entre o solo, a água, os seres vivos e o ar. Alguns têm papel fundamental na fotossíntese, um processo gerador de oxigênio e alimento que é crucial para a vida na Terra. Em seres humanos e outros animais, os microrganismos atuam em seus intestinos para a

digestão e a síntese de algumas vitaminas, como as do complexo B (metabolismo) e vitamina K (coagulação do sangue) (TORTORA *et al.*, 2012).

No ramo industrial, os microrganismos possuem aplicações na síntese de produtos químicos como vitaminas, ácidos orgânicos, enzimas, álcoois e muitas drogas. A indústria de alimentos os utiliza para a produção de vinagre, chucrute, pickles, bebidas alcoólicas, azeitonas verdes, molho de soja, manteiga, queijos, iogurtes e pães. Além disso, enzimas produzidas por eles podem ser manipuladas para a produção de substâncias que normalmente não sintetizariam, como: celulose, digestivos, compostos para limpeza de tubulações e insulina (TORTORA *et al.*, 2012).

### **2.10.1. Bactérias**

Segundo Tortora *et al.* (2012), a maioria das pessoas considera as bactérias como criaturas pequenas e invisíveis, potencialmente perigosas. Na realidade, poucas espécies de bactérias causam doenças em humanos, animais, plantas ou qualquer outro organismo.

### **2.10.2. Flora gastrointestinal**

A microbiota intestinal, comumente chamada de flora intestinal, é o grupo de bactérias que vive no intestino, principalmente bactérias anaeróbias, auxiliando em processos como a digestão de alimentos e monitorando o desenvolvimento de microrganismos que causam doenças. Estes microrganismos colonizam o intestino logo após o nascimento (BARBOSA *et al.*, 2010; PAIXÃO; CASTRO, 2016).

A microbiota intestinal é considerada um ecossistema essencialmente bacteriano que reside normalmente nos intestinos do homem, exerce o papel de proteção, impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas que geralmente são ocasionadas pelo desequilíbrio da microbiota. Algumas doenças como a diarreia e a colite pseudomembranosa são provenientes dessa assimetria bacteriana (BRANDT *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010).

Existe uma relação de aspecto benéfico entre hospedeiro e microbiota no intestino, sendo fundamental o equilíbrio que favoreça as duas partes

(GUARNER; MALAGELADA JUNIOR, 2003). O principal benefício para o hospedeiro é a recuperação de energia a partir da fermentação de carboidratos não digeridos e a subsequente absorção de ácidos graxos de cadeia curta (butiratos, metabolizados pelo epitélio do cólon; propionatos pelo fígado; e acetatos do tecido muscular). Também desempenham papel na síntese de vitamina B e da vitamina K, bem como ácidos biliares, que metabolizam esteróis e xenobióticos (PAIXÃO; CASTRO, 2016).

É constituída por microbiota nativa/permanente e de transição temporária/transitória, sendo considerado como um dos ecossistemas mais complexos, com cerca de 1.000 bactérias distintas. A Permanente é ligada às células da mucosa do intestino, possuem vários microrganismos fixos que se proliferam com agilidade e estão bem adequados ao organismo. A Transitória não está ligada na mucosa, é oriunda da seção superior do trato digestivo e varia conforme meio ambiente e alimentação. Seu estabelecimento é influenciado por múltiplos fatores e chega ao ápice por volta dos dois anos de idade (GUARNER, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010).

O intestino é considerado um ambiente com amplo número de espécies de bactérias distintas. São encontradas em toda região gastrointestinal, entretanto, no estômago e no intestino delgado encontram-se em menores quantidades devido ao contato e ação bactericida do suco gástrico. No íleo, há uma área de transição e o cólon apresenta condições favoráveis para o crescimento bacteriano devido à escassez de secreções intestinais e abrangente fonte de nutrição (GUARNER, 2007).

A colonização do TGI infantil completa é de extrema importância para a saúde do bebê e posteriormente para o adulto; a sua instalação e manutenção pode reduzir a proliferação e disseminação de bactérias multirresistentes. As bactérias entéricas apresentam funções favoráveis ao hospedeiro, como as antibacterianas, imunomodulação e metabólicos nutricionais (BJÖRKSTÉN *et al.*, 2001; BRANDT *et al.*, 2006; WALL *et al.*, 2009).

As principais bactérias que compõem a microbiota entérica são as benéficas e/ou probióticas e, as nocivas. Como exemplo de probióticas, temos as Bifidobactérias e Lactobacilos (*Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*), e entre as nocivas podem ser citadas as

*Enterobacteriaceae* e os *Clostridium spp.* São encontrados também na microbiota entérica, as *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.* e *Ruminococcus*. Outros gêneros, tais como *Escherichia* e *Lactobacillus*, estão presentes em menor grau (PAIXÃO; CASTRO, 2016; SANTOS; VARAVALHO, 2011).

Cuidar bem da flora intestinal é fundamental para manter a saúde do organismo e prevenir problemas que possam causar patologias futuras. Existe uma diversidade enorme de bactérias espalhadas no sistema digestivo, utilizando o corpo humano como hospedeiro, sendo a maioria encontrada no cólon, que é a parte mais longa do intestino grosso (GUARNER, 2007).

Para manter a flora intestinal equilibrada, o consumo de alimentos probióticos é de fundamental importância para deixar o organismo em ótimo funcionamento (PAIXÃO; CASTRO, 2016). São responsáveis por diversas atividades benéficas, como: prevenir diversas infecções causadas por microrganismos como (bactérias patogênicas, leveduras e fungos, equilibrando o pH da flora intestinal); combater infecções devido à produção de antibióticos naturais, que são absorvidos pelo sangue; melhorar o processo de digestão, contribuindo para a produção de enzimas responsáveis pela degradação de nutrientes complexos, ajudando em uma melhor absorção dos mesmos; reduzir as diarreias, a obstinação e os gases intestinais; eliminar diversas toxinas; melhorar o aspecto da pele, deixando-a com aparência mais saudável; estimular o sistema imunológico; normalizar a produção de vitaminas do complexo B e K no intestino; reduzir a absorção de moléculas de colesterol (SANTOS; VARAVALHO, 2011).

Probióticos são descritos como microrganismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas, oferecem vantagens para a saúde do hospedeiro e a ação desses produtos deve ser demonstrada para cada cepa. Entre seus efeitos, destacam-se a normalização da microbiota, diminuição da permeabilidade intestinal, proteção contra invasores patogênicos, auxílio nos reestabelecimentos pós antibioticoterápicos e estimulação do sistema imunológico. Os mais populares pertencem às espécies de bactérias como *Lactobacillus rhamnosus*, a *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*. Esses microrganismos possuem um ciclo de vida reduzido; portanto deve-se mantê-

los em refrigeração. Quando ingeridos, se instalam no intestino juntando-se à flora já existente, contribuindo na absorção dos nutrientes. São encontrados em alimentos como iogurte, leites fermentados ou sob a forma de pós ou cápsulas (WALL *et al.*, 2009; SANTOS; VARAVALHO, 2011).

A microbiota intestinal é um ecossistema que age de forma simultânea e mútua com as células do hospedeiro por um processo de simbiose, no qual nenhum dos dois é prejudicado. O equilíbrio pode ser mantido por meio de uma alimentação sistemática rica em probióticos e prebióticos, além do hábito de ingerir alimentos saudáveis e equilibrados ao organismo, que é essencial para atingir o bem-estar e contribuir para uma longevidade saudável (SAAD, 2006).

Nem todas as espécies no intestino foram identificadas porque não podem mais ser cultivados, e possui difícil identificação. As populações de espécies variam muito entre diferentes indivíduos, mas ficam razoavelmente constantes dentro de um indivíduo ao longo do tempo, apesar de algumas alterações poderem ocorrer com as mudanças no estilo de vida, dieta e idade (PAIXÃO; CASTRO, 2016).

### **3- JUSTIFICATIVA**

O tratamento da intolerância à lactose consiste basicamente na retirada ou diminuição desse açúcar da dieta, o que leva ao desaparecimento progressivo dos sintomas. Uma das grandes preocupações com a redução da lactose da alimentação é a garantia do fornecimento de quantidade apropriada de proteínas, cálcio, riboflavina e vitamina D, cuja maior fonte é o leite e seus derivados. É de fundamental importância um planejamento dietético apropriado em crianças, que assegura um crescimento satisfatório (LOPES *et al.*, 2008; UGGIONI; FAGUNDES, 2006; SABRA; WILLS, 1994).

A hidrólise da lactose pode ser aplicada para evitar a intolerância à lactose em humanos, prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvete ou na produção de produtos fermentados, como o iogurte (CARMINATTI, 2001; OBÓN *et al.*, 2000). Para a quebra da lactose, dois métodos têm sido utilizados: a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática pode ser influenciada por diversos fatores; entre eles,

podemos destacar as condições operacionais, como temperatura, pH e pressão, e a concentração de reagentes e produtos. Nesse processo é utilizada a enzima lactase ( $\beta$ -galactosidase), que pode ser extraída de diversas fontes, como animais, fungos, bactérias, leveduras e vegetais (CARMINATTI, 2001).

A Doença Celíaca (DC) mundialmente é considerada problema de saúde pública devido à sua prevalência (varia entre 0,5-1,0 % da população mundial) (MONT-SERRAT *et al.*, 2008), à frequente associação com morbidade (ao conjunto de indivíduos, dentro da mesma população, que adquirem doenças ou uma doença específica num dado intervalo de tempo) variável e não específica, e à probabilidade de aparecimento de complicações graves, principalmente osteoporose e doenças malignas do trato gastroentérico (PRATESI; GANDOLFI, 2005). O tratamento da doença celíaca é fundamentalmente dietético. Consiste na exclusão do glúten, termo utilizado para descrever frações proteicas encontradas no trigo, centeio, cevada, aveia e em seus derivados (ARAÚJO *et al.*, 2010).

A utilização de microrganismos não patogênicos isolados de queijos e iogurtes capazes de degradar a lactose e o glúten pode ser uma alternativa para pessoas que possuem intolerância à lactose e doença celíaca consumirem uma maior quantidade de alimentos sem a necessidade de preocupação com essas substâncias. Isso porque os microrganismos isolados destes alimentos já estão adaptados às condições existentes no intestino do corpo humano. Essa utilização pode ser: a) pelas suas ingestões no trato digestivo (digestório), caso eles sejam compatíveis e possam fazer parte da flora intestinal; b) usando suas enzimas como um complemento medicamentoso, junto com a alimentação; c) usando suas enzimas para degradarem a lactose e o glúten presentes em alimentos antes que sejam digeridos pelos seres humanos. Este trabalho visa encontrar microrganismos com essas características desejáveis.

## **4 -OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar a presença de bactérias em queijos e iogurtes capazes de degradar o glúten e a lactose, e verificar algumas de suas características fisiológicas para possíveis aplicações no tratamento da intolerância à lactose e da doença celíaca.

### **4.2 - Objetivos Específicos**

- 1) Obter microrganismos não patogênicos capazes de degradar o glúten e a lactose em queijos e iogurtes na temperatura corporal humana (37°C);
- 2) Verificar a possibilidade de os microrganismos isolados mudarem suas morfologias nos dois meios de cultura;
- 3) Obter microrganismos e/ou enzimas microbianas capazes de atuarem em pH's ácidos como os do estômago e alcalinos como os dos intestinos humano;
- 4) Analisar e caracterizar as enzimas desses microrganismos que apresentam maiores atividades usando-se o glúten e a lactose como substratos;
- 5) Identificação taxonômica dos microrganismos mais promissores.

**CAPÍTULO 1:**  
**Características morfológicas e bioquímicas de bactérias**  
**encontradas em produtos lácteos comercializados na cidade**  
**de Manaus, Amazonas.**

## Resumo

Os microrganismos são fundamentais para a manutenção do equilíbrio dos organismos vivos e dos elementos químicos do nosso planeta. Diversas pesquisas têm mostrado que microrganismos encontrados na cavidade bucal e intestinos apresentam habilidade de degradar componentes encontrados no leite (lactose) e em alguns cereais (glúten). Esse trabalho teve como objetivo, isolar, purificar e caracterizar morfológicamente bactérias de queijos e iogurtes comercializados no município de Manaus, Amazonas, capazes de degradarem lactose e glúten visando uma alternativa para minimizar ou solucionar o problema de intolerância à lactose e Doença Celíaca que afetam parte da população mundial. Foram isoladas 75 bactérias dos 10 tipos de queijo e 10 tipos de iogurtes usados para os testes. Todas as 75 bactérias apresentaram elevado crescimento nas primeiras 24 horas de avaliação em ambos os meios de cultura testados (glúten ou lactose). Das 75 bactérias testadas, 61 apresentaram formação de halo de degradação em meio contendo glúten. Pelo Índice de Degradação de Glúten (IDG), das 61 bactérias avaliadas, 22 não apresentaram IDG durante o teste, 30 apresentaram IDG's considerados baixos, 9 IDG's foram considerados médios e nenhuma apresentou IDG considerado alto. A fonte de carbono do meio de cultura (glúten ou lactose) influenciou as características morfológicas das colônias das 20 bactérias selecionadas como as melhores. No teste de coloração de Gram, 16 bactérias foram Gram Negativas e quatro Gram Positivas. No teste de catalase, sete bactérias foram catalase positivas e 13 foram catalase negativas. Das 13 bactérias usadas na caracterização genética, foi possível identificar somente quatro ao nível de espécie. Quatro isolados são do gênero *Pseudomonas* sp., quatro do gênero *Bacillus* sp., duas do gênero *Stenotrophomonas* sp., uma do gênero *Brevibacillus* sp., uma do gênero *Achromobacter* sp. e uma do gênero *Burkholderia* sp. Das 13 bactérias selecionadas, a BLG16, BLG23, BLG25 e BLG33 pertencem a gêneros considerados patogênicos aos animais, mas no presente estudo, essa característica não foi avaliada. As bactérias BLG01, BLG02, BLG06, BLG28, BLG38, BLG45, BLG52, BLG56 e BLG73 são de gêneros já estudados para uso biotecnológico, mas não se descarta a possibilidade de serem patogênicas.

**Palavras-chave:** Microflora de queijos, metabolismo microbiano, degradação de glúten, microbiota amazônica.

## Abstract

Microorganisms are of fundamental importance for maintaining the equilibrium of living organisms and the chemical elements of our planet. Several researches have shown that microorganisms found in the oral cavity and intestines have the ability to degrade components found in milk (lactose) and in some cereals (gluten). This work had as objectives, to isolate, purify and morphologically characterize cheeses and yoghurt bacteria commercialized in the city of Manaus, Amazonas capable of degrading lactose and gluten, aiming as an alternative to minimize or solve the problem of lactose intolerance and Celiac Disease that affect part of the world population. 75 bacteria were isolated from the 10 types of cheese and 10 types of yogurts used for the tests. All 75 bacteria showed high growth in the first 24 hours of evaluation in both culture media tested (gluten or lactose). Of the 75 bacteria tested, 61 presented halo formation of degradation in medium containing gluten. For the Gluten Degradation Index (GDI), of the 61 bacteria evaluated, 22 did not present GID during the test, 30 had GIDs considered low, 9 GIDs were considered medium and none had GID considered high. The carbon source of the culture medium (gluten or lactose) influenced the morphological characteristics of the colonies of the 20 selected bacteria as the best ones. In the Gram staining test, 16 bacteria were Gram Negative and four Gram positive. In the catalase assay, seven bacteria were catalase positive and 13 were catalase negative. Of the 13 bacteria used in the genetic characterization, it was possible to identify only four at the species level. Four isolates are of the genus *Pseudomonas*, four of the genus *Bacillus*, two of the genus *Stenotrophomonas*, one of the genus *Brevibacillus*, one of the genus *Achromobacter* and one of the genus *Burkholderia*. Of the 13 selected bacteria, BLG16, BLG23, BLG25 and BLG33 belong to genera considered pathogenic to animals, but in the present study, this characteristic was not evaluated. The BLG01, BLG02, BLG06, BLG28, BLG38, BLG45, BLG52, BLG56 and BLG73 are of genera already studied for biotechnological use, but the possibility of being pathogenic was not ruled out.

**Key words:** Microflora of cheeses, microbial metabolism, gluten degradation, Amazonian microbiota.

## 1. Introdução

Os micróbios, também chamados de microrganismos, são formas de vida diminutas individualmente, muito pequenas para serem vistas a olho nu e são encontrados em quase todos os lugares. O grupo inclui bactérias, fungos, protozoários, algas microscópicas e vírus. A maioria dos microrganismos contribui de modo essencial na manutenção do equilíbrio dos organismos vivos e dos elementos químicos do nosso ambiente (TORTORA *et al.*, 2012).

Diversas pesquisas têm mostrado que microrganismos encontrados na cavidade bucal e intestinos apresentam habilidade de degradar componentes encontrados no leite (lactose) e em alguns cereais (glúten) (DI CAGNO *et al.*, 2001; FERNANDEZ-FEO *et al.* 2013; FODÉN, 2001; FUJIMURA *et al.*, 2010; ROWAT *et al.*, 2010). Em derivados do leite, como nos queijos e iogurtes, também foram encontradas diversas bactérias com essa capacidade (GOBBETTI, 2005; HELLER, 2001; MASOTTI *et al.*, 2013), abrindo perspectivas de se obterem, através de isolamentos, novos gêneros e espécies de bactérias para resolverem ou minimizarem problemas de saúde presente em parte das populações humanas de todas as regiões do planeta, por apresentar intolerância à lactose e/ou ao glúten.

O iogurte é leite fermentado por bactérias, usualmente *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, e possui uma consistência que o diferencia de outros produtos derivados de laticínios. Contém todos os constituintes nutricionais do leite, com exceção da lactose, reduzida durante a fermentação, revelando-se vantajoso para quem não digere bem o leite (SILVA *et al.*, 2010).

Para a obtenção de um produto final com qualidade, é necessária uma matéria-prima adequada e dentro dos padrões legais vigentes. Como em todo produto a ser desenvolvido, a matéria-prima a ser utilizada para a fabricação de iogurte deve ser de qualidade, obtida e manipulada adequadamente para evitar contaminações, além de ser de procedência confiável (ALMEIDA, 2008). Por isso, isolar esses microrganismos existentes no iogurte, além de estarem adaptados às condições existentes no corpo humano, não são patogênicos. Em adição a isso, pretende-se verificar quais desses microrganismos já utilizados na indústria de alimentos têm capacidade de degradar o glúten e a

lactose, acrescentando assim, no futuro, duas qualidades desejáveis a mais nesses alimentos.

O queijo é um concentrado protéico-gorduroso constituído por caseína em forma de gel, matéria-graxa, ácido láctico e substâncias minerais, resultante de coagulação do leite (BEHMER, 1984). Os queijos de um modo geral podem conter microrganismos desejáveis e indesejáveis. Os desejáveis são aqueles que podem contribuir positivamente para o desenvolvimento das características organolépticas do produto, podendo desta forma, exercer um efeito benéfico no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo por meio de sua atividade metabólica.

A microbiota presente e/ou a quantidade de microrganismos no queijo pode sofrer influência do estado de saúde do animal, das condições de higiene e limpeza do estábulo, dos equipamentos em contato com o leite, e das condições de higiene e saúde do pessoal que atua desde a ordenha até a elaboração do produto final. Também, a forma de conservação do leite, o tipo de processamento, as condições de armazenamento e a qualidade microbiológica da água influenciam a flora microbiana presente no queijo (FURTADO, 1991; ZEGARRA *et al.* 2009). Os queijos, com exceção dos frescos, apresentam apenas traços de lactose, podendo ser ingeridos por mau absorvedores de lactose (ANTUNES; OLEJ, 2009).

Como as bactérias existentes nos queijos já estão adaptadas às condições existentes dentro do corpo humano, são de interesse para o estudo desta tese. Porém, devido às más condições de produção dos classificados como queijos caseiros, precisam ser feitas classificações taxonômicas mais específicas para garantir que estas bactérias não sejam patogênicas. Do mesmo modo dos iogurtes, é altamente vantajoso encontrar e utilizar bactérias nos queijos que possam degradar o glúten e a lactose, contribuindo para minimizar ou resolver os problemas de intolerância a esses dois compostos nutricionais.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Isolamento e purificação das bactérias**

Amostras de 10 tipos de queijos e 10 tipos de iogurtes adquiridos em diferentes locais do município de Manaus foram colocadas em tubos fálcon contendo solução salina, maceradas (queijos) e em seguida, 1 mL da suspensão foi espalhado com alça de Drigalski em placas contendo meio YMA (VINCENT, 1970), substituindo o manitol pelo glúten (10 g glúten, 0,5 g  $K_2HPO_4$ , 0,2 g  $MgSO_4$ , 0,1 g NaCl, 0,5 g extrato de levedura, 15 g ágar em 1 L de água destilada – pH 7,0). O mesmo procedimento foi realizado em meio contendo lactose (1%) como fonte de carbono. As placas foram colocadas em estufa a 37 °C e analisadas a cada 24 horas procurando-se selecionar as bactérias capazes de degradarem respectivamente o glúten e/ou a lactose. Foram testadas 75 isolados capazes de degradar ambos ou um dos dois componentes, concentrando os estudos enzimáticos nos 20 mais promissores.

### **2.2. Teste de crescimento em meio ágar-glúten e em meio ágar-lactose**

Os isolados capazes de degradaram o glúten e/ou a lactose foram testados quanto aos seus crescimentos nos dois meios específicos na temperatura de 37 °C. Cada um dos isolados foi estriado nas placas contendo separadamente os meios com glúten ou lactose como fontes de carbono, com quatro repetições, usando o método de Oliveira e Magalhães (1999) para as avaliações.

Esse método substitui o método de diluição em placas e embora seja menos preciso do que este facilita a avaliação de um grande número de bactérias, selecionando as melhores em menos tempo, com menos trabalho e menor uso de material laboratorial.

O 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). A Figura 15 mostra o procedimento geral de estriagem nas placas, onde se observa que há um processo de diluição da bactéria, com a Zona 1 sendo a de maior concentração e a Zona 4, a de menor (OLIVEIRA; MAGALHÃES, 1999). A Figura 16 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, objetivando aumentar a precisão do método. Consideraram-se como os de melhores crescimentos, os que apresentaram notas médias acima de 3,06 (Tabela 4) (OLIVEIRA; MAGALHÃES, 1999).

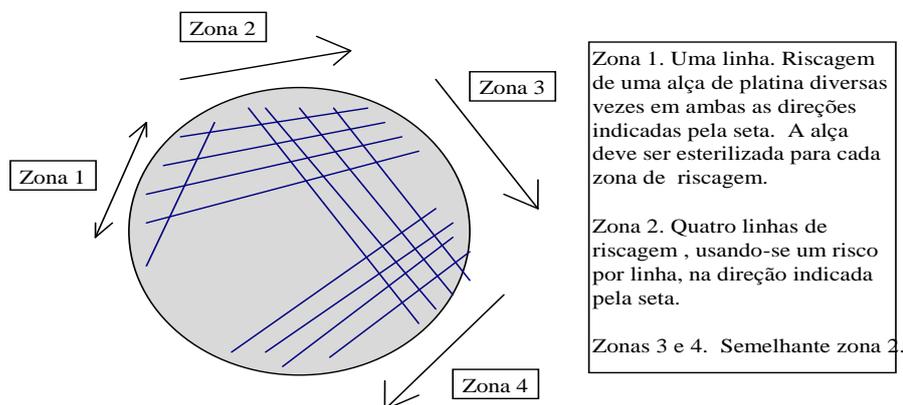


Figura 15 – Método de avaliação do crescimento bacteriano segundo Oliveira e Magalhães (1999).

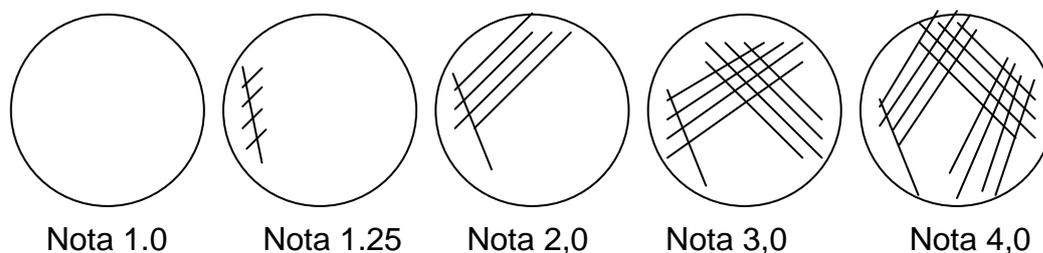


Figura 16 - Pontuações (notas) aplicadas para o crescimento das bactérias segundo Oliveira e Magalhães (1999).

Tabela 4 - Faixas de pontuação para avaliação do crescimento das bactérias em meio sólido contendo glúten.

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; MAGALHÃES, 1999).

### **2.3. Habilidade das bactérias em degradarem o glúten**

Os isolados foram avaliados em placas de Petri contendo o meio com glúten como fonte de carbono para visualização do halo de degradação (região transparente ao redor das colônias). Com o auxílio de palitos de dentes esterilizados, foi retirada uma porção da colônia bacteriana, realizando-se um leve toque no meio de cultura; cada placa conteve cinco colônias como repetições. As placas foram incubadas a 37 °C e avaliadas em intervalos de 4 horas quanto ao crescimento microbiano e halo de degradação. A avaliação nessa temperatura visa verificar a capacidade desses microrganismos em crescer e produzir metabólitos capazes de degradar o glúten na temperatura corporal humana.

Os diâmetros da colônia bacteriana e do halo de degradação foram medidos a cada 4 horas, utilizando-se um paquímetro digital. A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Degradação do Glúten (IDG) para cada isolado, pela fórmula:  $DD$  (diâmetro da zona de degradação em mm)/ $DC$  (diâmetro da colônia em mm), adaptando-se os critérios e cálculos de Berraquero *et al.* (1976). Com base nos índices, os isolados foram classificados de acordo com a capacidade de degradação do glúten em: baixa ( $IDG < 2$ ), média ( $2 \leq IDG < 4$ ) e alta ( $IDG \geq 4$ ).

A partir desse teste foram selecionadas as 20 bactérias que apresentaram maiores IDGs para testes posteriores.

### **2.4. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos em meios com glúten e lactose**

Os isolados que foram positivos para a quebra do glúten e da lactose foram caracterizados quanto à morfologia celular e colonial. As colônias bacterianas foram inoculadas nos dois meios diferentes previamente citados, com incubação a 37 °C. A caracterização foi realizada segundo as metodologias de Hungria e Araújo (1994), Prescott *et al.* (2004), Vincent (1970) e Malajovich (2015) (Figura 17).

## MICRORGANISMOS / CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS COLÔNIAS

### OS CRITÉRIOS UTILIZADOS

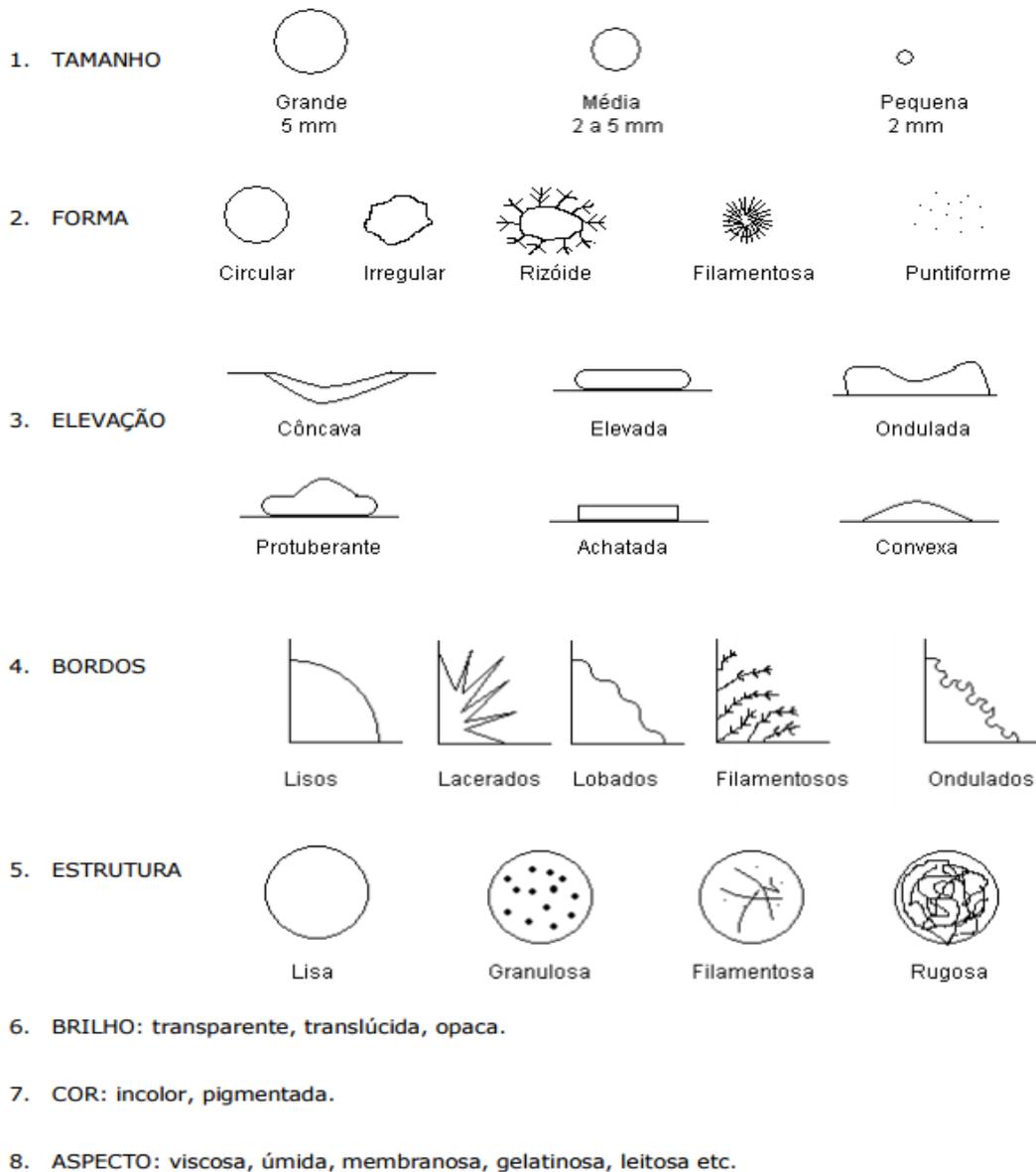


Figura 17. Caracterização morfológica de colônias bacterianas segundo Malajovich.(2015).

Foi avaliado cada um dos isolados em meio sólido como: bactérias de crescimento lento (quatro a dez dias) e rápido (até três dias), diâmetro (pequena, média ou grande), forma da colônia (circular, irregular, rizoide, filamentosa ou puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada ou convexa), bordos (lisos, lacerados, lobados, filamentosos ou ondulados), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa ou rugosa),

brilho (transparente, translúcida ou opaca), coloração (incolor ou pigmentada) e aspecto (viscosa, úmida, membranosa, gelatinosa ou leitosa).

## 2.5. Teste de catalase

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio. É utilizado, normalmente, para identificar *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Moraxella catarrhalis* (ANVISA, 2015).

O peróxido de hidrogênio é um produto decorrente do metabolismo celular em organismos expostos ao oxigênio atmosférico, sendo um agente oxidante poderoso e nocivo. Uma das fontes de peróxido de hidrogênio é a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos necessária para a produção de diversos metabolitos essenciais. O peróxido de hidrogênio está relacionado com diversas patologias ligadas ao stress oxidativo. Sendo tóxico para as células, o peróxido tem de ser rapidamente convertido numa espécie química que seja inócua (ANVISA, 2015).

A catalase tem o mais alto número de *turnover* ( $k_{cat}$ ) conhecido em enzimas: uma molécula de catalase pode catalisar a decomposição de até 40.000.000 moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo (NELSON; COX, 2005), tornando-a numa enzima importante para a desintoxicação desta substância. É uma enzima antioxidante comum que é produzida naturalmente em praticamente todos os organismos vivos (EHOWBRASIL, 2015).

As reações em catálise são importantes para a vida. Por exemplo, elas ajudam o corpo a quebrar o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, prevenindo assim, a acumulação de bolhas de dióxido de carbono no sangue. Ela também utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar potencialmente toxinas nocivas no corpo incluindo formaldeído, ácido fórmico, álcool e fenol (EHOWBRASIL, 2015).

Algumas células do sistema imunitário produzem peróxido de hidrogênio para uso como agente antibacteriano. As bactérias patogênicas que possuem catalase são capazes de resistir a este ataque graças à presença da enzima, conseguindo sobreviver nas células que invadem (RICHARD, 2005).

A catalase parece estar envolvida no mecanismo de envelhecimento ligado ao stress oxidativo: mutantes de ratinhos expressando uma quantidade superior ao normal de catalase (cerca de 50 % a mais) vivem por mais tempo (RICHARD, 2005).

Com o auxílio de uma alça de platina foi coletada uma colônia isolada e esfregada em uma lâmina de vidro. Sobre o esfregaço foi colocada uma gota de água oxigenada a 3% e observada a formação de bolhas.

A presença imediata de bolhas, produção de efervescência, indica a conversão do  $H_2O_2$  em água e oxigênio gasoso pela presença da catalase na amostra (ANVISA, 2015).

## **2.6. Coloração de Gram**

Para a realização desse teste, foi adicionada uma gota de 10  $\mu$ L de água destilada em uma lâmina de vidro e com o auxílio de uma alça bacteriológica, a colônia bacteriana foi homogeneizada por esfregaço na lâmina e fixada por aquecimento no bico de Bunsen. Depois disso, a lâmina foi tratada com o reagente cristal violeta por 1 minuto, seguido de lavagem com água corrente e adicionado o reagente Lugol por 1 minuto. Passado 1 minuto, a lâmina foi descorada com álcool-cetona, finalizando o processo pela adição de Fucsina básica por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, secadas à temperatura ambiente e visualizadas em microscópio óptico na objetiva de 100x.

## **2.7. Caracterização genética dos isolados bacterianos**

### **2.7.1. Extração do DNA cromossomal**

A extração do DNA cromossomal dos isolados bacterianos foi realizada segundo protocolo para caracterização genética de bactérias promotoras do crescimento de plantas da EMBRAPA (ISSN 1516-1752, 2008), com adaptações. As bactérias foram crescidas em 50 mL de meio de cultura contendo lactose a 37 °C sob agitação constante (150 rpm) durante 24 h. Após

o cultivo, as bactérias foram centrifugadas a 12000g por 2 min; em seguida, foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de tampão SET (Sacarose 0,3 M, EDTA, Tris-HCl 1 M). Foram seguidos 3 tempos de incubação: com lisozima (10 mg/mL) a 37° C por 30 min, com proteinase K (10 mg/mL) a 50 °C por 30 min e com SDS 10 % (0,1V) a 55 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 300 µL de acetato de potássio 5 M, incubando-se em gelo por 30 min e centrifugando-se por 10 min na máxima rotação por minuto. Foi recuperado o sobrenadante e adicionados 500 µL de isopropanol 100 %.

Foi incubado em gelo por 20 min e centrifugado por 10 min na máxima velocidade de centrifugação. Foi descartado o sobrenadante e lavado com etanol 70 % com máxima velocidade de centrifugação por mais 10 min. Foi descartado o sobrenadante e o material foi posto para secar na estufa a 37 °C. O DNA foi solubilizado em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e uma alíquota de 5 µL desse material foi aplicada em gel de agarose 0,8 % para observar a integridade do DNA extraído. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3) a 80V. Logo após as amostras foram visualizadas sob luz UV e fotodocumentadas.

### **2.7.2. Identificação taxonômica das bactérias**

As bactérias foram identificadas taxonomicamente de acordo com Collins *et al.* (1989), Dicks *et al.* (1996), Schillinger (1999), De Vos *et al.* (2005) e Buriti e Saad (2007) para caracterização e classificação com base na sequência de bases do segmento do DNA 16S. As sequências estão em Anexos.

### **2.7.3. Protocolo de identificação molecular**

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração Purelink Invitrogen. Foi amplificada a região 16S rRNA de aproximadamente 400 pb, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 400F (5' - forward-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG ACG AGT AGA CTA CTC CTA CGG

RAG GCA GCA G - 3`) e 400R (5' - reverse – GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT - 3`).

Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico do PCR foi: um ciclo inicial a 95°C/2 minutos, 25 ciclos a 95 °C/40s, 59 °C/40s e 72 °C/40s e finalmente um ciclo de extensão a 72 °C/5 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % para a verificação dos fragmentos. O produto da reação de PCR foi purificado utilizando o protocolo de Agencourt AMPure e quantificado pelo fluorômetro Qubit 2.0.

A amostra foi sequenciada (ABI 3130- Applied Biosystems DNA sequence) e a sequência obtida foi editada e avaliada utilizando o programa PHRED disponível no endereço (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>).

Após a obtenção das sequências F (forward) e R (reverse), foi realizado alinhamento comparativo no banco de dados de genomas bacterianos depositados no “GeneBank” utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (SHAEFFER *et al.* 2001) do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI) e também foram comparadas com o banco de dados do “Ribossomal Database Project”(RDP).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Isolamento e purificação das bactérias

Foram isoladas 75 bactérias de 10 tipos de queijo e 10 tipos de iogurtes diferentes em meios de cultura ágar-lactose e ágar-glúten na temperatura de 37 °C, sendo nomeadas com a sigla INPA BLG (Bactéria, Lactose e Glúten), sendo 63 isoladas de queijos e 12 de iogurtes (Tabela 5). Todas foram armazenadas em tubos contendo meio para estoque (YMA) para testes posteriores.

Tabela 5. Isolamento das bactérias e suas origens.

Queijos	Bactérias (INPA BLG)
A	1, 2, 3, 4, 5
B	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
C	15, 16, 17, 18, 19, 20
D	21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
E	28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36
F	37, 38, 39, 40, 41
G	42, 43, 44, 45
H	46, 47, 48, 49
I	50, 51, 52, 53, 54, 55, 56
J	57, 58, 59, 60, 61, 62, 63
Iogurtes	
K	64
L	65, 66
M	-
N	67, 68, 69, 70
O	71
P	-
Q	-
R	72, 73
S	74
T	75

#### 3.2. Teste de crescimento bacteriano em meio ágar-glúten e em meio ágar-lactose

No teste de Oliveira e Magalhães (1999), todas as 75 bactérias apresentaram nota 4,00 nas primeiras 24 horas em meio ágar-lactose. Já no meio ágar-glúten, 73 bactérias apresentaram notas de crescimento de 3,06 para cima nas primeiras 24 horas, atingindo nota 4,00 nas 48 horas de crescimento (Tabela 6).

Tabela 6. Crescimento segundo metodologia Oliveira e Magalhães (1999).

Bactérias	Notas segundo Oliveira e Magalhães (1999)				
	INPA	24 horas		48 horas	
		Lactose	Glúten	Lactose	Glúten
BLG-1	4,00	3,50	4,00	4,00	
BLG-2	4,00	3,93	4,00	4,00	
BLG-3	4,00	3,25	4,00	4,00	
BLG-4	4,00	3,75	4,00	4,00	
BLG-5	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-6	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-7	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-8	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-9	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-10	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-11	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-12	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-13	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-14	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-15	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-16	4,00	3,25	4,00	4,00	
BLG-17	4,00	3,25	4,00	4,00	
BLG-18	4,00	3,06	4,00	4,00	
BLG-19	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-20	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-21	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-22	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-23	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-24	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-25	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-26	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-27	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-28	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-29	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-30	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-31	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-32	4,00	3,06	4,00	4,00	
BLG-33	4,00	3,06	4,00	4,00	
BLG-34	4,00	3,75	4,00	4,00	
BLG-35	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-36	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-37	4,00	3,06	4,00	4,00	
BLG-38	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-39	4,00	3,75	4,00	4,00	
BLG-40	4,00	3,25	4,00	4,00	
BLG-41	4,00	3,06	4,00	4,00	
BLG-42	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-43	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-44	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-45	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-46	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-47	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-48	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-49	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-50	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-51	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-52	4,00	3,06	4,00	4,00	
BLG-53	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-54	4,00	4,00	4,00	4,00	
BLG-55	4,00	3,25	4,00	4,00	
BLG-56	4,00	4,00	4,00	4,00	

BLG-57	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-58	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-59	4,00	3,75	4,00	4,00
BLG-60	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-61	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-62	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-63	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-64	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-65	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-66	4,00	3,25	4,00	4,00
BLG-67	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-68	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-69	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-70	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-71	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-72	4,00	2,00	4,00	4,00
BLG-73	4,00	4,00	4,00	4,00
BLG-74	4,00	3,00	4,00	4,00
BLG-75	4,00	4,00	4,00	4,00

As seguintes bactérias não apresentaram halo visível de degradação do glúten e não foram utilizadas para testes posteriores: INPA BLG-3, INPA BLG-4, INPA BLG-5, INPA BLG-13, INPA BLG-27, INPA BLG-39, INPA BLG-43, INPA BLG-47, INPA BLG-51, INPA BLG-61, INPA BLG-67, INPA BLG-72, INPA BLG-74 e INPA BLG-75. As que apresentaram halo visível de degradação do glúten foram utilizadas para experimentos posteriores (Figuras 18 e 19).

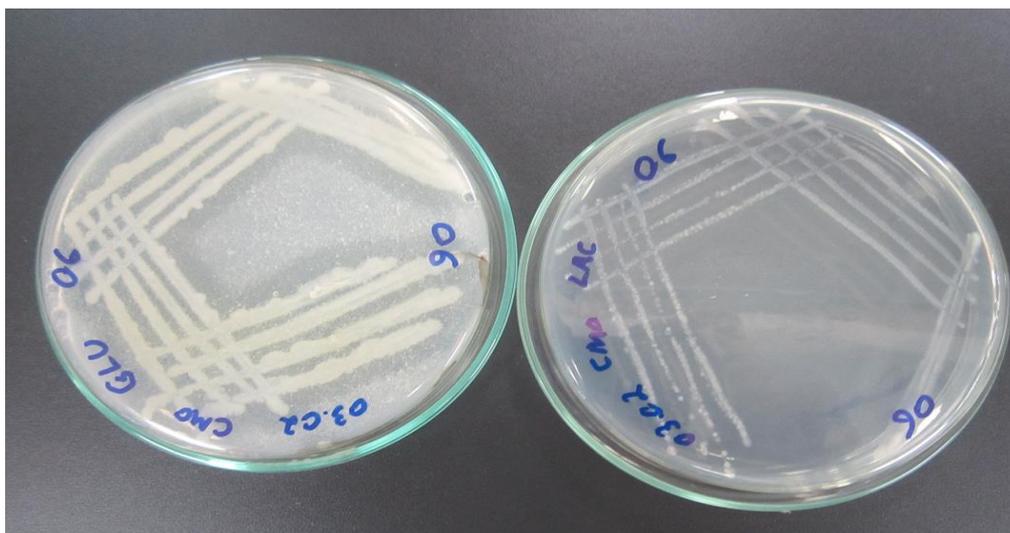


Figura 18. Bactéria em meio ágar-glúten (apresentando halo de degradação) e em ágar-lactose com notas 4,00 pela metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).

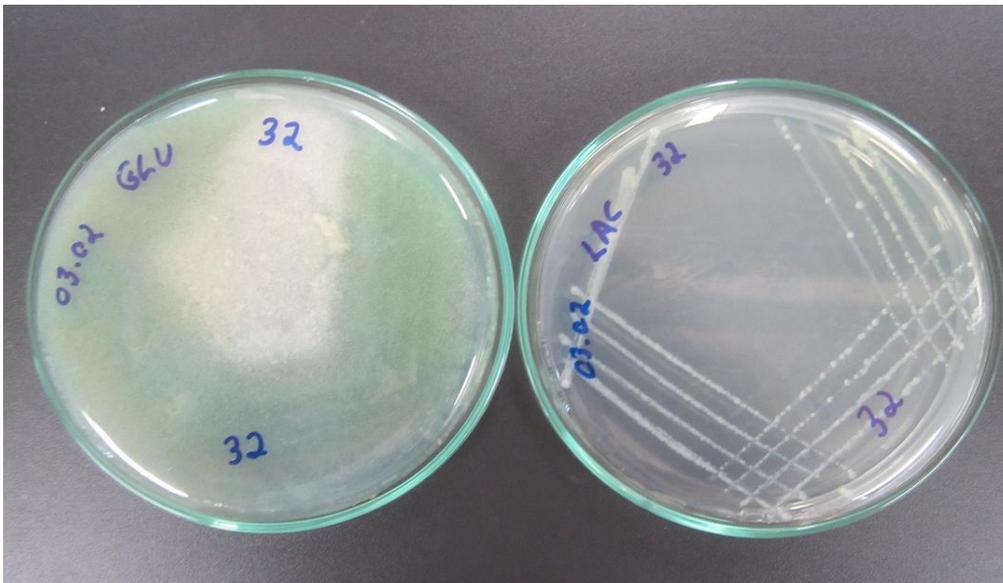


Figura 19. Bactéria com coloração diferente entre meio ágar-glúten e ágar-lactose.

### 3.3. Habilidade das bactérias em degradarem o glúten

As 61 bactérias selecionadas no teste anterior foram testadas quanto à habilidade de degradarem o glúten utilizando Índice de Degradação do Glúten (IDG), com leitura das placas de 4 em 4 horas e 5 repetições. O IDG é medido pela fórmula:  $DH$  (diâmetro da zona de degradação em mm)/ $DC$  (diâmetro da colônia em mm), adaptando-se aos critérios e cálculos de Berraquero *et al.* (1976). Com base nos índices, as bactérias foram classificadas de acordo com a capacidade de degradação do glúten em: baixa ( $IDG < 2$ ), média ( $2 \leq IDG < 4$ ) e alta ( $IDG \geq 4$ ).

Foi observado que 22 bactérias não apresentaram IDG durante o teste, 30 apresentaram IDG's considerados baixos, e 9 apresentaram IDG's considerados médios (Tabela 7). Este teste confirmou as bactérias que não apresentaram halo, sendo mantidas somente em estoque. Depois deste teste, foram selecionadas as 20 bactérias que apresentaram maiores IGD's para testes posteriores (Figura 20).

Tabela 7. Bactérias com os maiores Índices de Degradação de Glúten.

Isolados INPA	Teste de Halo em Glúten (horas)						
	4		8		12		
	DH	DC	IDG	DH	DC	IDG	
	-----mm -----		-----mm -----		-----mm -----		
BLG-01	-*	5,18	3,41	1,52	10,74	5,17	2,08
BLG-02	-	2,51	1,89	1,33	6,20	3,41	1,82
BLG-06	-	5,68	4,59	1,24	10,38	6,26	1,66
BLG-07	-	1,62	1,41	1,15	2,16	1,63	1,33
BLG-08	-	1,72	1,64	1,05	1,73	1,64	1,05
BLG-09	-	1,45	1,42	1,02	2,34	1,57	1,49
BLG-10	-	1,99	1,28	1,55	4,96	1,93	2,57
BLG-11	-	0,00	1,03	0,00	0,00	1,15	0,00
BLG-12	-	1,27	1,15	1,10	2,03	1,26	1,61
BLG-14	-	1,67	1,54	1,08	3,01	1,92	1,57
BLG-15	-	2,32	2,11	1,10	2,42	3,34	1,46
BLG-16	-	1,95	1,14	1,71	4,53	1,69	2,68
BLG-17	-	0,00	1,11	0,00	1,37	1,40	1,02
BLG-18	-	1,99	1,97	1,01	4,12	2,16	1,91
BLG-19	-	0,00	1,04	0,00	0,00	1,08	0,00
BLG-20	-	0,00	1,54	0,00	0,00	1,57	0,00
BLG-21	-	0,00	1,11	0,00	0,00	1,13	0,00
BLG-22	-	3,35	1,62	2,07	6,28	1,77	3,55
BLG-23	-	3,22	1,65	1,95	5,93	2,38	2,49
BLG-24	-	1,29	1,16	1,11	1,31	1,17	1,12
BLG-25	-	2,55	1,29	1,98	4,61	1,86	2,48
BLG-26	-	3,10	1,55	2,00	5,41	4,55	1,19
BLG-28	-	3,97	1,97	2,01	11,02	3,23	3,41
BLG-29	-	0,00	0,92	0,00	0,00	1,26	0,00
BLG-30	-	0,00	1,12	0,00	0,00	2,34	0,00
BLG-31	-	0,00	1,46	0,00	0,00	1,88	0,00
BLG-32	-	2,39	1,98	1,20	4,46	2,40	1,86
BLG-33	-	2,24	1,96	1,14	5,62	3,21	1,75
BLG-34	-	0,00	0,35	0,00	0,00	0,46	0,00
BLG-35	-	2,25	1,91	1,18	4,36	2,36	1,85
BLG-36	-	0,00	0,68	0,00	0,00	0,87	0,00
BLG-37	-	0,00	0,91	0,00	0,00	1,13	0,00
BLG-38	-	5,90	4,19	1,41	10,76	5,35	2,01
BLG-40	-	1,51	1,34	1,13	3,06	1,76	1,74
BLG-41	-	1,14	1,12	1,02	1,26	1,20	1,05
BLG-42	-	1,21	1,11	1,09	1,50	1,34	1,12
BLG-44	-	0,00	0,98	0,00	0,00	1,41	0,00
BLG-45	-	5,36	2,91	1,84	11,31	4,66	2,43
BLG-46	-	7,56	5,60	1,35	18,50	11,42	1,62
BLG-48	-	3,36	2,80	1,20	6,67	5,09	1,31
BLG-49	-	0,00	1,21	0,00	0,00	1,23	0,00
BLG-50	-	0,00	0,87	0,00	0,00	3,12	0,00
BLG-52	-	2,09	1,41	1,48	2,82	1,65	1,71
BLG-53	-	1,91	1,65	1,16	3,25	2,48	1,31
BLG-54	-	0,00	1,25	0,00	0,00	5,21	0,00
BLG-55	-	0,00	3,21	0,00	0,00	5,61	0,00
BLG-56	-	2,05	1,42	1,44	3,45	1,96	1,76
BLG-57	-	3,44	3,10	1,11	5,21	4,31	1,21
BLG-58	-	0,00	1,97	0,00	0,00	3,28	0,00
BLG-59	-	10,64	7,87	1,35	15,63	10,16	1,54
BLG-60	-	0,00	2,33	0,00	0,00	3,56	0,00
BLG-62	-	2,01	1,73	1,16	2,01	1,73	1,16
BLG-63	-	1,78	1,43	1,24	1,78	1,43	1,24
BLG-64	-	0,00	1,11	0,00	0,00	2,23	0,00
BLG-65	-	0,00	2,13	0,00	0,00	3,62	0,00

BLG-66	-	0,00	1,62	0,00	0,00	1,93	0,00
BLG-68	-	0,00	3,41	0,00	0,00	6,12	0,00
BLG-69	-	0,00	1,59	0,00	0,00	2,19	0,00
BLG-70	-	1,91	1,39	1,37	3,94	2,03	1,94
BLG-71	-	1,72	1,35	1,27	3,48	2,29	1,52
BLG-73	-	1,86	1,56	1,19	3,67	1,87	1,96

\*sem crescimento visual das bactérias

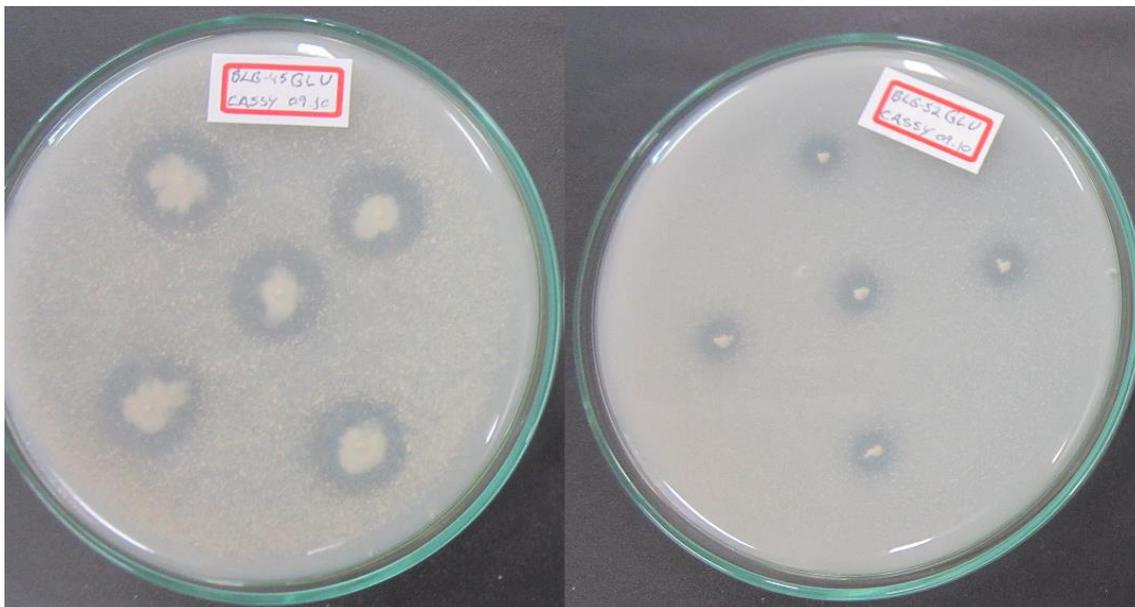


Figura 20. Demonstração da diferença da colônia bacteriana e do halo de degradação de glúten.

### 3.4. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos em meios com glúten e lactose

Todas as bactérias apresentaram crescimento rápido (menos de 48 horas) em ambos os meios de cultura. Foram observadas mudanças na morfologia externas das bactérias quando comparados seus crescimentos nos dois meios (Tabela 8): no tamanho da colônia, 9 bactérias mantiveram as mesmas características, enquanto que 11 mudaram de tamanho; na visualização da forma da colônia, 13 mantiveram a mesma forma, enquanto que 7 mudaram; na elevação da colônia, 9 continuaram com as mesmas características, enquanto que 11 não; e nos bordos da colônia, 9 mantiveram-se iguais, enquanto que 11 foram modificadas (Figuras 27, 28, 29 e 30).

Na figura 21, por exemplo, a diferença de tamanho das colônias da bactéria BLG28 nos dois meios de cultura pode ser vista claramente. No meio contendo glúten, ela tem uma elevação ondulada, bordos lobados e aspecto

gelatinoso, enquanto que no meio contendo lactose, ela tem uma elevação achatada, bordos ondulados e aspecto membranoso.

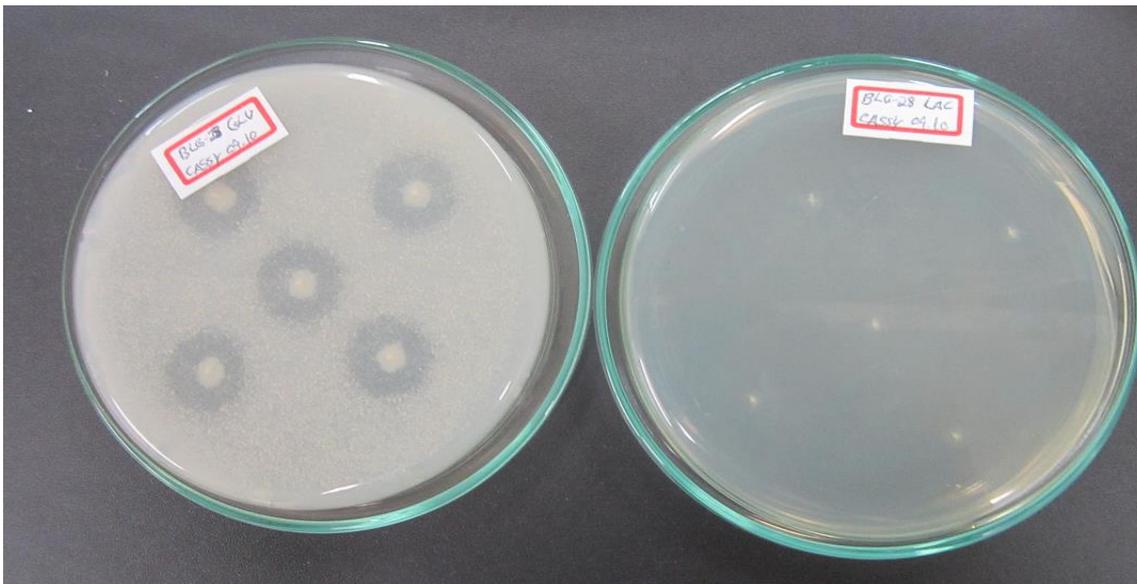


Figura 21. Modificação de tamanho, formas, elevação e bordos das colônias da bactéria INPA BLG 28 em meio com glúten ou lactose.

Outro exemplo de modificações morfológicas que os diferentes meios de culturas podem ocasionar nas bactérias está na Figura 22 com a bactéria BLG38. No meio contendo glúten ela apresenta tamanho grande, tipo de elevação achatada, brilho translúcido, e cor amarela; enquanto que no meio contendo lactose seu tamanho é pequeno, tipo de elevação ondulada, transparente e incolor.

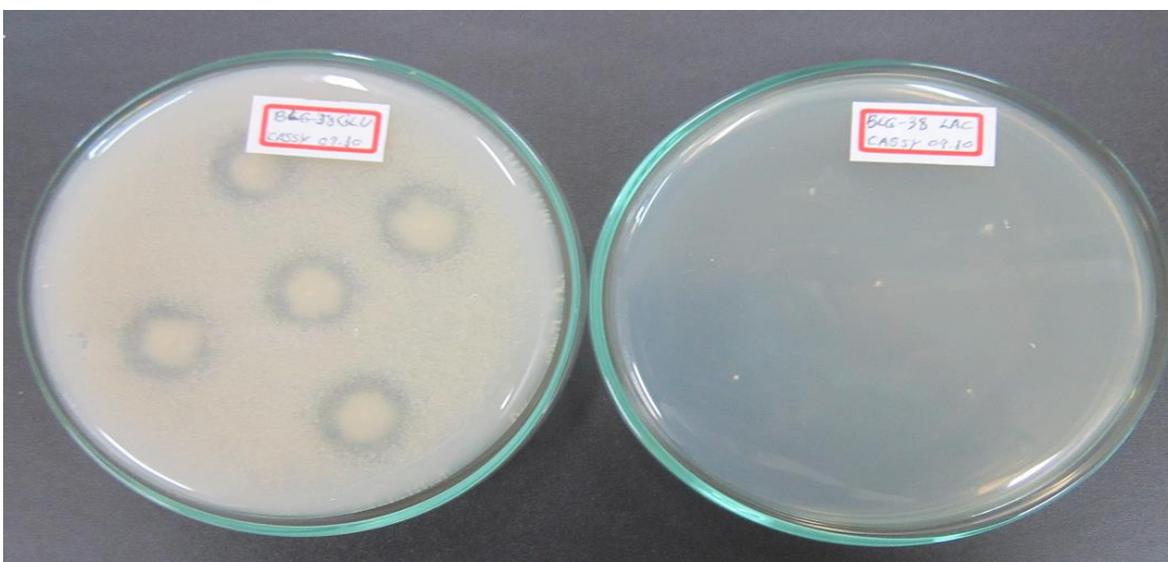


Figura 22. Modificação de tamanho, formas, elevação e bordos das colônias da bactéria INPA BLG 38 em meio com glúten ou lactose.

Tabela 8. Caracterização fenotípica das bactérias em meios com glúten e lactose (a).

Bactéria	Crescimento		Tamanho		Forma		Elevação		Bordos	
	INPA	BLG	GLU	LAC	GLU	LAC	GLU	LAC	GLU	LAC
01			Rápido		Grande		Irregular		Achatada	
02			Rápido		Grande		Irregular		Achatada	
06			Rápido		Grande		Irregular Circular		Achatada	
10			Grande	Pequeno	Rápido		Irregular Circular		Achatada	
16			Grande	Médio	Rápido		Irregular Circular		Elevada	Achatada
18			Rápido		Médio		Circular		Achatada	
22			Rápido		Grande		Irregular		Elevada	Achatada
23			Médio	Grande	Rápido		Circular		Elevada	Achatada
25			Médio	Pequeno	Rápido		Irregular Circular		Elevada	Achatada
28			Rápido		Grande		Irregular		Ondulada	Achatada
32			Rápido		Grande		Circular	Irregular	Achatada.	Elevada
33			Grande	Pequeno	Rápido		Circular		Achatada	Ondulada
35			Grande	Médio	Rápido		Circular		Ondulada	Elevada
38			Grande	Pequeno	Rápido		Circular	Irregular	Ondulada	Achatada
40			Médio	Pequeno	Rápido		Circular		Ondulada	Achatada
45			Grande	Médio	Rápido		Irregular		Elevada	
52			Rápido		Pequeno		Circular		Elevada	Achatada
56			Grande	Médio	Rápido		Circular		Ondulada	
70			Grande	Médio	Rápido		Circular		Achatada	Lobados
73			Rápido		Grande		Circular	Irregular	Achatada	Lobados

Na tabela 9 pôde-se observar que em relação à estrutura das colônias, 11 mantiveram as mesmas características, enquanto que 9 modificaram; 3 mantiveram o mesmo brilho, enquanto que 17 modificaram; 6 mantiveram a mesma cor enquanto que 14 modificaram; e 10 mudaram seu aspecto, enquanto que 10 o mantiveram (Figuras 23 e 24).

Tabela 9. Caracterização fenotípica das bactérias em meios com glúten e lactose (b).

Bactéria INPA BLG	Estrutura		Brilho		Cor		Aspecto	
	GLU	LAC	GLU	LAC	GLU	LAC	GLU	LAC
01	Rugosa	Lisa	Opaco	Translúcido	Branca	Incolor	Membranoso	
02	Rugosa	Lisa	Opaco	Translúcido	Branca	Incolor	Leitoso	Membranoso
06		Lisa	Translúcido	Transparente	Verde	Incolor	Leitoso	
10	Rugosa	Lisa	Translúcido	Opaco		Branca	Membranoso	Leitoso
16		Lisa	Opaco	Transparente	Branca	Incolor	Leitoso	Membranoso
18		Lisa	Opaco	Transparente	Verde	Incolor	Leitoso	
22		Rugosa	Opaco	Translúcido	Verde Azulado	Branca	Membranoso	
23	Rugosa	Lisa	Opaco	Transparente	Branca	Incolor	Leitoso	
25	Rugosa	Lisa	Opaco	Transparente	Branca	Incolor	Leitoso	Membranoso
28		Lisa		Opaco		Branca	Gelatinoso	Membranoso
32		Lisa	Opaco	Transparente	Verde Azulado	Incolor	Membranoso	
33		Lisa	Translúcido	Transparente	Amarela	Incolor	Membranoso	
35		Lisa		Translúcido	Verde	Branca	Membranoso	Leitoso
38	Rugosa	Lisa	Opaco	Translúcido		Branca	Membranoso	
40		Lisa		Translúcido		Branca	Leitoso	Membranoso
45	Rugosa	Lisa	Opaco	Transparente	Branca	Incolor	Gelatinoso	Membranoso
52		Lisa	Opaco	Transparente	Branca	Incolor	Leitoso	Membranoso
56	Rugosa	Lisa	Opaco	Translúcido		Branca	Leitoso	Membranoso
70		Rugosa	Opaco	Translúcido		Branca	Membranoso	
73	Lisa	Rugosa	Opaco	Transparente	Branca	Incolor	Membranoso	

Com base nas tabelas 8 e 9, pôde-se observar que o meio de cultura influenciou nas características morfológicas das bactérias.

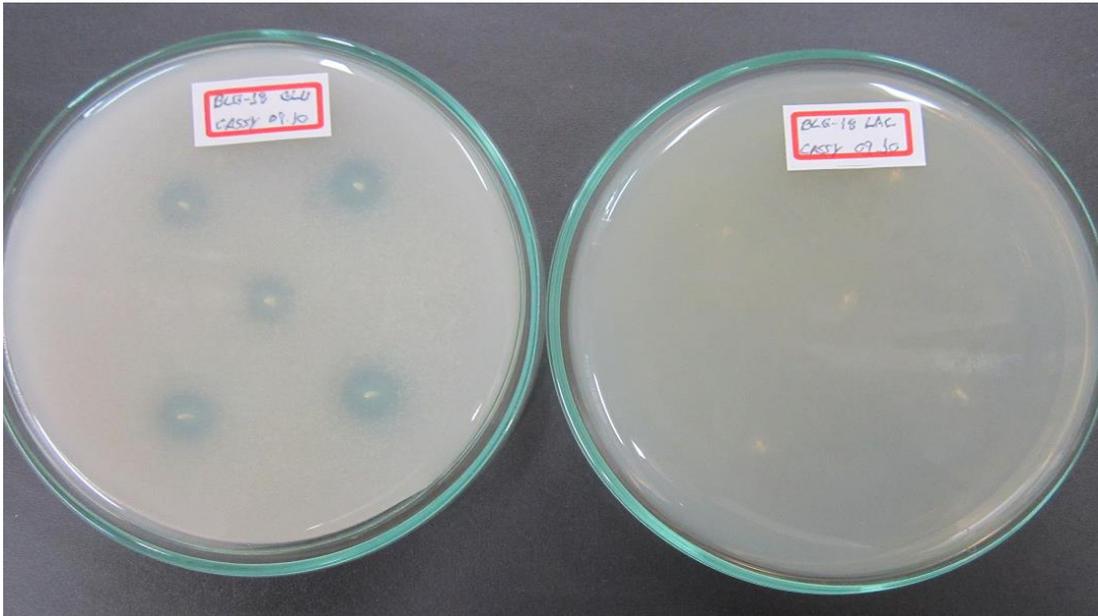


Figura 23. Aspectos das colônias da bactéria BLG18 em meios contendo glúten ou lactose.

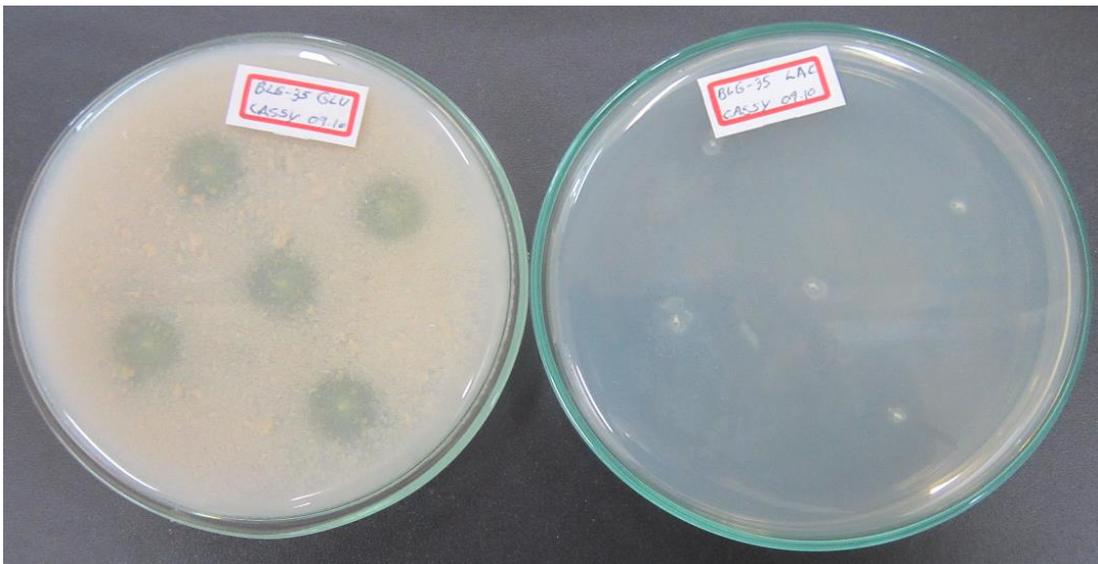


Figura 24. Aspectos das colônias da bactéria BLG35 em meios contendo glúten ou lactose.

### 3.5. Teste de catalase

Como as bactérias patogênicas geralmente são catalase positivas (FURTADO, 2010), esse teste visou ajudar na escolha das bactérias que foram usadas nos testes posteriores. Neste teste, sete bactérias foram catalase positivas, sendo, portanto, capazes de converter  $H_2O_2$  em água e oxigênio gasoso e, treze foram catalase negativas (Tabela 10).

Tabela 10. Teste de Catalase das Bactérias.

Bactérias INPA	Catalase	Bactérias	Catalase
BLG-01	-	BLG-32	+
BLG-02	-	BLG-33	-
BLG-06	-	BLG-35	+
BLG-10	+	BLG-38	-
BLG-16	-	BLG-40	+
BLG-18	+	BLG-45	-
BLG-22	+	BLG-52	-
BLG-23	-	BLG-56	-
BLG-25	-	BLG-70	+
BLG-28	-	BLG-73	-

### 3.6. Coloração de Gram

No teste de coloração de Gram (Tabela 11), 16 bactérias são Gram Negativas e 4 Gram Positivas.

Tabela 11. Teste de Coloração de Gram

Bactéria INPA	Gram
BLG-01	-
BLG-02	-
BLG-06	-
BLG-10	-
BLG-16	-
BLG-18	-
BLG-22	-
BLG-23	-
BLG-25	+
BLG-28	+
BLG-32	-
BLG-33	-
BLG-35	-
BLG-38	+
BLG-40	-
BLG-45	+
BLG-52	-
BLG-56	-
BLG-70	-
BLG-73	-

Para os testes posteriores foram selecionadas as bactérias catalase negativas. A bactéria BLG023 foi descartada para os testes posteriores, mesmo sendo catalase negativa, pois sua classificação taxonômica foi uma das primeiras a ficar pronta e mostrou que é uma bactéria patogênica. Sendo assim, dos treze isolados catalase negativos somente doze foram selecionados para a continuação dos experimentos.

### 3.7. Caracterização genética dos isolados bacterianos

Com base nos resultados, a classificação das 13 bactérias catalase-negativas se encontra na Tabela 12.

Tabela 12. Classificação das bactérias utilizadas no presente estudo

Bactéria	Gênero e espécie (% de similaridade)
INPA BLG 01	<i>Pseudomonas</i> sp. (94 %)
INPA BLG 02	<i>Bacillus</i> sp.(93 %)
INPA BLG 06	<i>Pseudomonas</i> sp. (99 %)
INPA BLG 16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99 %)
INPA BLG 23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (100 %)
INPA BLG 25	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (99 %)
INPA BLG 28	<i>Bacillus</i> sp. (98 %)
INPA BLG 33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (100 %)
INPA BLG 38	<i>Bacillus</i> sp.(99 %)
INPA BLG 45	<i>Burkholderia</i> sp. (100 %)
INPA BLG 52	<i>Brevibacillus parabrevis</i> (98 %)
INPA BLG 56	<i>Achromobacter</i> sp. (97 %)
INPA BLG 73	<i>Bacillus</i> sp. (100 %)

Das 13 bactérias estudadas, foi possível identificar somente quatro ao nível de espécie, com índices de similaridade variando entre 98 % e 100 %. Para identificar as demais, são necessários outros testes complementares, podendo ser classificadas como espécies novas, uma vez que o ambiente amazônico é profícuo em diversidades microbianas novas ou ainda desconhecidas, conforme observado por alguns autores (BONEMAN; TRIPLETT, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1983, 1984; RODRIGUES, 2008; PEREIRA, 2010).

A classificação taxonômica das bactérias BLG01 (94 %), BLG06 (99 %), BLG23 (100 %) e BLG33 (100 %) indicou que estas pertencem ao gênero *Pseudomonas* sp., que constitui a família denominada *Pseudomonadaceae* e caracterizam-se como bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios estritos, a maioria das cepas apresenta motilidade por meio de um

ou mais flagelos polares, são facultativos com exigências mínimas nutricionais, toleram grandes variações de temperatura, podem ser encontrados em vários ambientes, como plantas, solo, frutas e vegetais (STANIER, 1969). Produzem um pigmento verde-amarelado fluorescente em meio B de KING *et al.* (1954) chamado de piocianina, utilizam glicose e outros carboidratos oxidativamente e, em geral, são citocromo oxidase positivos (COELHO, 2006; FERRAREZE *et al.*, 2007; WINN *et al.*, 2008).

Do ponto de vista fenotípico, as *Pseudomonas* eram divididas em dois diferentes grupos, sendo um deles conhecido pela produção de pigmentos fluorescentes sob radiação de baixo comprimento de onda ultra violeta (em torno de 260 nm), e o outro grupo, sem a capacidade de produção desses pigmentos. Através das técnicas de biologia molecular, por homologia DNA-rRNA, foi descoberta a heterogeneidade do gênero *Pseudomonas*, onde vários grupos de espécies foram atribuídos a diferentes novos gêneros (MIORANZA *et al.*, 2014; PALLERONI, 2008).

Com as análises comparativas de 16S rDNA é que essa definição foi estudada com mais detalhes, onde as *Pseudomonas* não fluorescentes poli- $\beta$ -hidroxibutirato negativas, associadas com espécies tipo *P. aeruginosa* e incluindo *P. syringae* e espécies afins são agora incluídos na  $\gamma$ -Proteobacteria. A maioria das *Pseudomonas* não fluorescente poli- $\beta$ -hidroxibutirato positivas como *Acidovorax*, *Burkholderia* e *Ralstonia*, agora está incluída no  $\beta$ -Proteobacteria (YOUNG, 2010).

Muitas espécies do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por participarem do ciclo do carbono na natureza, uma vez que elas estão entre os mais versáteis organismos aeróbicos na degradação de muitos compostos orgânicos de baixo peso molecular. Algumas espécies do gênero são capazes de produzir compostos metabólicos interessantes de utilização na biotecnologia (PALLERONI *et al.*, 1973). As espécies consideradas mais importantes desse grupo são *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, geralmente estudadas com o objetivo de avaliar a promoção de crescimento em plantas, e *Pseudomonas aeruginosa*, considerada patogênica a animais (COELHO, 2006).

Coelho (2006) e Freitas (1994) avaliaram a influência de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* na rizosfera de alface, rúcula, salsa e

batatas, nas quais observaram o aumento do desenvolvimento das bactérias e na produção das plantas. *Pseudomonas* já foram encontradas em amostras de leite recém-obtido e refrigerado em propriedades leiteiras com práticas de higiene inadequadas (FAGUNDES *et al.*, 2006) e em ovos armazenados em temperatura ambiente ou refrigerados (MENDES *et al.*, 2014) por apresentar espécies capazes de produzir enzimas extracelulares resistentes às temperaturas comumente utilizadas no processamento térmico de leite e derivados (GRIFFITHS, 1990), o que pode explicar o isolamento dessas bactérias durante o trabalho.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno muito comum em pacientes de unidades de terapia intensiva em hospitais, tendo suas cepas multirresistentes cada vez mais isoladas das colonizações e infecções epidêmicas e endêmicas nessas unidades (FERRAREZE *et al.*, 2007; WOJKOWSKA-MACH *et al.*, 2006), além da infecção de pacientes com fibrose cística (SILVA-FILHO *et al.*, 2013). Dados apresentados por Figueiredo *et al.* (2007) mostram quantidades elevadas dessa espécie resistentes a múltiplos fármacos, dificuldades nas opções de fármacos para tratamentos combinados e a necessidade de vigilância individualizada do perfil de resistência em cada instituição. Outros trabalhos evidenciam a capacidade dessa bactéria para uso na biorremediação, produzindo biosurfactantes e degradando querosene e outros componentes do petróleo (MOUSSA *et al.*, 2014).

A classificação taxonômica das bactérias BLG02 (93 %), BLG28 (98 %), BLG38 (99 %) e BLG73 (100 %) indicou que estas pertencem ao gênero *Bacillus*, que é da família *Bacillaceae*, sendo extremamente heterogêneo tanto geneticamente (o G + C % das diversas espécies variam de 32 a 69) quanto fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede, etc). Trabalhos citam 265 espécies e 7 subespécies no gênero *Bacillus* spp (EUZÉBY, 2001; MINELLI-OLIVEIRA, 2013).

Segundo Gomes (2013), as espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 X 1,2 µm até 2,5 x 10 µm), esporulados, Gram positivos ou Gram variáveis (coloração de Gram não é positiva nos cultivos jovens); geralmente móveis graças aos cílios peritríquicos. O *B. anthracis* e o *B. mycoides* são

imóveis. Nas espécies móveis, a motilidade é variável, segundo a linhagem. Algumas espécies são capsuladas (*B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. subtilis* podem elaborar cápsula formada de polímeros de ácido glutâmico); aeróbios ou anaeróbios; geralmente catalase positivos; são variáveis ao teste da oxidase.

O cultivo desses microrganismos pode ser difícil, pelo fato de algumas espécies exigirem inúmeros fatores de crescimento; aspecto colonial no agar é variável e o fenômeno de dissociação é frequente. São bactérias com formato de bastonetes, sendo em geral patogênicas para os seres humanos e demais mamíferos, como é o caso do *Bacillus anthracis*, causador do antraz. O *Bacillus cereus* causa gastroenterites e outras infecções (GOMES, 2013). Todas as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem endósporos e muitos produzem toxinas. A palavra bacilo, de uma forma mais geral, também pode ser usada para designar bactérias em forma de bastonetes, não necessariamente pertencentes ao gênero *Bacillus* (GOMES, 2013; MINELLI-OLIVEIRA, 2013). Do ponto de vista biotecnológico, o gênero *Bacillus* é um dos mais importantes e investigados grupos de bactérias produtoras de amilase e outras enzimas comerciais (MINELLI-OLIVEIRA, 2013; PANDEY *et al.*, 2000).

A bactéria BLG52 apresentou 98 % de semelhança com *Brevibacillus parabrevis*. O gênero *Brevibacillus* foi estabelecido em 1996, devido a uma reclassificação genética de cepas anteriormente chamadas de *Bacillus brevis* junto com nove outras espécies (SHIDA *et al.*, 1996), atualmente incluindo 20 espécies (PANDA *et al.*, 2014). É um gênero fenotipicamente grande, podendo ser gram-positivas ou gram-variáveis de acordo com o meio de cultura ou condições experimentais, aeróbicos, anaeróbios facultativos, em forma de haste, podendo ser encontrados em ambientes terrestres, aquáticos e em insetos e animais (NICHOLSON, 2002; PANDA *et al.*, 2014).

Esse gênero inclui uma elevada diversidade de espécies termofílicas, psicrófilas, acidófilas e outras que utilizam uma grande variedade de fontes de carbono para seu crescimento. São muito utilizados na biotecnologia para a produção de proteínas recombinantes, biodegradação, agente de controle biológico, produção de exopolissacarídeos, aumento de vida de prateleira de produtos lácteos fermentados, oxidase de aldeídos, produção de dipeptidase,

amidase e gelatinase e hidrolase de sais biliares (PANDA *et al.*, 2014). Pramila *et al.* (2012) estudaram a possibilidade de uso da espécie *Brevibacillus parabrevis* na biodegradação de polietileno de baixa densidade, obtendo resultados que chegaram perto de degradar completamente esse material. Outro estudo realizado com essa espécie foi o de Khambhala *et al.* (2016) para a produção e estabilidade térmica de celulase.

A classificação taxonômica da bactéria BLG25 indicou que esta pertence ao gênero *Stenotrophomonas*, que é um gênero de bactérias bacilares, gram negativas, aeróbicas, não fermentadoras, que crescem bem em ágar MacConkey (PALLERONI; BRADBURY, 1993). Atualmente possui uma única espécie, que é a *Stenotrophomonas maltophilia* (JULIET; FERNANDEZ, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011), o que indica que essa bactéria pode ser uma *Stenotrophomonas maltophilia*, não excluindo a possibilidade de ser uma espécie nova.

A BLG16 possui 99 % de similaridade com *Stenotrophomonas maltophilia*, que está presente em vários ambientes (água, solo, plantas, alimentos e em hospitais), conhecido antigamente como *Pseudomonas maltophilia* e mais tarde como *Xanthomonas maltophilia*, que vem crescendo como um patógeno oportunista. Apresenta uma resistência intrínseca e adquirida a uma grande variedade de agentes antimicrobianos, possuindo poucas opções de tratamento (BROOKE, 2012; GRACIA-PAEZ *et al.*, 2013; HUGH; GILARD, 1980; NICODEMO; GARCIA-PAEZ, 2007). Está associado a um amplo espectro de síndromes clínicas como pneumonia, infecção da corrente sanguínea, infecções de pele e do trato urinário, endocardite, meningite entre outras (SENOL, 2004) e vem sendo muito estudado para segurança hospitalar (GARCIA-PAEZ *et al.*, 2013; NICODEMO; GARCIA-PAEZ, 2007; NYČ; MATĚLKOVÁ, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2011).

A BLG56 apresentou 97% de similaridade com o gênero *Achromobacter* sp. O gênero *Achromobacter* é um dos 19 gêneros pertencentes à família *Alcaligenaceae*, na classe proteobactérias beta e, atualmente, compreende 15 espécies, algumas sendo patogênicas a humanos (BLUMEL *et al.*, 2001; GOMILA *et al.*, 2014). Trabalhos como os realizados por Gomila *et al.* (2014) e Spilker *et al.* (2013) visam o estudo desse gênero como patógeno humano, suas formas de identificação e

possíveis tratamentos. Outros trabalhos realizados por Berekaa *et al.* (2005) e Jin *et al.* (2015) utilizaram bactérias do gênero para avaliar suas capacidades em biodegradar borracha natural e DBP (di-n-Butil Phthalic – éster de ácido ftálico), respectivamente, e apresentaram resultados positivos para ambos componentes.

As análises fenotípicas tradicionais têm sido consideradas inadequadas para a identificação confiável de espécies de *Achromobacter*, com o sequenciamento por 16S rRNA também não gerando uma delimitação definitiva de espécies bacterianas desse gênero (GOMILA *et al.*, 2014; STACKEBRANDT *et al.*, 2002). Devido a este fator, provavelmente, não foi possível chegar a uma identificação em nível de espécie desse isolado.

A bactéria BLG45 foi identificada como sendo do gênero *Burkholderia* sp., que é formado por bacilos retos gram-negativos não fermentadores, pertencente à família Burkholderiaceae, e inclui cerca de 40 espécies descritas (MORAES, 2014; SAVOIA; ZUCCA, 2007; WIKIPÉDIA, 2017, acessado dia 02/08/2017).

As bactérias desse gênero exibem uma enorme versatilidade metabólica, permitindo sua adaptação a vários ambientes (CHIARINI *et al.*, 2006) e podem ocupar uma grande diversidade de nichos ecológicos naturais ou artificiais, podendo ser isoladas em solos, plantas, animais, humanos e ambiente nosocomial, onde se revelou um emergente patógeno oportunista (GOLDMAN; KLINGER, 1986; MORAES, 2014).

Algumas espécies são de grande interesse agrícola e biotecnológico de indústrias que almejam a biorremediação e o biocontrole (SAVOIA; ZUCCA, 2001). Seu potencial como agente promotor de crescimento em plantações de diversas culturas é opção para uma diversidade de pesticidas e fertilizantes químicos e também como agentes de biorremediação, por serem capazes de degradar compostos existentes em alguns pesticidas e herbicidas utilizados rotineiramente (KILBANE *et al.*, 1983; MORAES, 2014). Entretanto, a sua capacidade de causar infecções em seres humanos também colocou algumas dessas espécies no grupo de patógenos humanos oportunistas, atingindo principalmente pacientes com fibrose cística (FC), pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC), imunodeprimidos e internos em tratamentos intensivos (BERRIATUA *et al.*, 2001).

Em 1950, William Burkholder descreveu uma bactéria que causava podridão em aliáceas a chamando de cepacia, nome derivado de cebola (*Allium cepa*) que posteriormente ficou conhecida como *Pseudomonas cepacia*, um patógeno de plantas (MADIGAN *et al.*, 2004). Também foi descrito como um patógeno humano que causava endocardite bacteriana.

Com o avanço da biologia molecular foi possível a realização da análise taxonômica molecular de cepas dessa espécie de *Pseudomonas*, ocasionando a descoberta do gênero *Burkholderia*, sendo a espécie *B. cepacia* considerada espécie tipo deste novo gênero (YABUUCHI *et al.*, 1992). Mais tarde, estudos de taxonomia polifásica revelaram que *B. cepacea* não era uma única espécie, constituindo um “complexo” composto de novas espécies similares fenotipicamente, chamadas de genomovares (VANDAMME *et al.*, 2002).

#### **4. Conclusões**

Foram isoladas 75 bactérias dos 10 tipos de queijo e 10 tipos de iogurtes usados para os testes.

Todas as 75 bactérias apresentaram elevado crescimento nas primeiras 24 horas de avaliação em ambos os meios de cultura testados (glúten ou lactose).

Das 75 bactérias testadas, 61 apresentaram formação de halo de degradação em meio contendo glúten.

Pelo Índice de Degradação de Glúten (IDG), das 61 bactérias avaliadas, 22 não apresentaram IDG durante o teste, 30 apresentaram IDG's considerados baixos, 9 IDG's foram considerados médios e nenhuma apresentou IDG considerado alto.

A fonte de carbono do meio de cultura (glúten ou lactose) influenciou as características morfológicas das colônias das 20 bactérias selecionadas como as melhores.

No teste de coloração de Gram, 16 bactérias foram Gram Negativas e 4 Gram Positivas.

No teste de catalase, sete bactérias foram catalase positivas e 13 foram catalase negativas.

Das 13 bactérias usadas na caracterização genética, foi possível identificar somente quatro ao nível de espécie. Quatro isolados são do gênero *Pseudomonas* sp., quatro do gênero *Bacillus* sp., duas do gênero *Stenotrophomonas* sp., uma do gênero *Brevibacillus* sp., uma do gênero *Achromobacter* sp. e uma do gênero *Burkholderia* sp.

Das 13 bactérias selecionadas, a BLG16, BLG23, BLG25 e BLG33 são consideradas patogênicas aos animais.

As bactérias BLG01, BLG02, BLG06, BLG28, BLG38, BLG45, BLG52, BLG56 e BLG73 são de gêneros já estudados para uso biotecnológico, mas não se descarta a possibilidade de serem patogênicas.

**CAPÍTULO 2:**  
**Crescimento das bactérias em meios de cultura contendo  
lactose ou glúten como fontes de carbono**

## Resumo

A intolerância à lactose e ao glúten são duas anomalias que ocorrem em parte da população humana, que podem ser minimizadas ou solucionadas por microrganismos capazes de produzirem as enzimas que degradam esses dois componentes alimentícios. Com o objetivo de avaliar doze bactérias selecionadas de testes anteriores, foram realizados experimentos de laboratório em meio líquido contendo lactose ou glúten como fonte de carbono em pH's de 2,3 (semelhante ao do estômago) e 8,0 (semelhante ao dos intestinos) nas temperaturas de 37 °C e 55 °C. As bactérias utilizadas foram: BLG01 (*Pseudomonas* sp.), BLG02 (*Bacillus* sp.), BLG06 (*Pseudomonas* sp.), BLG16 (*Stenotrophomonas maltophilia*), BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.). As doze bactérias mostraram potencial para serem usadas como probióticas (após confirmação de não patogenicidade) ou como supridoras de enzimas capazes de degradarem a lactose e o glúten. Todas as bactérias mostraram sensibilidade à acidez equivalente à do estômago e à alcalinidade equivalente à dos intestinos humanos. Essa bipolaridade acidez/alcalinidade pode ser um mecanismo de defesa do organismo humano contra a ação de bactérias patogênicas ou indesejáveis. Para que bactérias desejáveis sejam utilizadas como probióticas, elas precisam ser ingeridas em altas concentrações. A maioria das bactérias mostrou menos sensibilidade à acidez do estômago (pH 2,3) no meio contendo glúten do que em lactose. Nas condições de alcalinidade (pH 8,0) não houve tanta diferença no crescimento das bactérias entre os dois meios de cultura. Das doze bactérias testadas, as com maiores potenciais de utilização como probióticas, desde que comprovadamente não sejam patogênicas, são as BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.) por fazerem parte de gêneros com pouca possibilidade de patogenicidade e por apresentarem crescimento positivo nas duas primeiras horas em pH 2,3, semelhante ao do estômago. O uso de pH 2,3 ou 8,0 a uma temperatura de 55 °C pode servir para diminuir as possibilidades de contaminações de bactérias indesejáveis no processo de produção industrial de probióticos.

**Palavras-chave:** Metabolismo microbiano, intolerância à lactose, doença celíaca.

## Abstract

Lactose and gluten intolerance are two anomalies that occur in part of the human population, which can be minimized or solved by microorganisms capable of producing the enzymes that degrade these two food components. In order to evaluate twelve bacteria selected from previous tests, laboratory experiments were performed in a liquid medium containing lactose or gluten as a source of carbon at pH of 2.3 (similar to that of the stomach) and 8.0 (similar to that of the intestines) at temperatures of 37 ° C and 55 ° C. The bacteria used were BLG01 (*Pseudomonas* sp.), BLG02 (*Bacillus* sp.), BLG06 (*Pseudomonas* sp.), BLG16 (*Stenotrophomonas maltophilia*), BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), BLG28), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) and BLG73 (*Bacillus* sp.). The twelve bacteria showed potential to be used as probiotics (after confirmation of non-pathogenicity) or as suppliers of enzymes capable of degrading lactose and gluten. All bacteria showed sensitivity to acidity equivalent to that of the stomach and alkalinity equivalent to that of the human intestines. This acidity / alkalinity bipolarity can be a defense mechanism of the human organism against the action of pathogenic or undesirable bacteria. For desirable bacteria to be used as probiotics, they need to be ingested at high concentrations. Most bacteria showed less sensitivity to acidity of the stomach (pH 2.3) in the medium containing gluten than in lactose. At alkalinity conditions (pH 8.0), there was not as much difference in the growth of bacteria between the two culture media. From the 12 bacteria tested, those with the highest potential for use as probiotics, if not pathogens, are BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) and BLG73 (*Bacillus* sp.) because they are part of genera with little possibility of pathogenicity and because they present positive growth in the first two hours at pH 2.3, similar to that of the stomach. The use of pH 2.3 or 8.0 at a temperature of 55 ° C may serve to decrease the chances of contamination of undesirable bacteria in the industrial production process of probiotics.

**Key words:** Microbial metabolism, lactose intolerance, celiac disease.

## 1. Introdução

A lactose (Galactose  $\beta$ -1,4 glucose) é o carboidrato característico do leite, sendo o constituinte predominante e menos variável da sua matéria seca. É o mais importante em quantidade dos sólidos não graxos (ALMEIDA, 2008; VEISSEYRE, 1988). É um dissacarídeo redutor sintetizado nas células alveolares das glândulas mamárias, formado por dois monossacarídeos, uma molécula de  $\alpha$ -d-glicose e uma de  $\beta$ -d-galactose, sendo um dos componentes quase que exclusivos do leite (5 % da composição molecular) e tem como principal função, melhorar a absorção de cálcio, ferro e fósforo (BARBOSA; ANDREAZZI, 2010; CARMINATTI, 2001; PERATI *et al.*, 2014; VOGEL, 2000).

Apesar de sua importância na alimentação humana, parte da população mundial apresenta intolerância a esse carboidrato, sendo necessário o uso da lactase para degradá-lo antes do consumo (RICHMOND *et al.*, 1981). Entre as fontes produtoras dessa enzima se encontram microrganismos, que pode então ser usados para essa finalidade (DE GRAAF; VENEMA, 2007; EGERT *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2008; LOMER *et al.*, 2007).

Glúten de trigo é um termo geral para as proteínas da farinha de trigo pouco solúveis em água. De um ponto de vista bioquímico, o glúten é uma mistura de quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e globulinas são aproximadamente 15 % das proteínas. Os restantes 85 % correspondem às proteínas monomérica e polimérica, denominadas gliadina e glutenina (Figura 10), dos quais 40 % são gliadinas (PALMU, 2003).

A importância do glúten na indústria alimentícia deve-se às propriedades das suas proteínas. Estas desempenham um papel fundamental na determinação da qualidade do trigo, especialmente no cozimento, ao conferir capacidade de absorção da água, retenção de gás, coesividade, viscosidade e elasticidade à massa (MEIRINHO, 2009). Está presente em cereais como o trigo, o centeio, a cevada e a aveia (HILL *et al.*, 2005).

A doença celíaca, também conhecida como enteropatia sensível ao glúten, é uma doença intestinal inflamatória crônica, autoimune permanente, que se manifesta em indivíduos com predisposição genética através da

ingestão de prolaminas (MEIRINHO, 2009; MORÓN *et al.*, 2009). É causada por uma intolerância permanente ao glúten (HILL *et al.*, 2005). A fração tóxica do glúten é a gliadina, sendo esta a responsável pelas manifestações clínicas da doença (MCGOUGH; CUMMINGS, 2005). Tem prevalência entre 0,5-1,0 % da população mundial, mas entre os pacientes diabéticos é maior, variando entre 2,2 % e 13,8 % (3,4), com uma média de 4,1 % nos países europeus (MONT-SERRAT *et al.*, 2008).

O tratamento deve ser realizado tanto em pacientes sintomáticos quanto nos assintomáticos com alterações histológicas, sendo que na maioria dos casos os sintomas desaparecem. A substituição dos alimentos com glúten geralmente é realizada usando milho, fubá, arroz, batata, mandioca, polvilho doce e azedo (derivados da fécula da mandioca), soja e suas farinhas (SILVA, 2010a).

Microrganismos produzem uma vasta diversidade enzimática, podendo ser usados como probióticos para a degradação do glúten e da lactose no sistema digestório ou, no caso de não comporem a flora intestinal ou por serem patogênicos aos seres humanos, serem fontes de proteases e lactases que degradam esses componentes presentes em diferentes alimentos. Com isso, a ingestão de alimentos contendo o glúten e/ou lactose passa a ser mais eficiente, resultando em maior biodigestibilidade e diminuindo ou eliminando seu efeito nocivo.

Essa possibilidade existe devido à alta diversidade enzimática e capacidade dos microrganismos em adaptar-se a ambientes extremos como pH, temperatura, pressão e concentração de sal diferentes dos padrões para a maioria dos seres vivos (LASA; BERENGER, 1993). A temperatura é o que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas (MADIGAN; OREN, 1999).

Estudos usando microrganismos para amenizar os efeitos da doença Celíaca já estão sendo realizados. Um exemplo é o artigo de Di Cagno *et al.* (2002) em que bactérias lácticas foram utilizadas na hidrólise de proteínas, incluindo uma que é tóxica para os celíacos, e verificaram resultados positivos. Outros exemplos são os trabalhos de Auricchio *et al.* (1984) e Picarelli *et al.* (1999), nos quais foram realizados testes para facilitar a identificação de peptídeos tóxicos e estimar sua danificação sobre o intestino

de pessoas celíacas, além do efeito de ácido lático produzidas por bactérias lácticas sobre esses peptídeos.

Visando obter bactérias e enzimas capazes de degradar a lactose e o glúten, essa pesquisa teve como objetivo, testar as habilidades de 12 bactérias em crescerem sob a temperatura corporal humana (37 °C) e em 55 °C (para produção industrial, onde altas temperaturas são desejáveis por dificultarem a presença de microrganismos oportunistas termófilos) e, sob pH's encontrados no estômago (ácido, 2,3) e intestinos (alcalino, 8,0), além de um pH próximo à neutralidade para comparação (6,5).

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Crescimento bacteriano em meios líquidos contendo lactose e ou glúten em diferentes pH's e temperaturas**

Com o objetivo de verificar a curva de crescimento e produção de metabólitos degradadores de lactose e de glúten, as 12 bactérias que foram catalase-negativas no capítulo 1 foram testadas quanto ao crescimento em meio líquido contendo lactose ou glúten como fonte de carbono: 1 % lactose/glúten, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>, 0,1 g NaCl, 0,5 g extrato de levedura em 1 L de água destilada.

Um volume de 50 mL do meio foi adicionado em Erlenmeyers com capacidade de 125 mL e esterilizados a 120 °C por 40 min. Após o esfriamento, cada um dos microrganismos foi inoculado e colocado em agitador constante sob uma temperatura de 37 °C.

Após o crescimento, foi feita a padronização da quantidade de células bacterianas para 10<sup>5</sup> bactérias.mL<sup>-1</sup> de cada isolado utilizando a câmara de Neubauer, colocadas em Erlenmeyers contendo 50 mL do meio de cultura com lactose ou glúten em cada pH estipulado: 2,3, 6,5 e 8,0.

Uma alíquota de 1 mL do caldo foi retirada na hora do inóculo e ao longo do tempo sob as duas temperaturas (37 °C e 55° C) e meios diferentes (lactose e glúten). Foi feita a leitura da absorbância em placas de Elisa no comprimento de onda de 595 nm. Também foi feita a contagem de células pela câmara de Neubauer. Todas as análises foram feitas com 4 repetições.

Foram realizados dois experimentos em meio contendo glúten, sendo um testando duas concentrações de células ( $10^6$  e  $10^7$ .mL<sup>-1</sup>) em pH 2,3, tendo como base, suas sensibilidades a esse pH nos testes anteriores com lactose e, outro usando uma concentração de  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup> no pH 8,0. A premissa usada nesses experimentos foi imaginar a possibilidade de usá-las como probióticas, caso se confirmem como não patogênicas em testes posteriores. A ingestão de maiores concentrações dessas bactérias pode resultar em maiores números de células vivas a passarem pelo estômago, esperando que pelo menos  $10^5$ .mL<sup>-1</sup> cheguem aos intestinos como elas se comportam nessa parte do sistema digestório.

### **3. Resultados e discussão**

O crescimento bacteriano é um processo complexo que envolve um grande número de reações anabólicas (síntese de constituintes celulares e metabólitos) e catabólicas (desagregação de constituintes celulares e metabólitos) (MAIER, 2008).

Pode-se observar na tabela 13 que as bactérias se mostraram mais sensíveis à acidez do que à alcalinidade dos meios de cultura.

Nos meios com o pH 2,3, que é similar ao do estômago humano, a maioria das bactérias cresceu melhor no meio contendo glúten como fonte de carbono, exceto a BLG25, BLG28, BLG38, BLG45 e BLG73, que apresentaram crescimentos semelhantes nos dois meios.

Nos meios com o pH 8,0, semelhante aos dos intestinos humanos, não houve tanta diferença entre os meios contendo lactose ou glúten.

No meio com pH 8,0, quatro das doze bactérias se adaptaram melhor em meio contendo glúten (BLG01, BLG28, BLG38 e BLG52), cinco em meio contendo lactose (BLG02, BLG06, BLG16, BLG25 e BLG56) e três (BLG33, BLG45 e BLG73) apresentaram crescimento semelhante em ambas as fontes de carbono.

Tabela 13. Crescimento das bactérias em meio contendo lactose e glúten à temperatura de 37 °C e dois pH's.

Bactérias INPA	pH 2,3			pH 8,0			Médias gerais
	Lactose	Glúten	Médias	Lactose	Glúten	Médias	
	-----10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----						
BLG01 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	4,0	20,0	12,0 b	386,8	547,3	467,1 b	239 B
BLG02 ( <i>Bacillus</i> sp.)	4,2	27,0	15,6 b	1243,7	940,8	1092,2ab	554 B
BLG06 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	4,4	16,0	10,3 b	684,7	206,7	445,7 b	228 B
BLG16 ( <i>S. maltophilia</i> )	4,3	140,0	71,9 b	1248,3	540,5	894,4 ab	483 B
BLG25 ( <i>Stenotrophomonas</i> sp.)	4,2	8,0	6,1 b	437,5	281,5	359,5 b	183 B
BLG28 ( <i>Bacillus</i> sp.)	4,0	5,0	4,7 b	293,7	858,8	576,2 b	290 B
BLG33 ( <i>P. aeruginosa</i> )	4,6	1373,0	689 a	2834,3	2541,7	2688,0 a	1688 A
BLG38 ( <i>Bacillus</i> sp.)	4,0	4,0	4,2 b	439,3	524,2	481,8 b	243 B
BLG45 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	4,0	4,0	4,1 b	406,5	473,3	439,9 b	222 B
BLG52 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> )	3,8	112,0	57,9 b	379,3	599,3	489,3 b	274 B
BLG56 ( <i>Achromobacter</i> sp.)	3,7	100,0	52,0 b	433,3	243,2	338,2 b	195 B
BLG73 ( <i>Bacillus</i> sp.)	3,8	5,0	4,6 b	514,8	545,7	530,2 b	267 B
Médias	4,1 bB	151,3 bA		775,2aA	691,9 aA		

De um modo geral, a bactéria com maior concentração de células em ambos os meios de cultura foi a BLG33 (*P. aeruginosa*), com 1688,4 x 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> e as com menores crescimentos foram a BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.) com 182,8 x 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> e a BLG56 (*Achromobacter* sp.) com 195,0 x 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>.

### 3.1. Crescimento das bactérias em meio líquido contendo lactose

Essa parte do trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade das doze bactérias em degradarem a lactose, visando proporcionar alternativas microbiológicas para minimizar ou solucionar o problema das pessoas que possuem intolerância à esse carboidrato.

Na tabela 14 observa-se que sob um pH 6,5, nas primeiras 4 horas de crescimento, a bactéria BLG02 foi a única que apresentou crescimento celular acima de  $100 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>, sendo superior a quase quatro vezes a segunda com maior crescimento (INPA BLG 38) e 15 vezes ao da com menor crescimento (BLG 33). Esse maior crescimento inicial demonstra uma maior adaptação às condições do meio de cultura para degradar a lactose. Essa característica de melhor performance microbiana já foi observada por diversos autores em situações de meios diferentes, bem como pH's e temperaturas diferentes (HARA; OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA; MAGALHÃES, 1999), o que os levou a considerar essa característica resiliente inicial como uma qualidade altamente desejável quando se pretende selecionar os melhores.

Tabela 14. Crescimento das bactérias em meio contendo lactose na temperatura de 37 °C e pH 6,5.

Bactéria INPA	Horas						Médias
	0	4	8	12	24	28	
	----- 10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----						
BLG01 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	1 D	26 C	156 B	118 BC	268 A	242 A	135 i
BLG02 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 E	232 D	526 C	938 B	2037 A	2054 A	965 d
BLG06 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	1 F	29 E	184 D	716 C	6412 B	6956 A	2383 b
BLG16 ( <i>S. maltophilia</i> )	1 E	51 D	307 C	587 B	1046 B	1041 A	505 f
BLG25 ( <i>Stenotrophomonas</i> sp.)	1 D	41 C	187 B	216 B	514 A	512 A	245 g
BLG28 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 E	42 D	316 C	574 B	550 A	654 BC	356 f
BLG33 ( <i>P. aeruginosa</i> )	1 E	15 C	502 C	3912 B	5919 A	5537 A	2648 a
BLG38 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 C	86 B	312 B	327 B	291 A	995 A	335 g
BLG45 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	1 E	36 D	172 BC	369 B	454 C	529 A	260 h
BLG52 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> )	1 F	19 E	82 D	138 C	891 A	641 B	295 g
BLG56 ( <i>Achromobacter</i> sp.)	1 E	55 D	312 C	659 B	1306 A	1297 A	605 e
BLG73 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 E	20 D	309 C	762 B	4475 A	4537 A	1684 c
Médias	1E	54 D	280 C	776 B	2013 A	2083 A	

Obs. Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No entanto, não se pode ignorar a capacidade das bactérias em se reproduzirem no meio de cultura ao longo do tempo, após essa adaptação inicial. Essas diferenças são observadas dentro de todos os tempos de avaliação, com as maiores concentrações sendo encontradas às 24 e 28 horas de crescimento.

Quando se observa o crescimento médio das bactérias ao longo de 28 horas, pode-se notar que as INPA BLG 33 e BLG 06, classificadas como *Pseudomonas*, foram as que apresentaram as maiores concentrações médias, respectivamente 3177 e 2859 UFC por mL, principalmente devido às

suas maiores concentrações às 24 e 28 horas de crescimento. Isso denota um maior aproveitamento dessas duas bactérias em usarem o meio de cultura, em pH 6,5 e a lactose para seus crescimentos celulares, característica essa, já observada na literatura e usada na seleção dos melhores microrganismos para diferentes finalidades (CHAGAS JR *et al.*, 2010; HARA; OLIVEIRA, 2005). A bactéria INPA BLG 01 por outro lado, foi a que apresentou menores concentrações durante o período de avaliação, indicando maior dificuldade de usar a lactose para seu crescimento mesmo em um pH próximo à neutralidade e mais adequado para o crescimento da maioria dos microrganismos encontrados em alimentos (DOOLEY; ROBERTS, 2000).

Não houve uma relação entre os gêneros dessas bactérias e suas habilidades em crescerem nesse meio de cultura e nesse pH, pois as diferentes espécies e/ou estirpes de *Pseudomonas* e *Bacillus* mostraram crescimentos variáveis nessas condições experimentais.

As figuras a seguir mostram as curvas de crescimento celular no comprimento de onda de 595 nm das 12 bactérias estudadas quando cultivadas na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0. Todos os gráficos possuem desvio padrão. Neles pode-se observar que tanto o pH 2,3 quanto o pH 8,0 foram limitantes para o crescimento das células bacterianas das doze bactérias quando comparados com o crescimento em um pH controle (6,5), mais adequado para seus crescimentos. Essa dificuldade em crescer sob um pH ácido semelhante ao do estômago humano e um alcalino semelhante ao do nosso intestino mostra o quanto é importante a acidez estomacal e a alcalinidade intestinal para a saúde humana, pois a maioria dessas bactérias apresenta potencial para serem patogênicas (COELHO, 2006; FERRAREZE *et al.*, 2007; GOMES, 2013; NEVES *et al.*, 2011) e suas sensibilidades a esses dois pHs garante que não cresçam com facilidade em nosso trato digestório com facilidade ao ponto de causarem danos à nossa saúde, exceto se forem ingeridas em altas concentrações. As poucas bactérias que por ventura estiverem em alimentos e que conseguem sobreviver à acidez do estômago, ao passarem para o intestino diminuem drasticamente e essas duas reduções simultâneas reduzem seus potenciais patogênicos ao ponto de

não causarem sequelas ao ser humano se ingeridas com concentrações normalmente acima das encontradas nos alimentos.

O fato das três *Pseudomonas* estudadas serem altamente sensíveis ao pH ácido semelhante ao do nosso estômago e também, em não crescerem nesse ambiente ao longo do tempo (Figura 25, 26 e 27), é uma garantia de que dificilmente alcançarão os intestinos em concentrações que possam causar sequelas. Caso passem para os intestinos, elas têm condições de crescerem ao longo do tempo nesse ambiente. No entanto, ao contrário de um ambiente sem competição asséptico do meio de cultura, nos intestinos elas vão encontrar uma microflora altamente competitiva e até antagônica a elas, criando barreiras que limitam seus crescimentos nessa parte do corpo humano.

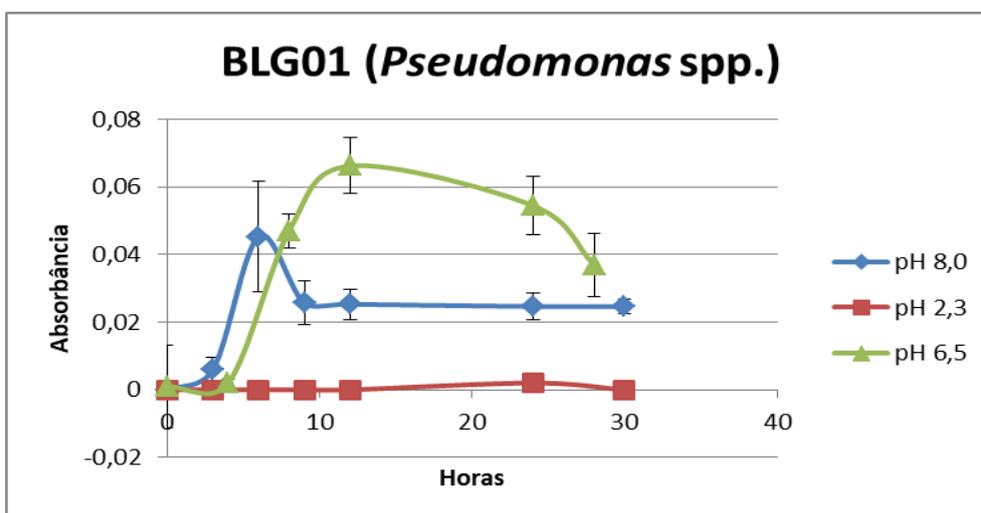


Figura 25. Curva de crescimento de células das bactérias BLG01 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

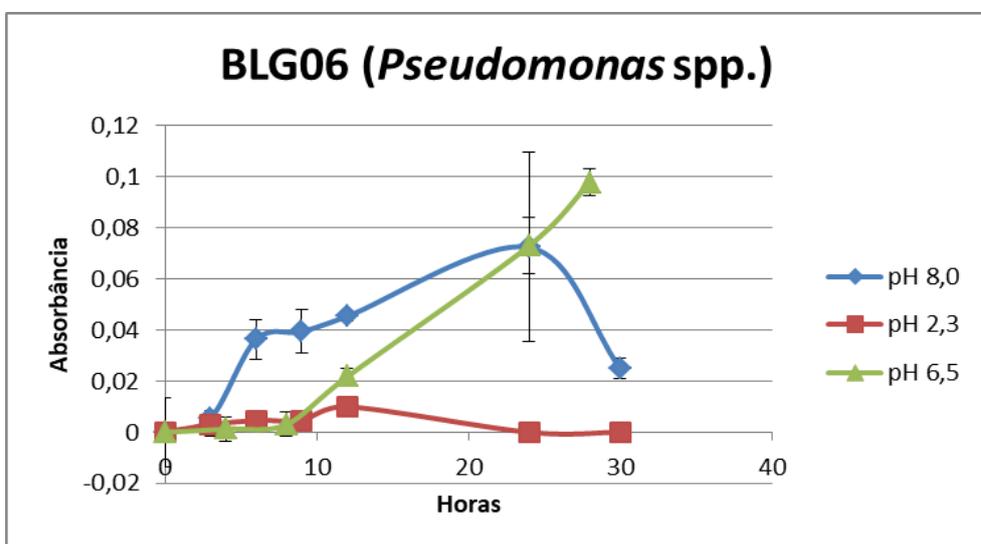


Figura 26. Curva de crescimento de células das bactérias BLG06 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

Keskin e Ekmekçi (2008), constataram que as *Pseudomonas aeruginosa*, como a BLG33 (Figura 27), são capazes de crescer em meios com pHs acima de 6,0, mas não em pH 5,0, bem acima dos 2,3 do presente estudo e semelhante ao encontrado no estômago humano.

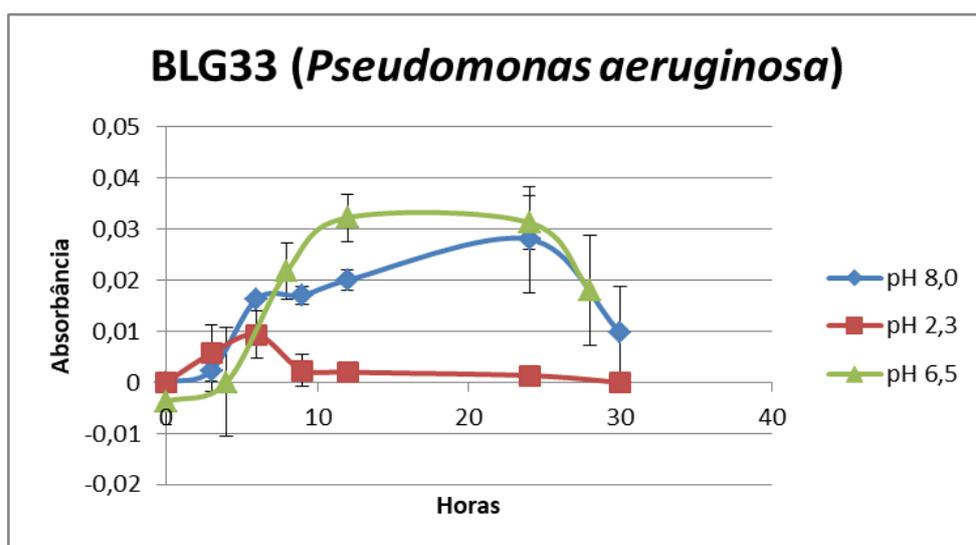


Figura 27. Curva de crescimento de células das bactérias BLG33 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

Essa alta sensibilidade das pseudomonas ao pH semelhante ao encontrado no estômago garante que ao entrar no intestino suas populações estariam debilitadas ao ponto de não causarem danos severos à nossa saúde, o que poderia explicar que suas presenças nos queijos não é um problema de segurança alimentar como poderia se supor. Esse raciocínio é válido apenas no caso de se comprovar que as três bactérias são patogênicas ao ser humano, principalmente a *Pseudomonas aeruginosa* (BLG33), pelo seu histórico de causar mortes de seres humanos, em particular, de indivíduos debilitados em condições hospitalares (NEVES *et al.*, 2011). As outras duas *Pseudomonas* spp. têm menores possibilidades de serem patogênicas, aumentando seus potenciais de uso como probióticos se essa patogenicidade não existir. A BLG 06 (Figura 26) apresenta um maior potencial de utilização, pois é menos sensível ao pH alcalino do intestino,

bastando para isso, ser ingerida em altas concentrações para que mais células sobrevivam ao pH ácido do estômago.

Apesar de não poder recomendá-las, a princípio, como probióticos, até que se comprove não serem patogênicas ao ser humano e demais animais, não se exclui a utilização dos seus potenciais enzimáticos capazes de degradar a lactose e o glúten, cujas presenças em alimentos causam problemas de saúde à parte da população mundial intolerante a esses dois componentes alimentícios (COELHO, 2006; MENDES *et al.*, 2014; PANDEY *et al.*, 2000).

O mesmo raciocínio pode ser usado com as duas *Stenotrophomonas* (Figuras 28 e 29), a *Burkholderia* sp. (Figura 30) e a *Achromobacter* sp. (Figura 31) encontradas nos alimentos estudados. Dessas, a única que apresentou algum crescimento populacional elevado no meio ácido foi a BLG 25 (*Stenotrophomonas* sp.) nas primeiras horas de incubação. Esses três gêneros de bactérias possuem tanto espécies e estirpes patogênicas como não patogênicas aos seres humanos (BERRIATUA *et al.*, 2001; GRACIA-PAEZ, 2007; MORAES, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2011; SAVOIA; ZUCCA, 2001) e estudos posteriores devem ser realizados para verificar se elas podem ser usadas como probióticos na alimentação humana e/ou de outros animais. Dessas, as com maiores potenciais são as *Stenotrophomonas maltophilia* e a *Burkholderia* sp, por mostrarem melhores crescimentos no meio com pH 8,0, semelhante ao dos nossos intestinos. Para colonizarem essa parte do sistema digestório, precisariam ser ingeridas em grandes concentrações para que parte das células consigam sobreviver no estômago no curto espaço de tempo antes de se alojarem nos intestinos.

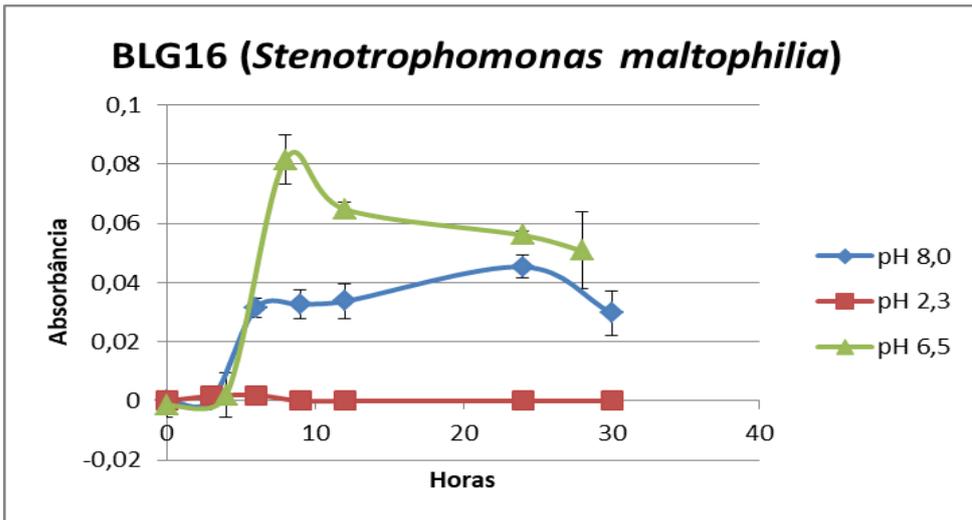


Figura 28. Curva de crescimento de células das bactérias BLG16 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

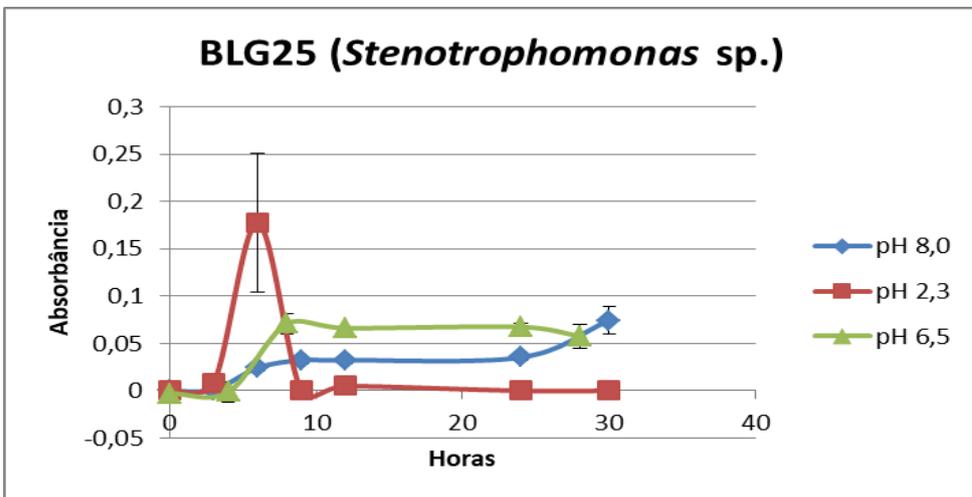


Figura 29. Curva de crescimento de células das bactérias BLG25 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

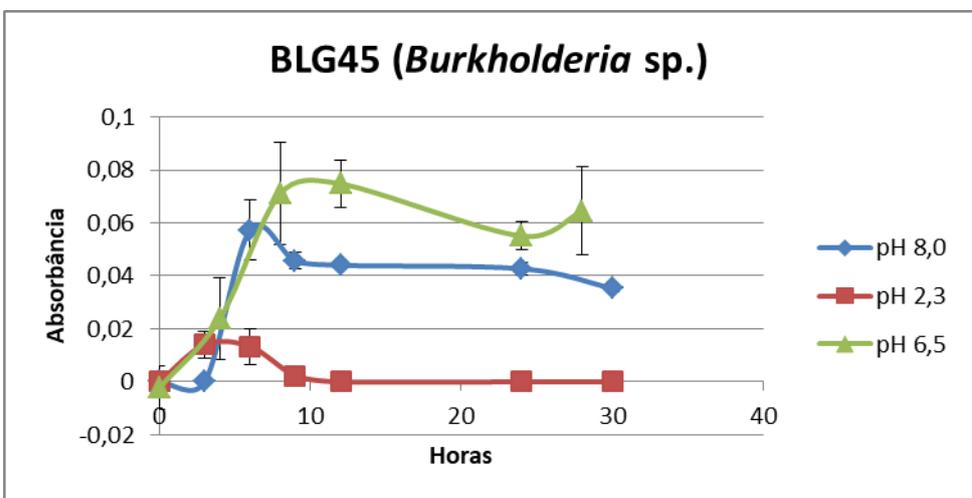


Figura 30. Curva de crescimento de células das bactérias BLG45 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

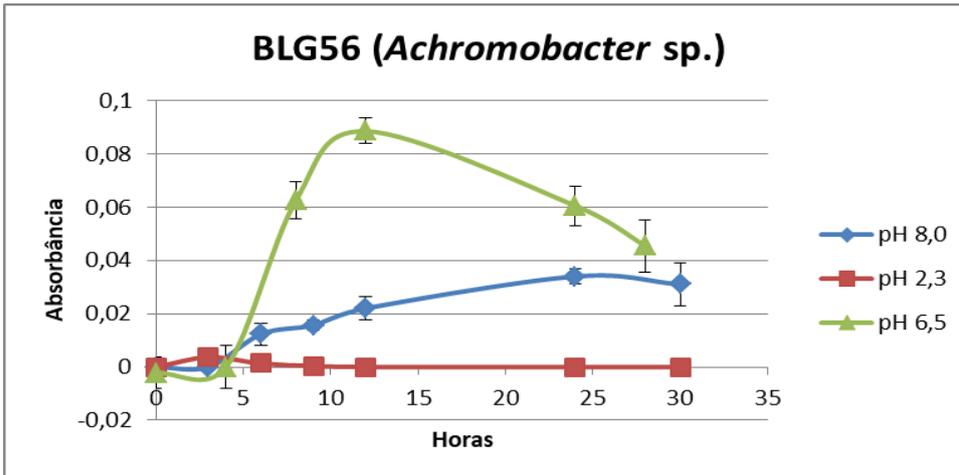


Figura 31. Curva de crescimento de células das bactérias BLG56 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

O crescimento da BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*) nos meios com diferentes pHs (Figura 32), apresentou baixo crescimento no meio contendo lactose como fonte de carbono nas primeiras 10 horas de crescimento, independente dos seus pHs, sendo sensível ao pH 2,3, crescendo nos meios com pHs 6,5 e 8,0, mas mostrando-se mais adaptada ao pH 6,5. O ápice de crescimento nesse meio ocorreu com 24 horas de incubação. Caso não seja patogênica, precisaria ser ingerida em grandes concentrações e levaria um tempo maior para se desenvolver no pH 8,0 dos intestinos. A sua utilização em potencial seria isolar suas lactases para serem ingeridas ou então, adicionadas em alimentos contendo lactose (PANDA *et al.*, 2014).

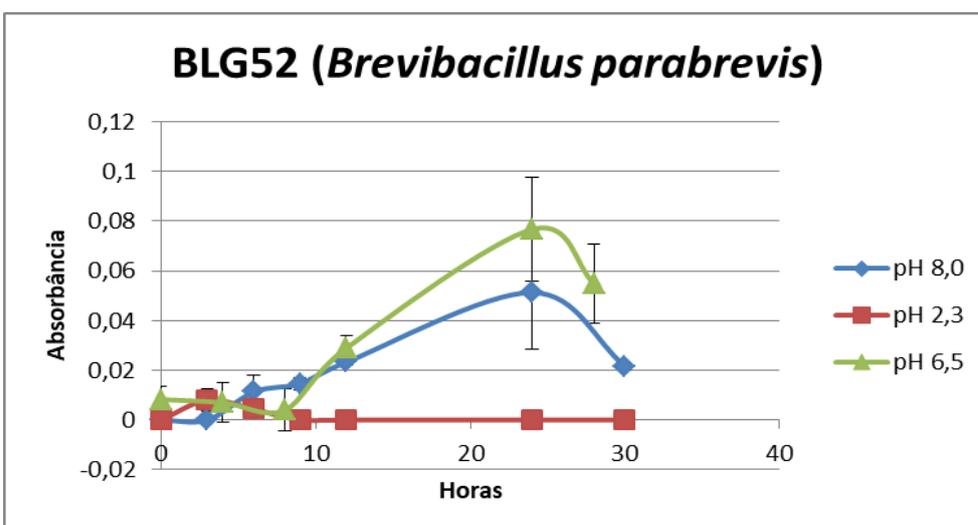


Figura 32. Curva de crescimento de células da bactéria BLG52 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

Esse gênero inclui uma grande diversidade de espécies que utilizam uma grande variedade de fontes de carbono para seu crescimento. São muito utilizados na biotecnologia para a produção de proteínas recombinantes, biodegradação, agente de controle biológico, aumento de vida de prateleira de produtos lácteos fermentados, oxidase de aldeídos, produção de dipeptidase, amidase e gelatinase e outros (PANDA *et al.*, 2014). Pramila *et al.* (2012) estudaram o seu uso na biodegradação de polietileno de baixa densidade, obtendo resultados que chegaram perto de degradar completamente esse material. Outro estudo realizado foi o de Khambhala *et al.* (2016) para a produção e estabilidade térmica de celulase.

Ao se analisar as figuras contendo os dados dos isolados de *Bacillus* sp (Figuras 33, 34, 35 e 36), observa-se que todos foram sensíveis ao pH 2,3, com exceção da BLG73 que mostrou um leve crescimento nesse meio quatro horas após inoculada. Caso sejam ingeridas em grandes quantidades, a com maior potencial de colonizar os intestinos é a BLG38, devido ao crescimento bem mais elevado (vide escalas de absorvâncias nos gráficos) após 20 horas de crescimento no meio com pH 8,0. Na impossibilidade de serem usadas como probióticos, sobre a possibilidade do uso de suas lactases em alimentos ou para serem ingeridas antes das refeições com alimentos ricos em lactose.

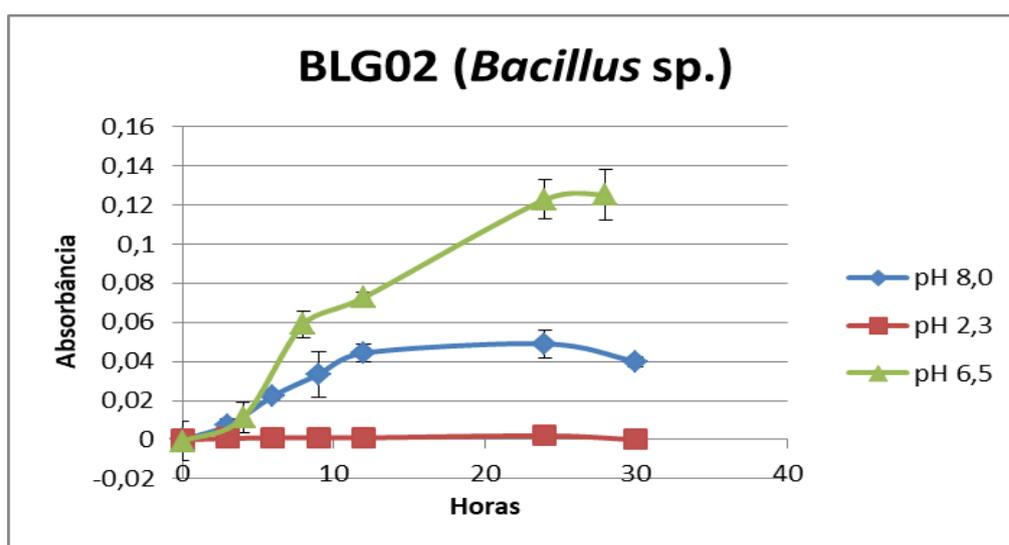


Figura 33. Curva de crescimento de células da bactéria BLG02 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

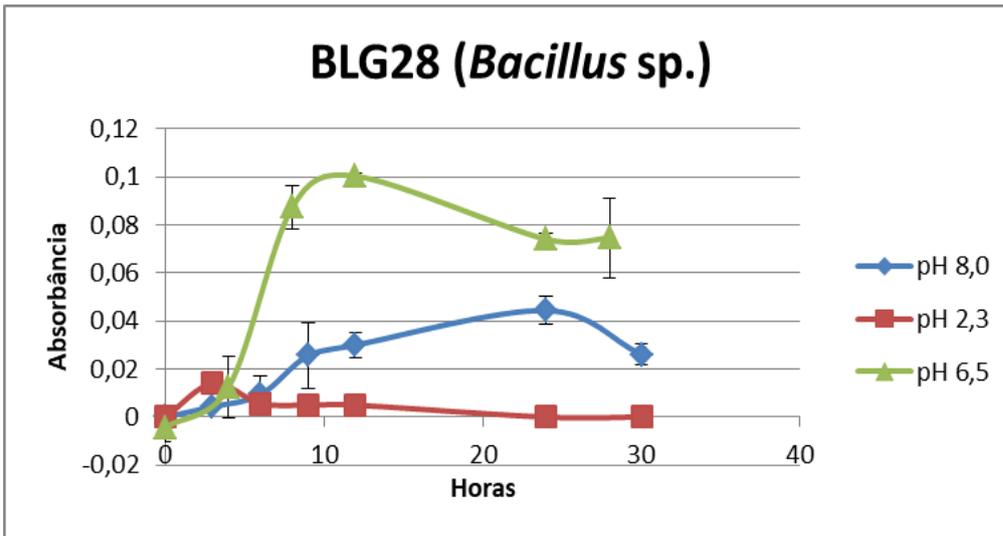


Figura 34. Curva de crescimento de células da bactéria BLG28 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

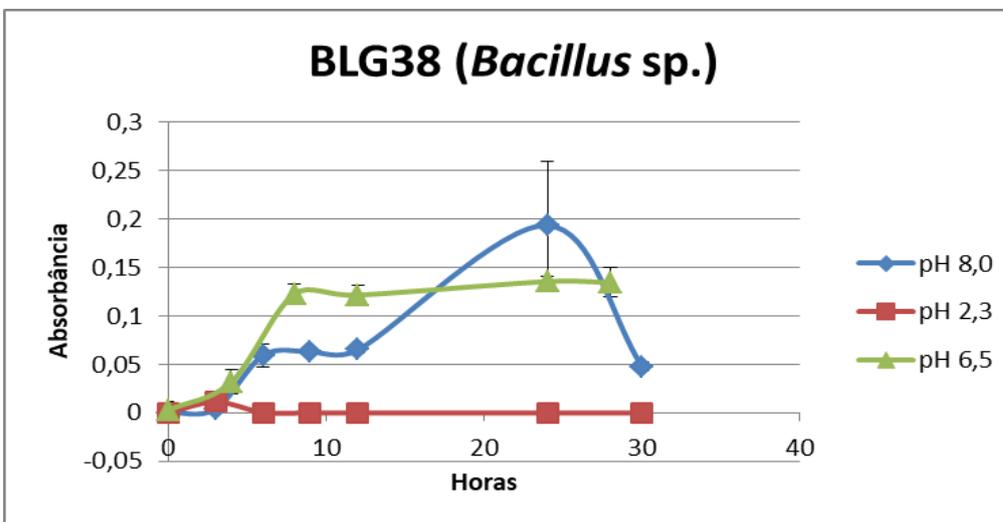


Figura 35. Curva de crescimento de células da bactéria BLG38 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

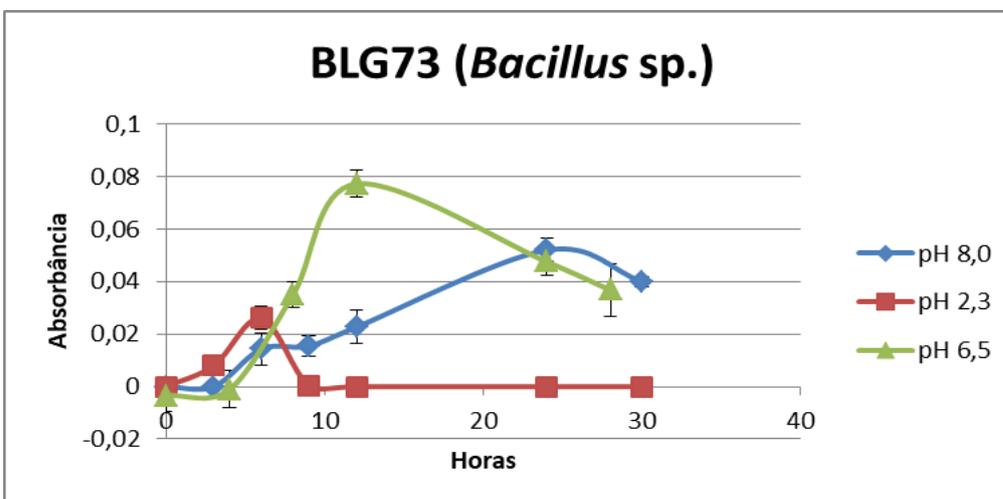


Figura 36. Curva de crescimento de células da bactéria BLG73 na temperatura de 37 °C e pH's 2,3, 6,5 e 8,0.

*Bacillus* são bactérias com formato de bastonetes, retas ou arredondadas de tamanho variáveis, esporulados, Gram positivos ou variáveis, móveis ou imóveis, aeróbios ou anaeróbios, geralmente catalase positivos (GOMES, 2013; MINELLI-OLIVEIRA, 2013).

Em geral são patogênicas para os seres humanos e demais mamíferos, como é o caso do *Bacillus anthracis*, causador do antraz. O *Bacillus cereus* causa gastroenterites e outras infecções (GOMES, 2013). Do ponto de vista biotecnológico, o gênero *Bacillus* é um dos mais importantes e investigados grupos de bactérias produtoras de amilase e outras enzimas comerciais (MINELLI-OLIVEIRA, 2013; PANDEY *et al.*, 2000).

Os resultados a seguir tiveram como objetivo, verificar se aumentando a concentração de células, a sobrevivência e crescimento das bactérias poderiam ser melhores, conforme relatado na literatura (OKSANEN *et al.*, 1990; VINDEROLA; REINHEIMER, 2000). Para isso, foi realizado um experimento usando as 12 bactérias na concentração inicial de  $10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$ , 100 vezes maior do que os testes anteriores.

O aumento da concentração inicial das bactérias para  $10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$  (Tabela 15) resultou em maior habilidade das bactérias em suportarem melhor a acidez do meio de cultura, com cinco delas apresentando crescimentos substanciais ao longo do tempo, como as BLG06, BLG33, BLG38, BLG56 e BLG73. Além delas, as BLG02, BLG16 e BLG52 mostraram algum crescimento no meio.

A habilidade de se manterem viáveis e/ou até crescerem em um ambiente de pH 2,3, semelhante ao do estômago humano, nas primeiras 4 horas iniciais pode ser extremamente importante para que possam passar para os intestinos em concentrações adequadas para colonizarem essa parte do aparelho digestório. Segundo Oksanen *et al.* (1990) e Vinderola e Reinheimer (2000), para que microrganismos possam atuar como probióticos de uma forma eficiente contra diarreias, eles devem estar numa concentração mínima de  $10^7$  bactérias por grama do produto a ser ingerido. Usando o mesmo raciocínio, para que uma bactéria patogênica possa causar algum problema intestinal, ela deve estar nessa mesma concentração mínima em alimentos. Abaixo disso, a ação dos ácidos estomacais e depois, a elevada

alcalinidade dos intestinos podem diminuir drasticamente esses números e os sintomas patogênicos podem ser evitados. Evidentemente, não estamos levando em consideração nesses casos, as toxinas produzidas pelos microrganismos e suas concentrações e letalidades (OLUWAFEMI; IBEH, 2011).

Tabela 15. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com lactose na temperatura de 37 °C e pH 2,3 com concentração inicial de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>.

Bactéria INPA	Horas					Médias
	0	2	4	6	8	
	----- 10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----					
BLG01	100 A	62 A	31 A	3 A	2 A	40 g
BLG02	100 B	52 B	289 A	69 B	66 B	115 fg
BLG06	100 D	459 C	910 B	1226 A	211 D	581 bc
BLG16	100 C	338 B	532 A	432 AB	77 C	296 e
BLG25	100 A	114 A	79 A	73 A	36 A	80 fg
BLG28	100 B	256 A	76 B	48 B	51 B	106 fg
BLG33	100 D	672 C	1339 A	905 B	89 D	621 ab
BLG38	100 D	282 C	1755 A	482 B	22 D	528 c
BLG45	100 AB	164 A	156 A	18 B	15 B	91 fg
BLG52	100 B	349 A	122 B	21 B	11 B	121 f
BLG56	100 C	422 B	2632 A	152 C	54 C	672 a
BLG73	100 C	429 B	1276 A	204 C	74 C	417 d
Médias	100 C	300 B	766 A	303 B	59 D	

Obs. Médias com as mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. A identificação das bactérias se encontra nas tabelas 13 e 14.

Visando avaliar a capacidade das bactérias em crescerem em altas temperaturas, uma característica desejável nas bioindústrias produtoras de enzimas por diminuir as possibilidades de contaminações. Processos biotecnológicos em elevadas temperaturas têm menor risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que podem ser a maioria em um ambiente industrial (PALMA-FERNANDEZ; GOMES, 2000), bem como verificar se uma temperatura próxima à da pasteurização pode afetar as com potenciais patogênicos, as 12 bactérias foram testadas em 55°C no meio contendo lactose como fonte e carbono. A Tabela 16 mostra as concentrações de células dessas bactérias ao longo do tempo.

Quatro delas tiveram sérias dificuldades para crescerem nessas condições (BLG01, BLG02, BLG25 e BLG28). As demais conseguiram se multiplicar ao longo do tempo sob essa temperatura, destacando-se as bactérias BLG06, BLG33, BLG38 e BLG45 após 3 horas de crescimento, somando-se a elas, a bactéria BLG16 que apresentou a maior concentração

de células após 6 horas de incubação. As restantes apresentaram crescimentos intermediários.

Tabela 16. Crescimento de células das bactérias BLG em meio contendo lactose na temperatura de 55 °C e pH 6,5. Médias de quatro repetições.

Bactéria INPA	Horas				Médias
	0	3	6	9	
	-----10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----				
BLG01 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	1 B	18,8 A	0,1 B	0,1 B	5,0 e
BLG02 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 B	15,6 A	3,0 B	0,1 B	4,9 e
BLG06 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	1 C	989,0 A	169,4 B	0,1 C	289,8 b
BLG16 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	1 C	335,0 B	663,8 A	0,1 C	249,9 b
BLG25 ( <i>Stenotrophomonas</i> sp.)	1 A	1,4 A	0,1 A	0,1 A	0,6 e
BLG28 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 A	1,1 A	0,1 A	0,1 A	0,6 e
BLG33 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	1 D	897,5 A	33,1 C	75,0 B	251,6 b
BLG38 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 C	766,2 A	37,5 B	1,5 C	201,6 c
BLG45 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	1 D	1242,5 A	300,6 B	26,2 C	392,6 a
BLG52 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> )	1 C	281,9 A	295,0 A	45,6 B	155,9 b
BLG56 ( <i>Achromobacter</i> sp.)	1 C	164,4 A	69,4 B	0,1 C	58,7 d
BLG73 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1 C	455,6 A	20,6 B	0,1 C	119,3 d
Médias	1 D	430,7 A	132,7 B	12,4 C	

Obs. Médias com as mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

É de se esperar que as bactérias que conseguiram crescer sob 55°C possuam altos potenciais para serem usadas em bioindústrias produtoras de enzimas e esse potencial fica mais elevado para aquelas que não se apresentarem patogênicas em futuros testes biológicos. Por não serem patogênicas, elas diminuem os riscos de causarem problemas na linha de produção enzimática, bem como podem ser usadas também, como probióticos (VARAVALLO *et al.*, 2008; STURMER *et al.*, 2012) diminuindo os custos de produção e aumentando suas potencialidades de uso industrial.

Por outro lado, as com potenciais patogenicidades que cresceram bem sob essa temperatura sugerem o uso de temperaturas mais elevadas no processo industrial para que não cresçam como contaminantes.

As tabelas 17 e 18 mostram o crescimento desses isolados na temperatura de 55 °C e pH's 2,3 e 8,0. Todas as análises foram feitas com 4 repetições.

Esse teste teve como objetivo, avaliar se abaixarmos ou elevarmos o pH do meio de cultivo no processo industrial poderia ser suficiente para controlar as possíveis bactérias patogênicas sem elevar mais a temperatura

do sistema, bem como se comportam as com potenciais de uso como probióticos, caso confirmem não serem patogênicas ao ser humano.

Tabela 17. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com lactose na temperatura de 55°C e pH 2,3

Bactéria INPA	Horas							Médias
	0	3	6	9	12	24	30	
	----- 10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----							
BLG01	1	5,4	4,0	3,1	3,8	4,0	5,0	3,8 b
BLG02	1	10,4	7,9	8,5	2,7	4,4	4,0	5,6 a
BLG06	1	4,4	3,3	3,1	3,1	3,3	4,6	3,2 b
BLG16	1	19,4	5,4	2,9	3,1	4,0	4,0	5,7 a
BLG25	1	3,6	3,3	3,1	2,9	4,6	3,3	3,1 b
BLG28	1	3,8	4,0	2,9	2,5	5,0	5,0	3,4 b
BLG33	1	4,0	3,6	2,9	3,3	3,8	5,2	3,4 b
BLG38	1	3,6	3,3	3,1	3,1	2,7	3,6	2,9 b
BLG45	1	3,6	2,9	2,9	2,9	4,2	5,2	3,2 b
BLG52	1	3,1	3,1	3,1	3,1	2,7	4,8	3,0 b
BLG56	1	4,4	3,3	2,9	2,7	3,1	4,4	3,1 b
BLG73	1	6,7	2,9	2,9	2,9	4,0	3,8	3,4 b
Médias	1 D	6,0 A	3,9 BC	3,4 BC	3,0 C	3,8 BC	4,4 B	

Obs. Médias com as mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. A identificação das bactérias se encontra nas tabelas 13 e 15.

As bactérias se mostraram sensíveis à temperatura de 55 °C e pH 2,3, confirmando os resultados encontrados na temperatura de 37°C sob esse pH acima mencionado. A elevação da temperatura para 55°C potencializou o efeito negativo da acidez, podendo-se observar na tabela 16, que as maiores concentrações de células ocorreram no início do experimento, após 3 horas de incubação, quando a ação negativa da temperatura foi menor. A concentração de células diminuiu até 12 horas, se elevando levemente até as 30 horas, talvez devido uma adaptação celular a essa temperatura e acidez. Ao se analisar as médias das 12 bactérias, observou-se que as BLG02 e BLG16, classificadas respectivamente como *Bacillus* sp. e *Stenotrophomonas maltophilia* se mostraram menos sensíveis que as demais a essas condições ambientais, três horas após o início da incubação.

Ao se analisar as concentrações de células das 12 bactérias na temperatura de 55 °C e pH 8,0 (Tabela 18), elas ainda se mostraram sensíveis, mas com um crescimento melhor do que no pH 2,3, com o maior crescimento ocorrendo pela BLG73 (617 x 10<sup>5</sup>células.mL<sup>-1</sup>) em 12 horas de avaliação, seguida da BLG45 e BLG56 (506 x 10<sup>5</sup>células.mL<sup>-1</sup> e 476 x 10<sup>5</sup>células.mL<sup>-1</sup>) com 24 horas de avaliação, respectivamente. Nessas

condições, apenas a bactéria BLG01 não apresentou um crescimento significativo durante o período experimental de 30 horas.

Tabela 18. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com lactose na temperatura de 55 °C e pH 8,0

Bactéria INPA	Horas							Médias
	0	3	6	9	12	24	30	
	----- 10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----							
BLG01	1 A	4,8 A	3,5 A	3,1 A	2,9 A	2,5 A	2,5 A	2,9 g
BLG02	1 B	5,6 B	5,0 B	3,3 B	68,8 A	2,7 B	2,5 B	12,7 fg
BLG06	1 C	56,3 A	65,0 A	43,8 AB	47,5 A	2,9 BC	2,5 BC	31,3 e
BLG16	1 C	7,1 BC	40,0 BC	44,4 B	138,8 A	3,1 BC	2,5 C	33,8 e
BLG25	1 C	59,4 A	51,2 A	45,6 AB	68,1 A	5,0 BC	2,5 C	33,3 e
BLG28	1 B	4,0 B	25,0 B	20,0 B	100,0 A	22,5 B	2,5 B	25,0 ef
BLG33	1 D	44,4 BC	58,1 B	29,4 BCD	252,5 A	39,4 BCD	2,9 CD	61,1 d
BLG38	1 E	241,9 B	318,1 A	186,9 C	299,4 A	119,4 D	2,9 E	167,1 c
BLG45	1 E	3,3 E	284,4 D	351,9 BC	387,5 B	506,2 A	319,4 CD	264,8 a
BLG52	1 C	25,0 BC	71,9 A	61,2 AB	83,8 A	4,6 C	2,5 C	35,7 e
BLG56	1 F	93,8 E	90,6 E	250,0 D	427,5 B	476,2 A	307,5 C	235,2 b
BLG73	1 F	38,1 F	91,9 E	355,6 C	617,5 A	461,2 B	270,0 D	262,1 a
Médias	1 G	48,6 F	92,1 D	116,3 C	207,8 A	137,1 B	76,7 E	

Obs. Médias com as mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. A identificação das bactérias se encontra nas tabelas 13 e 15.

Esses resultados indicam que o uso desse pH pode ser usado como seletivo em um processo industrial para aquelas bactérias não patogênicas e que se mostraram com capacidade para crescer nessa temperatura e pH.

### 3.2. Crescimento bacteriano em meio líquido contendo glúten.

Essa parte do trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade das doze bactérias em degradarem o glúten, visando proporcionar alternativas microbiológicas para minimizar ou solucionar o problema das pessoas que possuem intolerância a esse componente proteico (doença celíaca).

Mesmo com uma concentração inicial de 10<sup>6</sup> em meio contendo glúten, as bactérias foram sensíveis ao pH do estômago (Tabela 19), com o maior crescimento ocorrendo pela BLG33 (481,2 x 10<sup>5</sup>células.mL<sup>-1</sup>) em 6 horas de avaliação. Essa *Pseudomonas aeruginosa* foi a única que manteve uma concentração de células acima daquela do início do experimento até o seu final, 24 horas após, apesar de ter uma redução de cerca de cinco vezes na avaliação realizada 3 horas após a inoculação. Devido a essas maiores concentrações de células ao longo do experimento, essa bactéria apresentou a maior média geral, seguida pela BLG16 (*Stenotrophomonas maltophilia*),

BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*) e BLG56 (*Achromobacter* sp.). Mas essas três últimas bactérias só mostraram uma certa tolerância ao pH 2,3 nas primeiras 3 horas de exposição ao meio ácido, tendo depois, uma queda acentuada de concentração no meio contendo glúten e pH 2,3, mostrando-se bastantes sensíveis a esse pH ao longo do tempo (Tabela 19). As demais bactérias também se mostraram bastantes sensíveis à acidez do meio ao longo do tempo, confirmando os resultados obtidos anteriormente quando se usou lactose como fonte de carbono com uma concentração de células 10 vezes menor.

As duas primeiras espécies são patogênicas em potencial (BROOKE, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2011), responsáveis por causarem infecções no sistema respiratório, principalmente em pacientes em hospitais. No entanto, elas apresentam também, enzimas com usos biotecnológicos (MUKHERJEE; ROY, 2016; NAJAFI *et al.*, 2005; NOVIK *et al.*, 2015).

Tabela 19. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com glúten na temperatura de 37 °C e pH 2,3 com concentração inicial de 10<sup>6</sup>.

Bactéria INPA	Horas						Médias
	0	3	6	9	12	24	
	----- 10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----						
BLG01 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	10,0 A	1,3 B	2,9 B	4,3 AB	1,1 B	0,4 B	3,3 d
BLG02 ( <i>Bacillus</i> sp.)	10,0 A	8,4 AB	2,4 BC	1,7 BC	0,4 C	0,7 C	3,9 d
BLG06 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	10,0 A	3,6 AB	1,9 B	1,4 B	0,5 B	0,7 B	3,0 d
BLG16 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	10,0 B	66,9 A	0,6 C	1,3 C	0,4 C	0,6 C	13,3 b
BLG25 ( <i>Stenotrophomonas</i> sp.)	10,0 A	1,1 B	1,1 B	1,2 B	0,4 B	0,7 B	2,4 d
BLG28 ( <i>Bacillus</i> sp.)	10,0 A	1,3 B	0,2 B	0,4 B	0,4 B	0,4 B	2,1 d
BLG33 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	10,0 D	1,8 E	481,2 A	125,0 B	66,2 C	12,2 D	116,1 a
BLG38 ( <i>Bacillus</i> sp.)	10,0 A	0,6 B	0,4 B	0,4 B	0,5 B	0,3 B	2,0 d
BLG45 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	10,0 A	0,4 B	0,4 B	0,4 B	0,4 B	0,5 B	2,0 d
BLG52 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> )	10,0 B	54,4 A	0,3 C	0,3 C	0,5 C	0,5 C	11,0 bc
BLG56 ( <i>Achromobacter</i> sp.)	10,0 B	48,8 A	0,3 C	0,3 C	0,3 C	0,4 C	10,0 c
BLG73 ( <i>Bacillus</i> sp.)	10,0 A	1,0 B	0,3 B	0,4 B	0,4 B	0,6 B	2,1 d
Médias	10,0 C	15,8 B	41,0 A	11,4 C	6,0 D	1,5 E	

Obs. Médias com as mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Bactérias do gênero *Brevibacillus*, por outro lado, apresentam enzimas com potencial biotecnológico, como de degradar polietilenos de baixa

densidade (PRAMILA *et al.*, 2012), bem como atuarem como agentes de biocontrole, havendo diversas patentes relacionadas com produtos gerados por essas bactérias (PANDA *et al.*, 2014).

Já com a concentração inicial de  $10^7$  (Tabela 20), as bactérias conseguiram uma adaptação melhor ao pH ácido. A maior concentração de células também foi da BLG33 ( $788 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>), quase o dobro do resultado observado com a concentração inicial de  $10^6$ .

Mesmo assim, algumas bactérias não apresentaram um bom crescimento no meio com pH 2,3 na concentração inicial de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, como as BLG06 (*Pseudomonas* spp.), BLG56 (*Achromobacter* sp) e BLG73 (*Bacillus* sp.), pois suas concentrações pouco aumentaram ao longo do tempo em comparação à população inicial. As demais mostraram concentrações de células semelhantes à inicial durante algum tempo de incubação, reduzindo significativamente após 24 horas no meio de cultura.

Tabela 20. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com glúten na temperatura de 37 °C e pH 2,3 com concentração inicial de  $10^7$ .

Bactéria INPA	Horas						Médias
	0	3	6	9	12	24	
	----- 10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----						
BLG01 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	100 C	238 B	265 A	228 B	108 C	51 D	165 c
BLG02 ( <i>Bacillus</i> sp.)	100 C	176 A	135 B	124 B	23 D	15 D	96 f
BLG06 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	100 B	122 A	5 C	1 C	1 C	1 C	38 h
BLG16 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	100 C	162 B	252 A	116 C	45 D	41 D	119 d
BLG25 ( <i>Stenotrophomonas</i> sp.)	100 D	123 BC	148 A	140 AB	111 D	58 E	113 de
BLG28 ( <i>Bacillus</i> sp.)	100 D	327 B	354 A	233 C	68 E	97 D	196 b
BLG33 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	100 D	208 B	788 A	186 C	168 C	64 E	252 a
BLG38 ( <i>Bacillus</i> sp.)	100 C	73 D	508 A	429 B	62 D	25 E	200 b
BLG45 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	100 C	73 D	325 B	370 A	72 D	9 E	158 c
BLG52 ( <i>Brevibacillus parabrevis</i> )	100 C	71 D	231 A	134 B	54 D	30 E	103 ef
BLG56 ( <i>Achromobacter</i> sp.)	100 A	8 C	39 B	82 A	52 B	3 C	47 gh
BLG73 ( <i>Bacillus</i> sp.)	100 B	1 C	17 C	174 A	16 C	1 C	52 g
Médias	100 D	132 C	255 A	185 B	65 E	33 F	

Obs. Médias com as mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Se formos considerar que as três primeiras horas são fundamentais e suficientes para essas bactérias permanecerem no estômago e em seguida

penetrarem nos intestinos, então pode-se afirmar que apenas as duas últimas da tabela 20, BLG56 (*Achromobacter* sp) e BLG73 (*Bacillus* sp.) seriam significativamente afetadas pela ação destrutiva da acidez do estômago se forem ingeridas com essa concentração inicial. As demais estariam com concentrações iguais ou maiores do que a inicial.

Ao se analisar as doze bactérias em pH 8,0, semelhante ao encontrado nos intestinos humanos, na temperatura corporal de 37 °C, observou-se que a bactéria melhor adaptada ao meio com glúten foi a BLG33 (8037 x 10<sup>5</sup>células/mL), seguida da BLG02 (3005 x 10<sup>5</sup>células/mL) com 24 horas de avaliação (Tabela 21).

Com relação à bactéria BLG01, o maior crescimento de células foi com 6 horas de avaliação (904 x 10<sup>5</sup>células/mL), diminuindo nos outros tempos e voltando a aumentar até chegar a 1007 x 10<sup>5</sup>células/mL com 30 horas de crescimento, sendo que esse aumento é devido ao aparecimento de esporos observados no microscópio. Esse comportamento pode ser observado nas outras bactérias em que se observa um pico de crescimento no final da avaliação após uma anterior diminuição.

Tabela 21. Crescimento de células das bactérias BLG em meio com glúten na temperatura de 37 °C e pH 8,0

Bactéria INPA	Horas							Médias
	0	3	6	9	12	24	30	
	----- 10 <sup>5</sup> células.mL <sup>-1</sup> -----							
BLG01	1 D	100 D	904 A	461 B	288 C	524 B	1007 A	469 de
BLG02	1 D	8 D	89 D	97 D	899 C	3005 A	1547 B	806 b
BLG06	1 D	4 D	338 B	635 A	134 C	102 CD	27 CD	177 h
BLG16	1 E	9 E	218 D	345 C	256 CD	1456 A	959 B	463 de
BLG25	1 D	10 D	216 BC	247 BC	697 A	192 C	327 B	241 g
BLG28	1 E	69 E	627 C	1165 B	482 D	1445 A	1365 A	736 c
BLG33	1 F	1 F	781 E	929 D	2390 C	8037 A	3112 B	2178 a
BLG38	1 D	113 D	657 B	489 C	892 A	490 C	504 C	449 ef
BLG45	1 D	23 D	316 C	254 C	236 C	621 B	1390 A	405 f
BLG52	1 D	1 D	3 D	366 C	314 C	1755 A	1157 B	513 d
BLG56	1 C	90 C	427 A	227 B	329 AB	42 C	344 AB	208 gh
BLG73	1 E	182 D	332 C	995 A	679 B	102 DE	984 A	467 de
Médias	1 G	50 F	409 E	517 D	633 C	1481 A	1060 B	

#### 4. Conclusões

As doze bactérias mostraram potencial para serem usadas como probióticas (após confirmação de não patogenicidade) ou como supridoras de enzimas capazes de degradarem a lactose e o glúten.

Todas as bactérias mostraram sensibilidade à acidez equivalente à do estômago e à alcalinidade equivalente à dos intestinos humanos.

Essa bipolaridade acidez/alcalinidade pode ser um mecanismo de defesa do organismo humano contra a ação de bactérias patogênicas ou indesejáveis.

Para que bactérias desejáveis sejam utilizadas como probióticas, elas precisam ser ingeridas em altas concentrações.

A maioria das bactérias mostrou menos sensibilidade à acidez do estômago (pH 2,3) no meio contendo glúten do que em lactose.

Nas condições de alcalinidade (pH 8,0) não houve tanta diferença no crescimento das bactérias entre os dois meios de cultura.

Das doze bactérias testadas, as com maiores potenciais de utilização como probióticas, desde que comprovadamente não sejam patogênicas, são as BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.) por fazerem parte de gêneros com pouca possibilidade de patogenicidade e por apresentarem crescimento positivo nas duas primeiras horas em pH 2,3, semelhante ao do estômago.

O uso de pH 2,3 ou 8,0 a uma temperatura de 55 °C pode servir para diminuir as possibilidades de contaminações de bactérias indesejáveis no processo de produção industrial de probióticos.

**CAPÍTULO 3:**  
**Capacidade de degradação do glúten pelos extratos brutos**  
**das bactérias cultivadas em lactose ou em glúten**

## Resumo

A produção de enzimas varia de microrganismo para microrganismo, sendo influenciada pelos constituintes dos meios de cultura e tempo de coleta dos extratos, relacionadas com a fase de crescimento microbiano. Para avaliar se a fonte de carbono e a fase de crescimento das bactérias afeta a produção e qualidade de proteases capazes de degradar o glúten, foram realizados experimentos com os extratos brutos de nove bactérias, BLG02 (*Bacillus* sp.), BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.). Os extratos foram obtidos do cultivo dessas bactérias em dois meios de cultura (glúten e lactose como fontes de carbono) e coletados com 6, 12 e 24 horas de incubação. Diluições dos extratos também foram testadas quanto às suas capacidades de degradar o glúten. Todas as bactérias produziram extratos com capacidade de degradação do glúten. A fonte de carbono (lactose ou glúten) afetou a capacidade dessas bactérias em produzirem extratos capazes de degradarem o glúten. O tempo de coleta dos extratos bacterianos também influenciou nas suas capacidades de degradar o glúten. Os extratos de 12 horas da maioria dessas bactérias foram os que mostraram menores capacidades de degradação de composto proteico. Os extratos de 24 horas da maioria dessas bactérias foram os que mostraram maiores capacidades de degradação. O maior percentual de degradação de glúten foi de 87,3 % usando o extrato obtido com 24 horas de crescimento da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) cultivada em meio de cultura contendo glúten. Com base na capacidade de degradação, nos tempos de coletas dos extratos bacterianos e meios de cultura, pode-se concluir que as nove bactérias apresentam diferentes proteases capazes de degradarem o glúten. Essa capacidade de degradarem o glúten variou com suas concentrações na solução de formas diferentes e essa característica pode servir como um teste a mais para diferenciar uns dos outros. São necessários estudos mais detalhados, como o de purificação dos componentes dos extratos dessas bactérias, para avaliar cada uma dessas proteases individualmente, para escolher as de melhores potenciais biotecnológicos.

**Palavras chave:** Metabolismo microbiano, proteases, Doença Celíaca.

## **Abstract**

The production of enzymes varies from microorganism to microorganism, being influenced by the constituents of culture medium and time of collection of the extracts, related to the microbial growth phase. To evaluate if the carbon source and the growth phase of the bacteria affect the production and quality of proteases capable of degrading gluten, experiments were carried out on the crude extracts of nine bacteria, BLG02 (*Bacillus* sp.), BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) and BLG73 (*Bacillus* sp.). The extracts were obtained from culture of these bacteria in two culture media (gluten and lactose as carbon sources) and collected with 6, 12 and 24 hours of incubation. Dilutions of the extracts have also been tested for their ability to degrade gluten. All bacteria produced extracts with the ability to break down gluten. The source of carbon (lactose or gluten) has affected the ability of these bacteria to produce extracts capable of degrading gluten. The time of collection of bacterial extracts also influenced their ability to degrade gluten. The 12 hour extracts from most of these bacteria showed the lowest degradability of the protein compound. The 24 hour extracts from most of these bacteria showed the highest degradability. The highest percentage of gluten degradation was 87.3% using the extract obtained with 24 hours of growth of bacterium BLG56 (*Achromobacter* sp.) grown in culture medium containing gluten. Based on the degradability, collection times of bacterial extracts and culture media, it can be concluded that the nine bacteria present different proteases capable of degrading gluten. This ability to degrade gluten varied with its concentrations in the solution in different ways and this feature may serve as an additional test to differentiate one from the other. More detailed studies, such as the purification of the extracts components of these bacteria, are needed to evaluate each of these proteases individually to choose the best with biotechnological potential.

**Key words:** Microbial metabolism, proteases, Celiac disease.

## 1. Introdução

As enzimas consistem de um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente proteica (há também enzimas constituídas de RNA, as ribozimas), com atividades intra ou extracelulares, que catalisam reações com muito mais facilidade, através da redução da energia de ativação necessária para que a reação química ocorra, resultando em aumento da sua velocidade, facilitando o metabolismo dos seres vivos. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou na alimentar (JAYANI *et al.*, 2005).

Em muitos processos, elas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para os processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio de sua biodegradabilidade e do menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas (PALMA-FERNANDEZ; GOMES, 2002), catalisando reações bioquímicas com grande especificidade, sendo capazes de aumentar em até  $10^{14}$  vezes a velocidade de algumas reações sem necessitar de condições extremas de pH, pressão e temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um conjunto de enzimas, o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI *et al.*, 2005). Além disso, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001).

Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não dependem das intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo são finamente controladas por monitores eletrônicos. Some-se a este fato, a enorme biodiversidade de microrganismos disponíveis nos mais variados habitats da natureza são capazes de produzirem enzimas para finalidades bastante amplas. Microrganismos que vivem em condições extremas, por exemplo, de pH ou temperatura, sintetizam enzimas que propiciam sua sobrevivência

nestas condições (SAID; PIETRO, 2004) e por isso, podem ser usadas em condições próximas às encontradas na natureza.

Pelo exposto acima, as enzimas microbianas ocupam lugar de destaque no mercado biotecnológico, sendo inúmeras as aplicadas em processos industriais e comercializadas em grandes quantidades, como as proteases bacterianas na indústria de detergentes e couro, as amilases fúngicas e bacterianas na indústria do amido e panificação, as celulases e pectinases na indústria têxtil e de sucos naturais entre outras (SAID; PIETRO, 2004).

O uso de enzimas permite condições mais moderadas de temperaturas e pHs e não causa problemas nos produtos obtidos, como a desnaturação das proteínas, e no rendimento de subprodutos indesejáveis, normais nos métodos ácidos. Por isso, as enzimas são muito usadas na indústria de alimentos (SANTOS *et al.*, 1998; CARMINATTI, 2001).

Enzimas como as proteases capazes de degradar o glúten, também têm despertado interesse, tendo em vista o aumento de pessoas que apresentam intolerância a esse componente alimentício. Assim, torna-se importante encontrar mais fontes dessas enzimas em microrganismos e avaliar suas características em condições de meios de cultivo diferentes. Esse foi o propósito da presente pesquisa. Como a idade das culturas bacterianas e as fontes de carbono podem influenciar na produção e eficiências das enzimas, esse trabalho foi idealizado para se obter e testar extratos enzimáticos de nove bactérias degradadoras do glúten, crescidas em meios contendo lactose ou glúten e, coletadas com 6, 12 e 24 horas de crescimento.

## 2. Material e Métodos

Foram selecionadas nove bactérias dos testes anteriores: BLG02 (*Bacillus* sp.), BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.). Assim, os ensaios laboratoriais foram realizados antes da identificação taxonômica dessas nove bactérias, apesar de algumas, depois de identificadas, apresentarem também esse mesmo potencial.

Com o objetivo de obter extratos brutos das enzimas produzidas por essas bactérias capazes de degradar o glúten, os microrganismos foram inoculados em meio líquido com lactose ou glúten como fonte de carbono, como utilizado anteriormente.

Uma alíquota de 5 mL de cada caldo bacteriano, crescida em meios contendo lactose ou glúten, foi retirada, centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e filtrada em membrana de *Millipore* com 6, 12 e 24 horas de crescimento, com a finalidade de verificar a produção de moléculas degradadoras de glúten durante as diferentes fases de crescimento das bactérias (exponencial, estacionária e de declínio). As amostras foram padronizadas para uma mesma concentração de células bacterianas, calculadas para uma população bacteriana de  $10^7$  células. mL<sup>-1</sup> através da contagem em câmara de Neubauer e congeladas para uso em ensaios de detecção de metabólitos capazes de degradar o glúten.

Os testes foram feitos em água destilada contendo glúten como fonte de carbono, pois este possibilita a obtenção de absorbância no espectrofotômetro, já a lactose fica incolor após autoclavada, não possibilitando a sua leitura. Todos os gráficos possuem desvio padrão das quatro repetições.

A partir dos extratos brutos das amostras de bactérias crescidas em lactose ou em glúten, foi realizada diluição seriada utilizando água destilada estéril, até a obtenção das amostras SD (sem diluição) e diluições 5x, 10x, 20x, 50x, 100x, 200x, 400x, 800X e 1600X das amostras obtidas com 6 h, 12

h e 24 h de incubação, para verificar até em que diluições foram capazes de degradar o glúten.

Após a realização das diluições, 50 µL de cada extrato foram depositados em placas de Elisa juntamente com 50 µL de solução de glúten (4 repetições cada) e feita a leitura de absorvância no comprimento de onda de 595 nm. As avaliações foram realizadas a cada 15 minutos até completar 180 minutos. Os resultados apresentados nesse capítulo são os de degradação máxima obtida durante os 180 minutos de contato dos extratos brutos com a solução aquosa contendo o glúten.

#### *Cálculo da quantidade de glúten degradado nos testes com os extratos*

Foram feitas soluções com diferentes concentrações de glúten já pré-estabelecidas para a obtenção de um gráfico (Figura 36) do qual foi obtida a equação da reta pelo programa Excel. Para fazer esse gráfico, foram pesados 10 gramas de glúten, adicionando-os em 1,0 L de água e autoclavando a solução por 30 minutos a 121 °C. Em seguida, a solução foi filtrada usando gaze de algodão em um funil, após a pesagem do gaze.

O glúten não dissolvido e retido no gaze foi então secado em estufa a 70 °C por dois dias, calculando a quantidade que ficou dissolvida na solução pela subtração dos 10 gramas iniciais, do glúten retido no gaze. Essa solução aquosa foi então diluída em diferentes concentrações conhecidas, sendo então, lidas no espectrofotômetro para as absorvâncias no comprimento de ondas de 595 nm, resultando no gráfico da figura 37. A partir dessa equação, foi possível calcular a quantidade de glúten degradado pelos extratos nos testes anteriores.

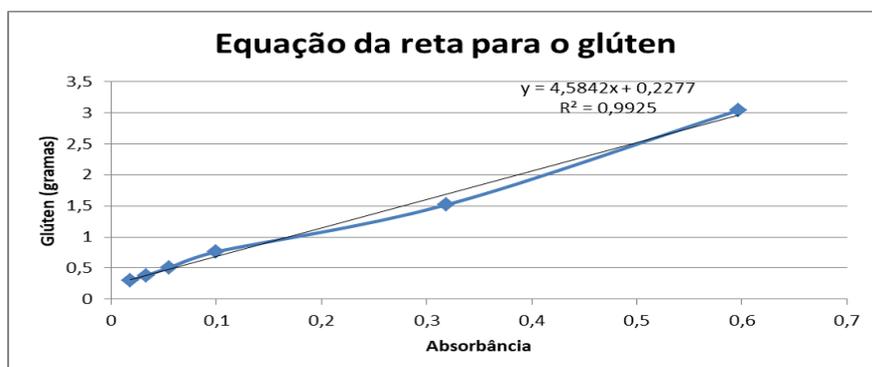


Figura 37. Equação da reta para calcular a quantidade de glúten degradado no teste com os extratos.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Habilidade dos extratos bacterianos em degradarem o glúten: comparações entre as bactérias crescidas em lactose com as crescidas em glúten sem diluição

Diversos trabalhos mostraram a influência de fatores como fontes de carbono e idade da cultura bacteriana em suas habilidades de produzirem enzimas (AHMED *et al.*, 2016; AKBAR *et al.*, 2012; DAS; PRASAD, 2010; SHAHEEN *et al.*, 2008). Usando-se diferentes fontes de carbono e coletando-se os extratos em tempos diferentes e avaliando suas capacidades de degradarem o glúten em diferentes diluições pode indicar seus potenciais biotecnológicos e, quando essas enzimas estão em maiores concentrações no caldo bacteriano.

Em vista disso, foi realizado um experimento com nove das doze bactérias, procurando coletar os extratos brutos quando elas estavam com 6, 12 e 24 horas de incubação em meio contendo lactose ou glúten, para avaliar a efetividade das proteases capazes de degradar o glúten. Para isso, seus extratos brutos foram diluídos até 1600 vezes.

A tabela 22 mostra as porcentagens de glúten degradadas pelos extratos brutos das bactérias crescidas por 6, 12 e 24 horas em meios de cultura contendo lactose ou glúten como fontes de carbono.

Pode-se verificar que as maiores capacidades de degradação do glúten foram pelos extratos brutos das BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*) e BLG56 (*Achromobacter* sp.) e, o com menor capacidade, o extrato da BLG38 (*Bacillus* sp.).

Ao se analisar as médias dos extratos, observou-se que os obtidos com 24 horas de crescimento proporcionaram maiores degradações, seguidos pelos extraídos com 6 horas de crescimento. Tantos nos extratos de 24 horas como nos de 6 horas, os melhores foram os produzidos pelas bactérias crescidas em glúten. No entanto, nos extratos com 12 horas de crescimento bacteriano, os obtidos nos meios contendo lactose proporcionaram enzimas com maiores capacidades de degradação.

Tabela 22. Comparação entre os extratos das bactérias crescidas em glúten ou lactose em 6, 12 e 24 horas.

Bactérias INPA	Extrato de 6 horas		Extrato de 12 horas		Extrato de 24 horas		Médias
	Glúten*	Lactose*	Glúten*	Lactose*	Glúten*	Lactose*	
----- % de glúten degradado -----							
<b>BLG 02</b>	58,9	76,8	48,9	48,9	40,7	42,1	52,7 BC
<b>BLG 25</b>	46,0	44,6	52,2	52,5	51,8	48,6	49,3 DE
<b>BLG 28</b>	46,8	50,1	55,6	37,8	57,2	48,3	49,3 DE
<b>BLG 33</b>	34,8	48,3	84,0	40,7	77,2	50,3	55,9 A
<b>BLG 38</b>	20,4	49,1	32,7	32,2	55,4	62,7	42,1 F
<b>BLG 45</b>	51,7	48,8	23,2	43,3	56,9	59,8	47,3 E
<b>BLG 52</b>	50,8	50,0	56,0	34,8	49,8	46,5	48,0 DE
<b>BLG 56</b>	53,6	54,2	26,1	49,3	87,3	57,2	54,6 AB
<b>BLG 73</b>	44,5	62,5	29,9	50,5	60,5	55,3	50,5 CD
<b>Médias</b>	45,3 bB	53,8 aA	45,4 aB	43,3 bC	59,6 aA	52,3 bB	

\* Bactérias crescidas nos meios contendo glúten ou lactose como fonte de carbono. Médias com letras maiúsculas iguais na última coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Maiúsculas na última linha comparam as seis médias, e as minúsculas comparam duas médias dentro de cada extrato, pelo teste de Tukey a 5%.

Além disso, ocorreram interações entre os extratos bacterianos, tempos de coleta e fontes de carbono. Os maiores índices de degradação do glúten, acima de 80%, foram obtidos pelos extratos de 12 horas extraídos da BLG 33 crescida em glúten e, do extraído da BLG56 com 24 horas no meio contendo glúten. Por outro lado, os com menores capacidades de degradação, abaixo de 25%, foram os extraídos da BLG38 com 6 horas em glúten e, os extraídos pela BLG45 com 12 horas, cultivada também em meio contendo glúten como fonte de carbono.

Era de se esperar que cultivando as bactérias em meio contendo glúten, a produção das proteases capazes de degradar esse componente alimentício seria maior, pois as bactérias estariam mais adaptadas a essa fonte de carbono, mas nem todas as bactérias se comportaram assim, conforme pode ser visto nos dados apresentados na Tabela 22. Os maiores índices de degradação foram obtidos no meio com glúten (BLG33, 84,0 %, extrato de 12 horas e BLG56, 87,3 %, extrato de 24 horas), mas outras, como a BLG02 produziram mais proteases no meio com lactose (extrato de 6 horas, com 76,8 %).

Resultados semelhantes são documentados na literatura científica que mostram essas variações de resposta bacteriana, uma vez que o metabolismo dos microrganismos pode variar conforme a constituição do meio de cultura e a fase de crescimento microbiano.

Silva *et al.* (2006) testaram o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em meios de cultura contendo pectina, amido, celulose, xilano ou glicose e observaram que ele cresceu em todos os meios, exceto o contendo celulose e, que a maior produção de pectinase foi obtida com o fungo cultivado no meio contendo pectina.

Grata *et al.* (2008) por outro lado, testaram 10 estirpes de *Bacillus* (espécies de *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. subtilis*) quanto à produção de amilases em meios contendo maltose e amidos de batata ou de milho, obtendo resultados variáveis, mas com as maiores produções dessa enzima sendo obtida no meio com maltose.

Outros resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Prabakaran *et al.* (2015). Eles testaram dois bacilos (*Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*) quanto à produção de proteases em meios com seis diferentes fontes de carbono e verificaram que as respostas das duas bactérias foram diferentes. *B. subtilis* produziu mais proteases no meio contendo amido, enquanto que *B. licheniformis* produziu mais nos meios contendo frutose, sucrose, manose, destrose e lactose, observando também, variações na produção dessa enzima de acordo com a fonte de carbono.

Essa estratégia de se usar meios de culturas e tempos de coletas diferentes também foi utilizada por outros autores na busca e avaliação de compostos biológicos de interesse biotecnológico (AHMED *et al.*, 2016; AKBAR *et al.*, 2012; DAS; PRASAD, 2010; SHAHEEN *et al.*, 2008).

### 3.2. Capacidade de degradação do glúten pelos extratos diluídos coletados com 6, 12 e 24 horas de crescimento das bactérias crescidas em meio contendo lactose

A seguir são mostrados com mais detalhes, os resultados de degradação do glúten pelos extratos bacterianos obtidos pelo crescimento das bactérias em meio de cultura contendo lactose como fonte de carbono.

Procedeu-se também, à diluição dos extratos como forma de avaliar suas capacidades de turn over (serem reutilizados ao longo do tempo para degradarem mais de uma molécula de glúten no meio), bem como de fortalecer as informações sobre as diferenças entre eles, isto é, se a capacidade deles degradarem o glúten varia com suas concentrações na solução, e se essa característica pode servir como um teste a mais para diferenciar uns dos outros.

A figura 38 mostra a capacidade do extrato obtido da bactéria BLG02 (*Bacillus* sp.) em degradar o glúten quando crescida em 6, 12 e 24 horas. Nela pode-se observar que, quando o extrato não foi diluído (SD), sua maior atividade foi quando coletado com 6 horas de crescimento, com cerca de 75 % de glúten degradado, seguido de 12 horas de crescimento com 49 % e o extrato com 24 horas degradando em torno de 41%.

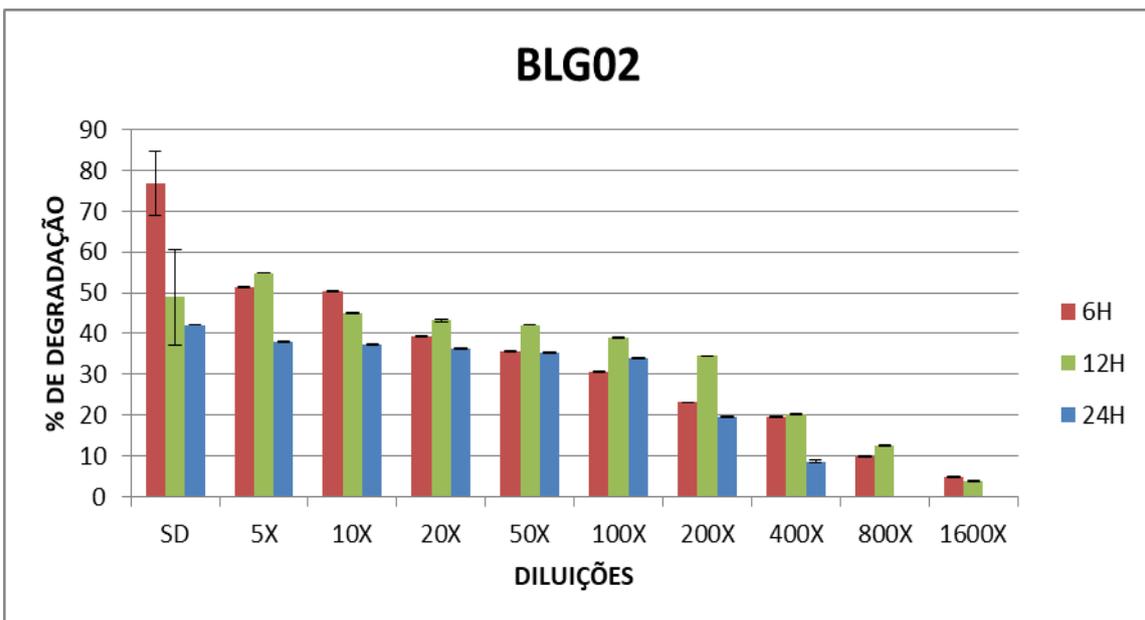


Figura 38. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG02 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Quando se comparou estatisticamente a atividade dos extratos nos três tempos de coleta, verificou-se que o coletado com 6 horas apresentou maior atividade que os demais somente no tratamento SD, diluído 10X e 1600X, enquanto que o extrato coletado com 12 horas apresentou maior atividade nas demais diluições. No entanto, para fins práticos, pouca variação ocorreu com o extrato coletado às 12 horas até a diluição de 100 vezes e, o de 24 horas até a diluição de 200 vezes, quando a porcentagem de degradação do glúten diminuiu muito pouco, não proporcionalmente.

O extrato coletado com 24 horas de crescimento não apresentou nenhuma atividade quando diluído 800X e 1600X.

Com base nos dados dessa figura, é de se supor que as maiores concentrações das enzimas degradadoras de glúten da bactéria BLG02 (*Bacillus* sp.) ocorrem nas seis primeiras horas de incubação.

Com relação aos extratos brutos da bactéria BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.) (Figura 39), quando o extrato não foi diluído (SD), sua maior atividade foi ao ser coletado com 12 horas de crescimento, com 52 % de glúten degradado, seguido pelo coletado após 24 horas de crescimento com 47 %. O extrato extraído com 6 horas de incubação degradou 44 % do glúten, havendo diferenças estatísticas entre eles. Já quando diluídos em 5X, as atividades dos extratos não diminuíram tanto, variando de 44 a 47 % de degradação pelos três extratos.

O extrato coletado com 24 horas foi o que menos redução de degradação apresentou até a diluição de 20 vezes, enquanto que o coletado com 12 horas de incubação manteve uma degradação do glúten estável ao ser diluído de 10 a 50 vezes. Para fins práticos, os três extratos pouco variaram em suas capacidades de degradação até a diluição de 50 vezes.

O extrato de 6 horas apresentou maior atividade que os outros somente quando diluído 100X, 200X e 400X, sendo o único a apresentar atividade com diluições de 800X e 1600X.

Com base nos dados dessa figura, é de se supor que as maiores concentrações das enzimas degradadoras de glúten da bactéria BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.) ocorrem entre as 12 e 24 horas de incubação.

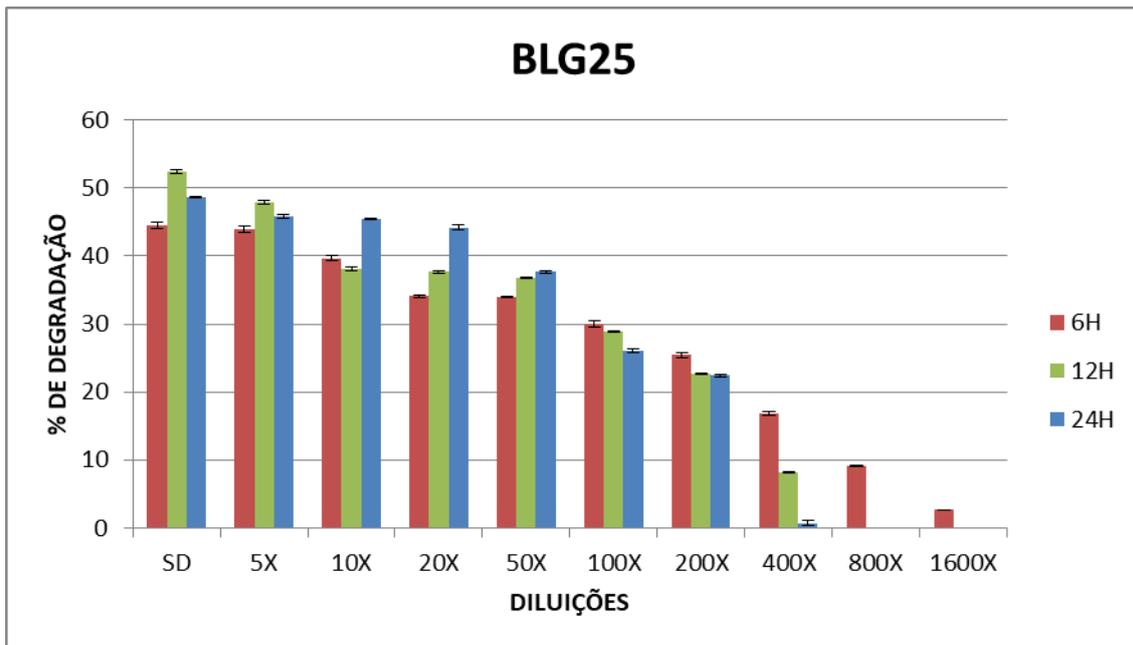


Figura 39. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Os extratos obtidos da bactéria BLG28 (*Bacillus* sp.) (Figura 40) indicam um comportamento diferente aos observados com as duas primeiras bactérias. Pode-se observar nessa figura, que os extratos obtidos com 6 e 24 horas mostraram maiores capacidades de degradarem o glúten do que o extrato obtido com 12 horas e esse comportamento se manteve até quando foram diluídos 100X. A partir dessa diluição, prevaleceu a maior capacidade de degradação do extrato obtido com 6 horas de incubação, o que o recomenda caso os extratos desse *Bacillus* seja usado industrialmente para esse fim.

Os extratos brutos dessa bactéria conseguiram degradar no máximo, 50% do glúten, quando usado sem diluição ou até na diluição de 5 vezes, diminuindo levemente até a diluição de 100 vezes, caindo para 5% de degradação na maior diluição usada no experimento (1600X).

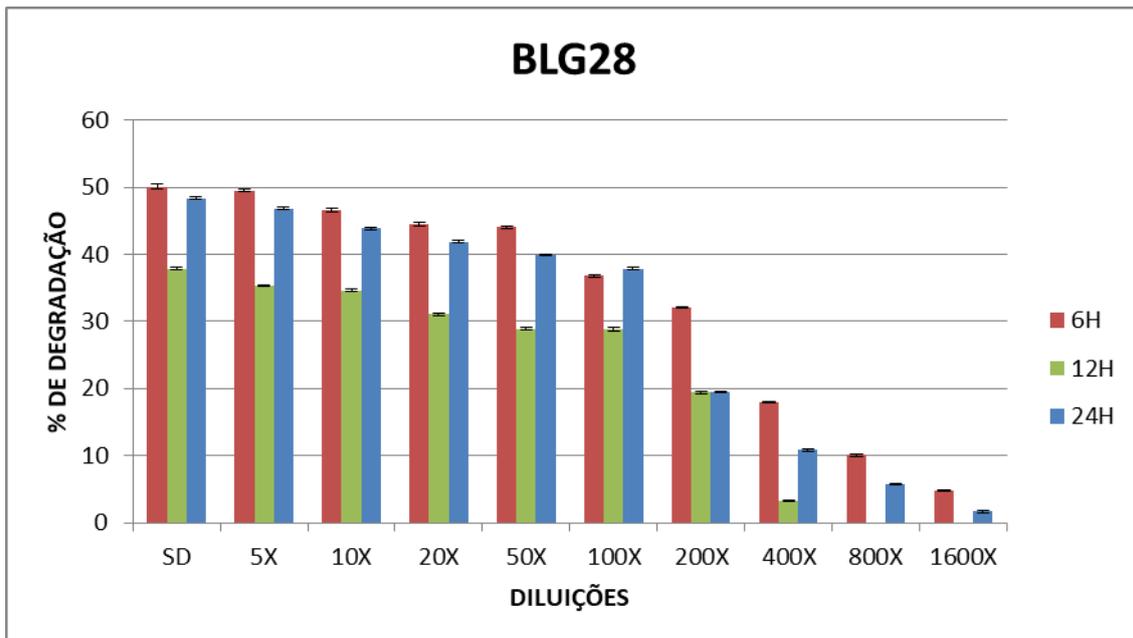


Figura 40. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG28 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Esse mesmo comportamento foi observado com os extratos brutos da bactéria BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*) (Figura 41), com os obtidos com 6 e 24 horas também tendo maiores capacidades de degradação do o obtido com 12 horas de incubação. E esse comportamento foi observado em todos os fatores de diluições (até 1600X). Do mesmo modo, houve uma leve predominância do extrato com 6 horas ser melhor do que o obtido com 24 horas de incubação.

Assim como nos extratos da BLG28, os da BLG33 conseguiram degradar um máximo de 50% do glúten, mas o efeito das diluições foi mais pronunciado nessa *Pseudomonas*, com seus extratos apresentando quedas mais acentuadas de reação à medida que as diluições foram usadas.

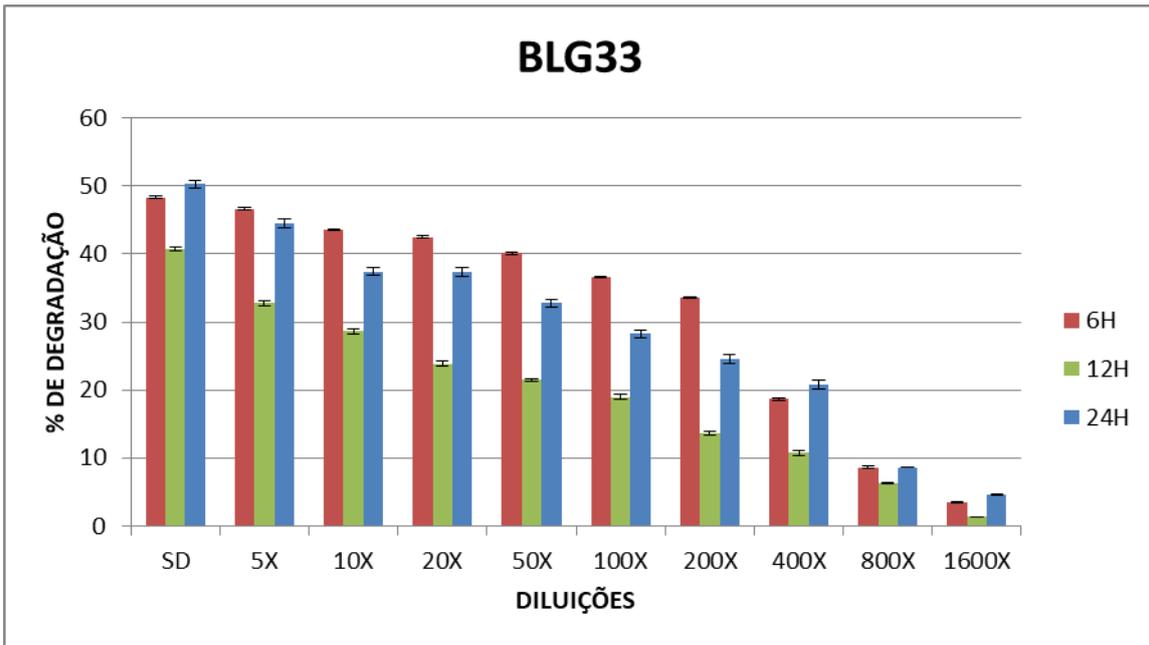


Figura 41. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Com relação aos extratos da bactéria BLG38 (*Bacillus* sp.) (Figura 42), predominou a capacidade de degradação do extrato obtido com 24 horas, que foi superior aos outros dois até na diluição de 200X.

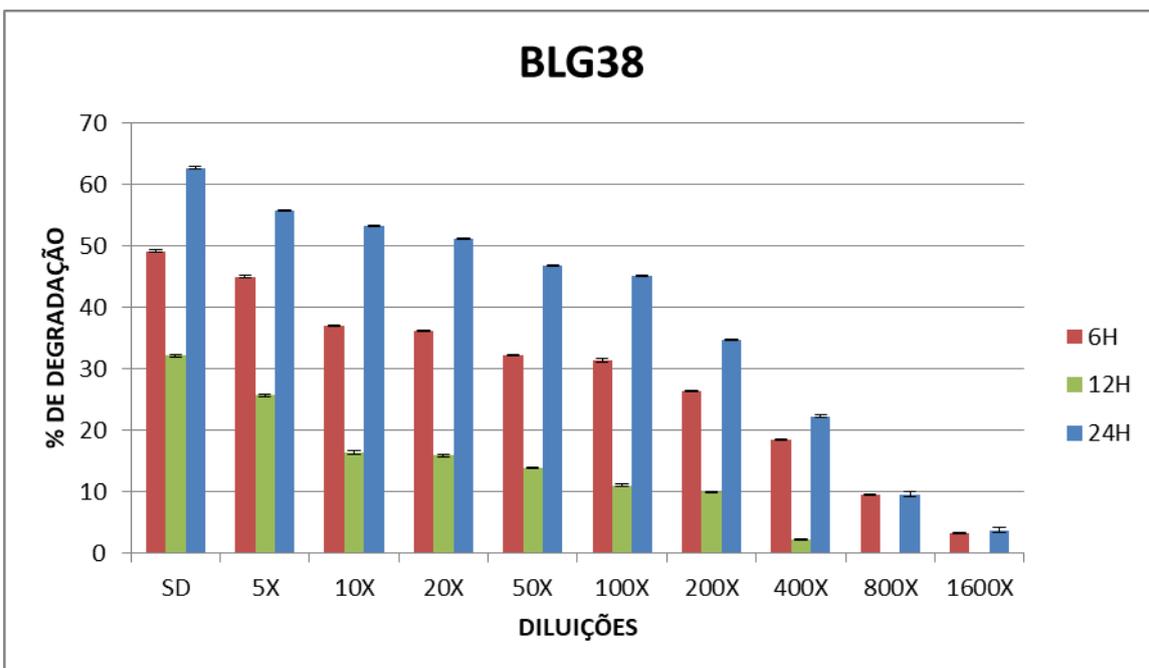


Figura 42. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG38 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Do mesmo modo que nas duas últimas bactérias, o extrato de 12 horas foi o que apresentou menor capacidade de degradação. Além dessa diferença, pode-se observar por essa figura, que o extrato de 24 horas conseguiu degradar mais de 60% do glúten, mostrando-se melhor do que os das demais bactérias já apresentadas. Mesmo quando diluído 50X esse extrato foi capaz de degradar 50% do glúten.

Os extratos da bactéria BLG45 (*Burkholderia* sp.) (Figura 43) se comportaram de forma semelhante aos da BLG38, também chegando a degradar 60% do glúten quando não diluído. Mas nesse caso, as diferenças entre os extratos foi menor, bem como o fato do extrato de 12 horas mostrar-se superior ao de 6 horas a partir da diluição de 10 vezes.

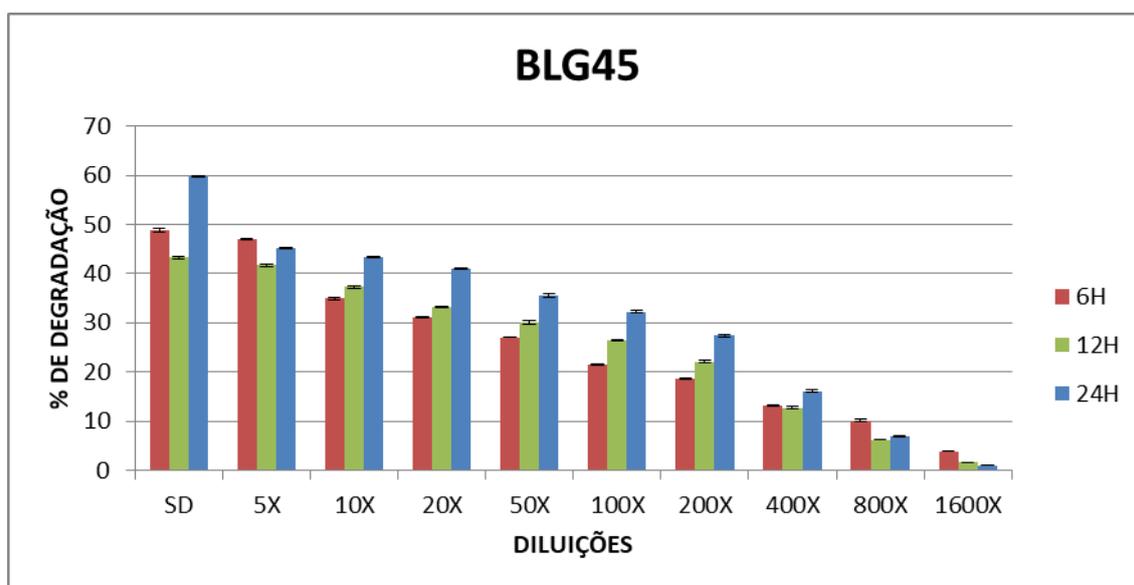


Figura 43. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG45 (*Burkholderia* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Quando se analisa os extratos da bactéria BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*) (Figura 44), observa-se que eles se comportaram de forma muito semelhante à observada com os extratos da bactéria BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*) (Figura 41). Os extratos de 5 e 24 horas mostraram-se com maiores capacidades de degradar o glúten, com o extrato de 6 horas sendo levemente superior ao de 24 horas, mas ambos se mostraram bem melhores do que o de 12 horas.

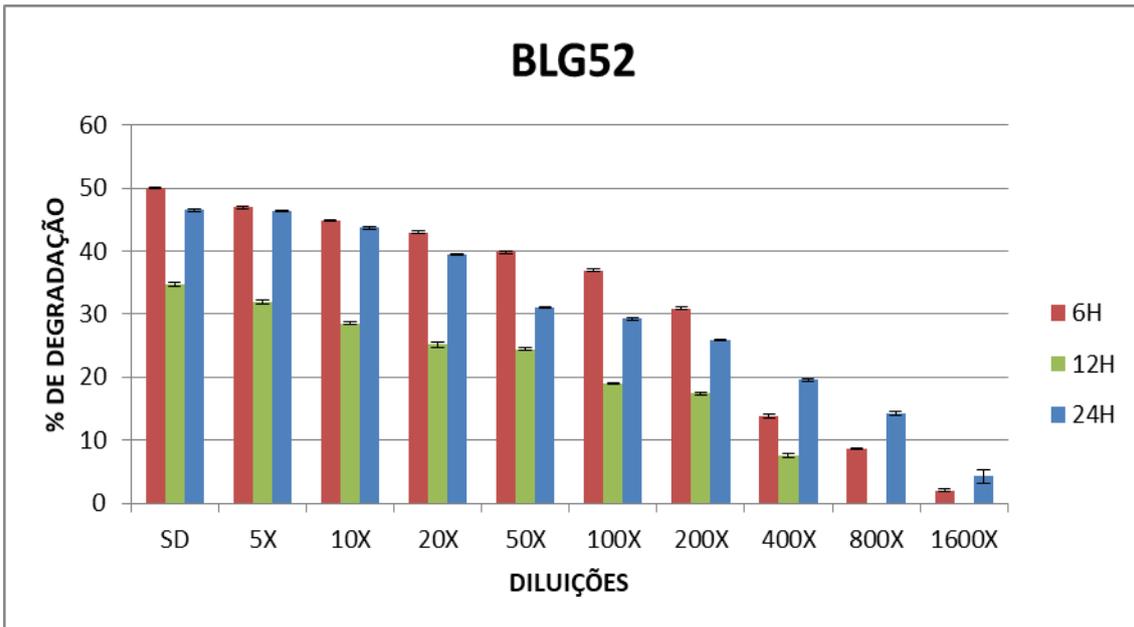


Figura 44. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Os extratos da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) (Figura 45) coletados com 12 horas também se mostraram com menores capacidades de degradação do glúten quando comparado aos de 6 e 24 horas, com esse último sendo levemente superior ao de 6 horas.

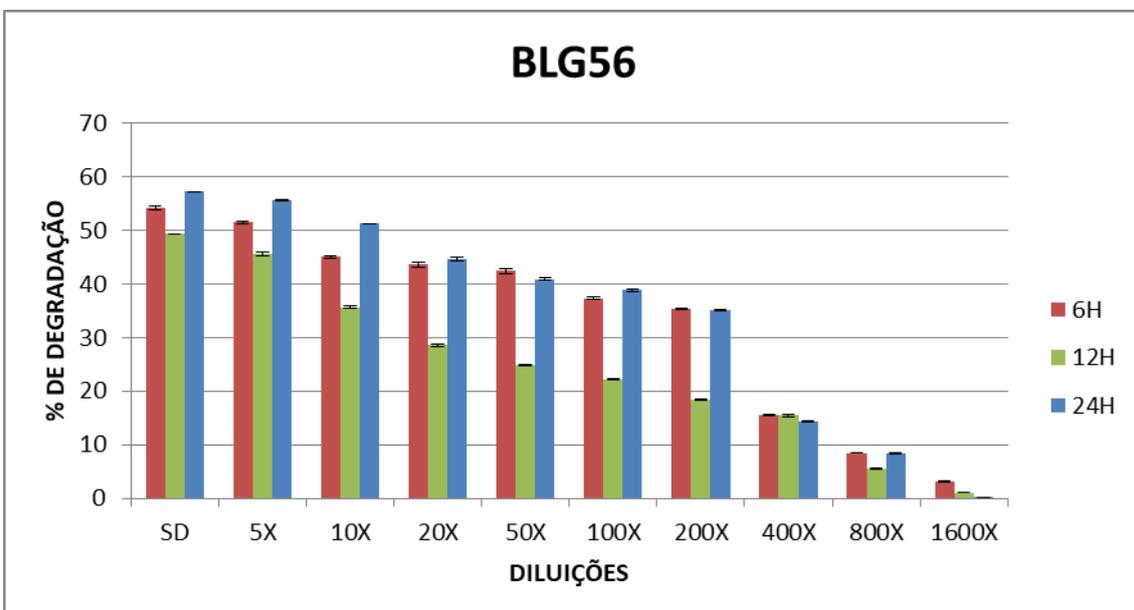


Figura 45. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Esses dois extratos apresentaram uma leve diminuição da capacidade de degradação até a diluição de 200X, quando então mostraram uma queda brusca ao serem diluídas 400X.

A figura 46 mostra a capacidade do extrato obtido da bactéria BLG73 (*Bacillus* sp.), nos tratamentos sem diluição (SD) até diluição de 1600X, em degradar o glúten quando crescida em 6, 12 e 24 horas.

A maior atividade apresentada pelo extrato obtido por essa bactéria foi de 60 % quando coletado com 6 horas de crescimento no tratamento sem diluição, mantendo essa atividade no tratamento com diluição de 5X.

O extrato coletado com 6 horas apresentou maiores percentuais de degradação de glúten em sete das dez diluições testadas quando comparado com os extratos coletados nos outros tempos de crescimento: SD (60 %), diluição de 5X (60 %), 10X (55 %), 20X (50 %), 50X (45 %), 100X (40 %) e 200X (30 %).

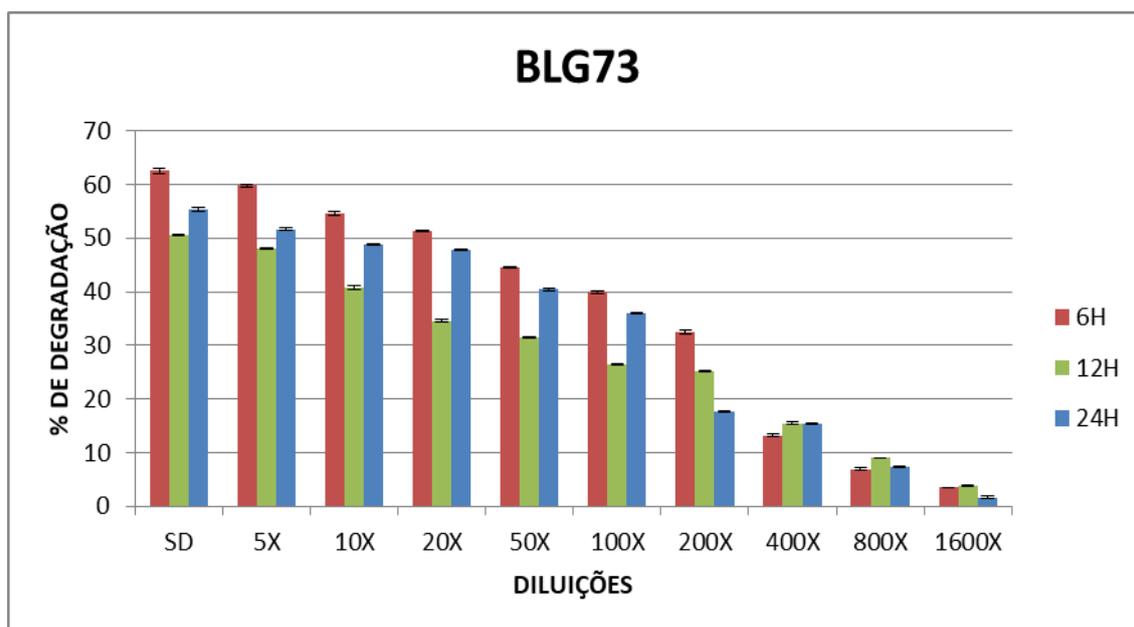


Figura 46. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG73 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em lactose.

Já o extrato coletado com 12 horas apresentou maiores atividades nos tratamentos com diluição de 800X (10 %) e 1600X (5 %) quando comparado com os extratos coletados nos outros tempos.

No tratamento com diluição de 400X, os extratos coletados com 12 e 24 horas de crescimento apresentaram atividades semelhantes de 15 %.

### 3.3. Capacidade de degradação do glúten pelos extratos diluídos coletados com 6, 12 e 24 horas de crescimento das bactérias crescidas em meio contendo glúten

Com relação aos extratos das bactérias cultivadas em meio contendo glúten, pode-se observar na Tabela 23, os coletados após 6 horas de crescimento inicial. A bactéria que teve maior porcentagem de degradação de glúten foi a BLG02, com atividade de 60,1 %, seguida das BLG25 e BLG28, respectivamente com 46,9 e 46,7 %.

Tabela 23. Porcentagem de glúten degradado pelos extratos bacterianos com 6 horas de crescimento.

Tempo (minutos)	Bactérias INPA BLG									Médias
	02	25	28	33	38	45	52	56	73	
	-----%-----									
0	53,1	47,6	47,7	31,4	19,8	25,7	26,1	22,6	29,5	33,7 A
15	54,5	46,0	46,8	31,3	19,7	25,6	27,6	24,4	29,8	34,0 A
30	54,7	46,5	46,8	32,3	19,2	25,4	24,7	23,7	29,8	33,7 A
45	56,0	47,1	46,4	31,4	19,8	25,8	24,9	24,0	29,8	33,9 A
60	56,5	46,9	46,7	31,9	19,2	25,2	25,1	23,5	29,9	33,9 A
75	59,1	46,8	46,7	33,3	19,4	26,1	25,8	24,6	29,8	34,6 A
90	60,6	46,3	46,1	33,4	19,5	25,8	25,3	24,5	29,8	34,6 A
105	64,0	46,5	46,2	39,5	19,4	25,8	25,8	24,5	30,3	35,8 A
120	64,9	47,4	46,5	33,9	19,4	25,0	26,0	24,5	29,8	35,3 A
135	64,8	47,1	47,0	34,1	19,4	25,6	26,2	23,7	29,8	35,3 A
150	64,6	47,4	47,7	38,4	19,7	27,1	26,8	24,0	30,0	36,2 A
165	64,6	47,6	46,0	38,4	18,8	27,0	27,5	24,0	29,9	36,0 A
180	64,3	46,8	46,8	38,3	19,4	27,0	26,7	24,1	29,7	35,9 A
Médias	60,1	46,9	46,7	34,4	19,4	25,9	26,1	24,0	29,8	
	a	b	b	c	f	de	de	ef	cd	

Obs.: As médias com as mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Estatisticamente, todos os tempos de análise foram iguais mantendo médias que variam de 33,7 % a 36,2 % de atividade, conforme pode-se observar na última coluna dessa tabela.

Com relação aos extratos coletados após 12 horas de crescimento (Tabela 24), os resultados mudaram significativamente com a maior atividade de degradação do glúten ocorrendo com o extrato da BLG33, com 86,1 %, seguida da BLG52 com 72,1 %. Os extratos com menores capacidades de degradação do glúten retirados após 12 horas de incubação foram os das bactérias BLG56 e BLG73, respectivamente com 23,3 e 23,9%.

O tempo de exposição desses extratos com o glúten também influenciou na degradação desse composto proteico, com as maiores degradações ocorrendo após 150 minutos de exposição (Tabela 24).

Tabela 24. Porcentagem de glúten degradado pelos extratos bacterianos com 12 horas de crescimento.

Tempo (minutos)	Bactérias INPA BLG									Médias
	02	25	28	33	38	45	52	56	73	
	-----%-----									
0	53,0 abA	50,6 bcC	46,4 bcA	61,2 aC	30,3 dA	30,2 dA	42,6 cl	24,0 dA	23,5 dA	40,2 H
15	50,4 bA	50,7 bC	46,8 bA	80,0 aB	29,5 cA	30,5 cA	54,0 bH	22,4 cA	24,5 cA	43,2 G
30	49,8 cA	50,8 cC	47,0 cA	83,8 aAB	29,6 deA	31,8 dA	60,8 bG	22,4 eA	24,0 deA	44,4 FG
45	49,9 cA	51,8 cC	46,1 cA	86,6 aAB	29,9 deA	32,8 dA	65,7 bFG	22,8 eA	23,6 deA	45,4 EF
60	50,2 cA	52,5 cC	45,2 cA	88,2 aA	30,5 dA	32,3 dA	68,6 bEF	23,1 dA	23,4 dA	46,0 DEF
75	50,6 cA	54,4 cBC	45,9 cA	89,2 aA	30,0 deA	33,1 dA	72,1 bDEF	23,4 eA	23,4 eA	46,9 CDE
90	52,0 cdA	56,3 cABC	46,5 dA	89,6 aA	30,4 efA	33,7 eA	74,5 bCDE	22,6 fA	23,6 fA	47,7 BCD
105	52,3 cdA	59,0 cAB	48,0 dA	90,0 aA	29,5 efA	34,4 eA	77,3 bBCD	23,6 fA	24,0 fA	48,7 ABC
120	52,9 bcA	59,6 bAB	47,7 cA	90,0 aA	29,6 deA	34,1 dA	81,0 aABC	24,0 eA	24,4 eA	49,2 AB
135	53,4 bcA	60,3 bAB	47,6 cA	90,0 aA	29,8 deA	35,0 dA	82,8 aAB	23,2 eA	24,5 eA	49,6 AB
150	54,7 bcA	61,2 bA	47,7 cA	90,0 aA	29,6 deA	35,4 dA	84,6 aA	23,9 eA	24,2 eA	50,1 A
165	54,8 bcA	61,8 bA	47,7 cA	90,0 aA	29,8 deA	35,4 dA	86,1 aA	23,9 eA	23,4 eA	50,3 A
180	54,8 bcA	62,4 bA	48,1 cA	90,0 aA	30,2 deA	35,8 dA	87,2 aA	23,9 eA	24,3eA	50,8 A
Médias	52,2 cd	56,3 c	47,0 d	86,1 a	29,9 ef	33,4 e	72,1 b	23,3 f	23,9 f	

Obs.: As médias com as mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Tabela 25. Porcentagem de glúten degradado pelos extratos bacterianos com 24 horas de crescimento.

Tempo (minutos)	Bactérias INPA BLG									Médias
	02	25	28	33	38	45	52	56	73	
	-----%-----									
0	47,0 bF	40,6 bcdA	31,9 dA	70,1 aB	35,5 cdA	43,8 bcD	38,2 bcdD	42,6 bcC	33,2 dB	42,5 G
15	46,9 bF	40,2 bcdA	31,9 dA	75,8 aB	39,4 bcdA	47,0 bCD	42,1 bcCD	78,6 aB	33,4 cdB	48,4 F
30	48,8 bEF	38,2 cdeA	31,4 eA	84,2 aA	38,7 cdeA	46,9 bcCD	42,4 bcdCD	86,3 aA	36,3 deAB	50,3 EF
45	51,9 bEF	38,4 cdeA	31,5 eA	88,6 aA	38,0 deA	47,6 bcBCD	42,7 bcdBCD	89,6 aA	36,2 deAB	51,6 DE
60	51,1 bEF	39,2 cdA	31,5 dA	89,9 aA	38,0 cdA	48,8 bABCD	43,6 bcABCD	89,8 aA	37,7 cdAB	52,2 CDE
75	52,8 bDEF	39,3 cdA	31,5 dA	90,2 aA	38,8 cdA	51,3 bABC	46,3 bcABC	90,1 aA	40,1 cdA	53,4 BCD
90	53,0 bDEF	40,1 cdA	32,1 dA	90,4 aA	39,5 cdA	51,8 bABC	47,1 bcABC	90,1 aA	39,2 cdAB	53,7ABCD
105	55,1 bCDE	39,9 cdA	32,1 dA	90,3 aA	38,9 cdA	52,9 bABC	47,3 bcABC	90,2 aA	39,4 cdAB	54,0 ABC
120	58,3 bBCD	40,2 deA	31,8 eA	90,3 aA	38,6 deA	53,1 bcABC	47,8 cdABC	90,4 aA	39,5 deAB	54,4 AB
135	61,3 bABC	40,6 deA	31,3 eA	90,4 aA	38,3 eA	53,4 bcAB	48,4 cdABC	90,4 aA	40,3 deA	54,9 AB
150	61,8 bAB	39,7 deA	31,2 eA	90,4 aA	38,9 eA	53,8 bcAB	48,9 dcdAB	90,4 aA	40,4 deA	55,0 AB
165	63,2 bAB	39,7 eA	31,2 eA	90,4 aA	39,0 eA	54,3 bcA	49,2 cdA	90,4 aA	40,4 deA	55,3 AB
180	65,2 bA	39,8 eA	32,0 eA	90,4 aA	39,2 eA	54,6 cA	49,6 cdA	90,4 aA	40,4 deA	55,7 A
Médias	55,1 b	39,7 d	31,7 e	87,0 a	38,5 de	50,7 bc	45,7 cd	85,3 a	38,2 de	

Obs.: As médias com as mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Esse efeito do tempo de exposição é reflexo da degradação crescente ao longo do tempo ocasionado pelos extratos das bactérias BLG25, BLG33 e BLG52, conforme pode ser observado na Tabela 25. Devido ao isso, ao final de 180 minutos de exposição, os índices de degradação do glúten por esses três extratos foram respectivamente 62,4 %, 90,0% e 87,2 %.

Com relação aos extratos obtidos após 24 horas de incubação das bactérias (Tabela 25), os melhores foram os provenientes das BLG33 e BLG56, respectivamente com 87,0 % e 85,3 % de degradação do glúten. O pior de todos foi o extraído da BLG28 com 31,7 % de degradação, seguido pelo da BLG73 com 38,2 %.

Com esses extratos também se observou uma ação crescente de degradação com o tempo de exposição, como observado nos extratos com 12 horas de incubação, sendo essa característica, proveniente da maioria dos extratos, que nesse caso, foram os das bactérias BLG02, BLG33, BLG45, BLG52, BLG56 e BLG73. Somente os extratos das bactérias BLG25, BLG28 e BLG38 não se comportaram desse jeito (Tabela 25).

De acordo com as tabelas 23, 24 e 25, pode-se observar que o tempo de incubação das bactérias influenciou em suas capacidades de degradarem o glúten.

O extrato da bactéria BLG02 teve maior atividade quando coletado com 6 horas de crescimento (60,1 % em média), enquanto que os extratos das bactérias BLG25 (56,3 %), BLG28 (47,0 %) e BLG52 (72,1 %) apresentaram maiores atividades quando coletados com 12 horas de crescimento quando comparados com os outros tempos de coleta.

Os extratos das bactérias BLG33 (87,0 %), BLG38 (38,5 %), BLG45 (50,7 %), BLG56 (85,3 %) e BLG73 (38,2 %) apresentaram maiores percentuais de degradação de glúten quando coletados com 24 horas de crescimento.

As figuras a seguir mostram essas propriedades dos extratos e o efeito de suas diluições em suas capacidades de degradarem o glúten.

A figura 47 mostra a capacidade do extrato obtido da bactéria BLG02 (*Bacillus* sp.), nos tratamentos sem diluição (SD) até diluição de 1600X, em degradar o glúten quando crescida em 6, 12 e 24 horas.

O extrato da bactéria BLG02 apresentou sua maior atividade no tratamento sem diluição (60 %) e tempo de coleta de 6 horas de crescimento, tendo uma atividade de 45 % quando diluído 5X. A diluição de 400X ainda teve uma atividade acima de 10 %.

Quando comparados os três tempos de coleta, o tempo de 6 horas foi o que apresentou maiores percentuais de degradação de glúten na maioria dos tratamentos, com exceção dos tratamentos com diluições de 800X e 1600X.

A atividade do extrato coletado com 12 horas de crescimento foi maior em comparação com os demais somente no tratamento com diluição de 800X (5%), enquanto que foi igual ao de 6 horas no tratamento com diluição de 1600X (2%).

O extrato coletado com 24 horas foi o que apresentou menor atividade em todas as diluições, desaparecendo quando diluído 800X e 1600X.

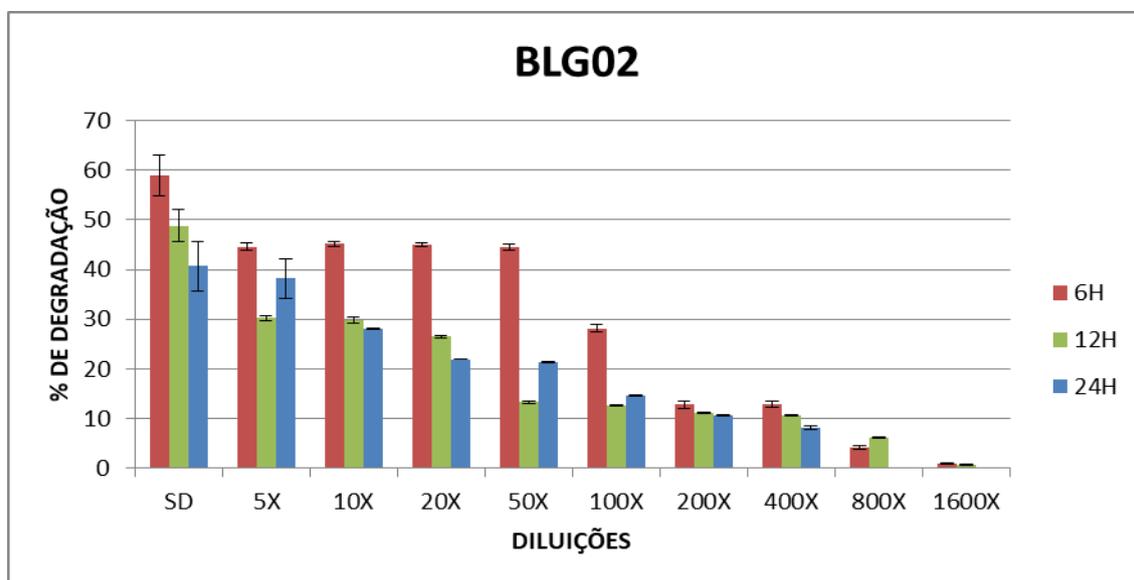


Figura 47. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG02 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

A figura 48 mostra a capacidade do extrato obtido da bactéria BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), nos tratamentos sem diluição (SD) até diluição de 1600X, em degradar o glúten quando crescida em 6, 12 e 24 horas.

A maior porcentagem de glúten degradado por esse extrato foi sem diluição nos tempos de coleta de 12 e 24 horas de crescimento (aproximadamente 50 %).

Nas diluições, o extrato coletado com 24 horas apresentou maior atividade quando comparado com os demais, mantendo seus índices de degradação acima de 40 % mesmo quando diluído 100X. Os extratos coletados com 6 e 12 horas, por outro lado, mostraram um queda acentuada à medida em que foram diluídos.

O extrato obtido com 6 horas de coleta não apresentou maior atividade quando comparado com os outros tempos de coleta em nenhuma das diluições, sendo inexistente nas diluições de 800X e 1600X.

No resultado da diluição de 200X do extrato coletado com 24 horas houve um desvio padrão elevado, pois, no começo (tempo zero) até o final da análise (180 minutos) a atividade variou entre 10 % e 50 %. Essa variação pode ser visualizada nos dados do extrato sem diluição apresentados na tabela 25.

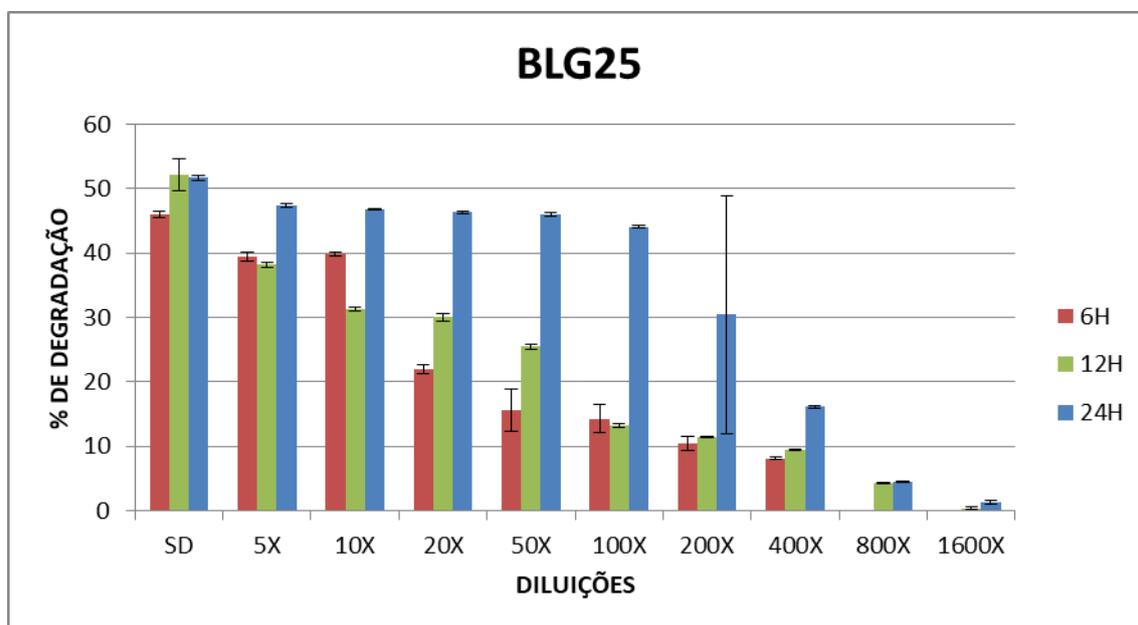


Figura 48. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG25 (*Stenotrophomonas* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

Com relação à bactéria BLG28 (*Bacillus* sp.) (Figura 49), o extrato que mostrou maior atividade foi o coletado com 24 horas, seguido pelo de 12 horas, degradando acima de 55 % do glúten, quando sem diluição. A capacidade desses dois extratos em degradarem o glúten caiu para aproximadamente 40 % quando diluídos de 5X até 50X. O extrato coletado com 12 horas não apresentou atividade nas diluições de 800X e 1600X.

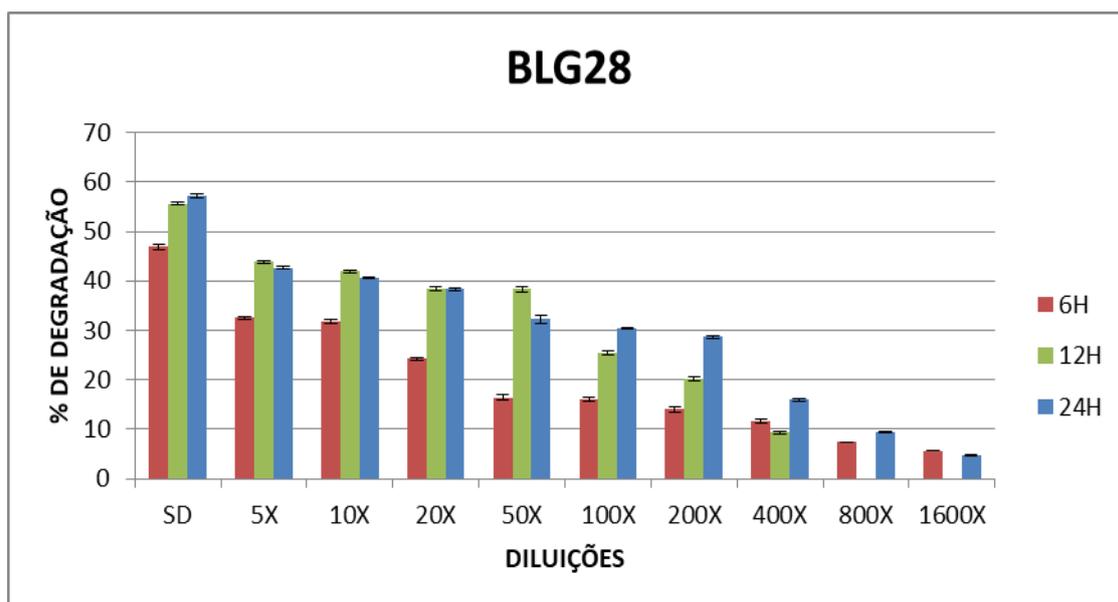


Figura 49. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG28 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

Quanto aos extratos da bactéria BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*) (Figura 50), do mesmo modo que os da bactéria BLG28, os obtidos com 12 e 24 horas mostraram maiores atividades do que o coletado com 6 horas, sendo essa diferença muito maior. Sem diluição, o extrato coletado com 12 horas degradou 84 %, o de 24 horas 77 %, enquanto que o de 6 horas degradou apenas 35 % do glúten.

O extrato que mostrou as maiores atividades de degradação do glúten até a diluição de 200X foi o coletado com 12 horas.

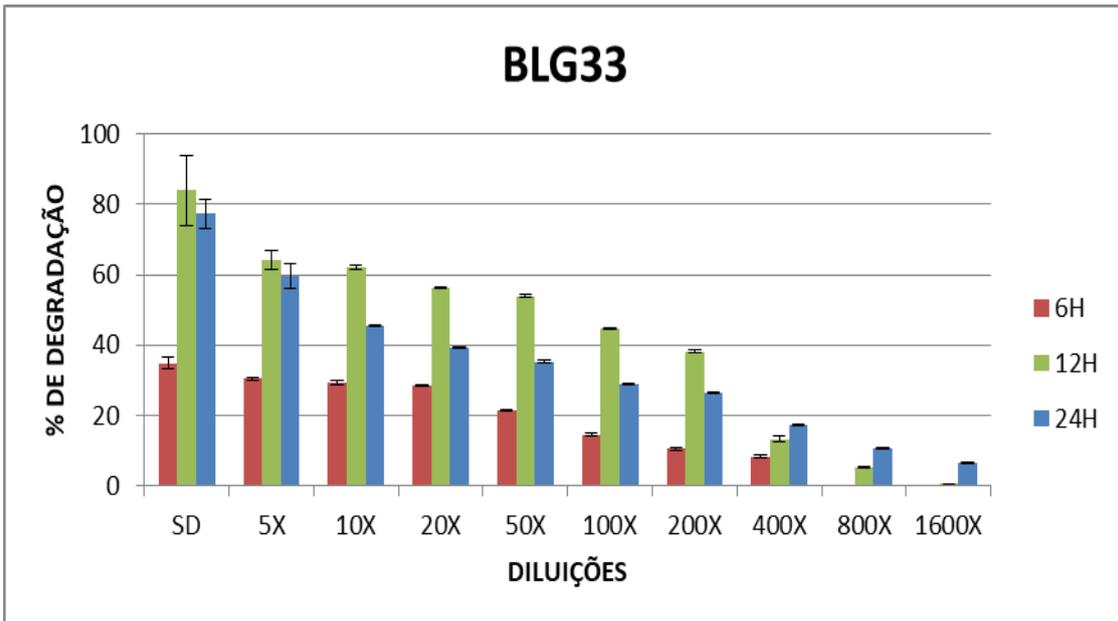


Figura 50. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG33 (*Pseudomonas aeruginosa*), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

Com relação aos extratos da bactéria BLG38 (*Bacillus* sp.) (Figura 51), observa-se que a atividade de degradação do glúten do obtido com 24 horas de crescimento foi bem superior às dos demais.

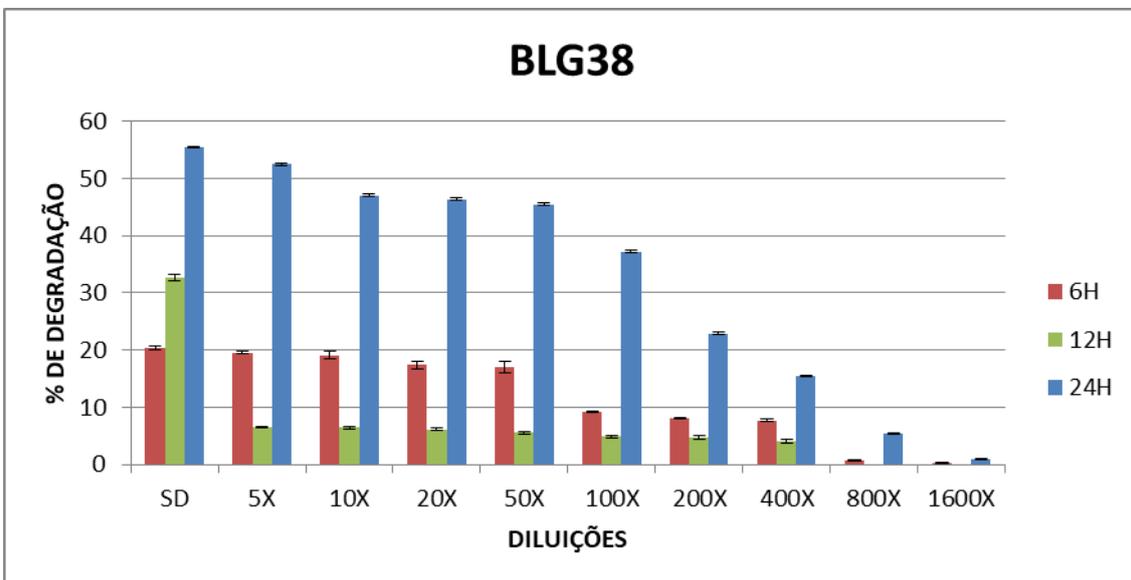


Figura 51. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG38 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

O extrato coletado com 12 horas foi superior ao de 6 horas apenas quando não diluído, uma vez que o processo de diluição resultou numa queda

acentuada em sua capacidade de degradação do glúten, enquanto que o de 6 horas manteve essa atividade relativamente estável até na diluição de 50X.

O extrato obtido com 24 horas da bactéria BLG45 (*Burkholderia* sp.) (Figura 52) também foi o que apresentou maior atividade, mas nesse caso, o extrato com 6 horas se mostrou bem superior ao coletado com 12 horas de crescimento.

A capacidade de degradação do extrato com 24 horas se mostrou com pouca variação até na diluição de 20X, enquanto que o de 6 horas até a diluição de 10X.

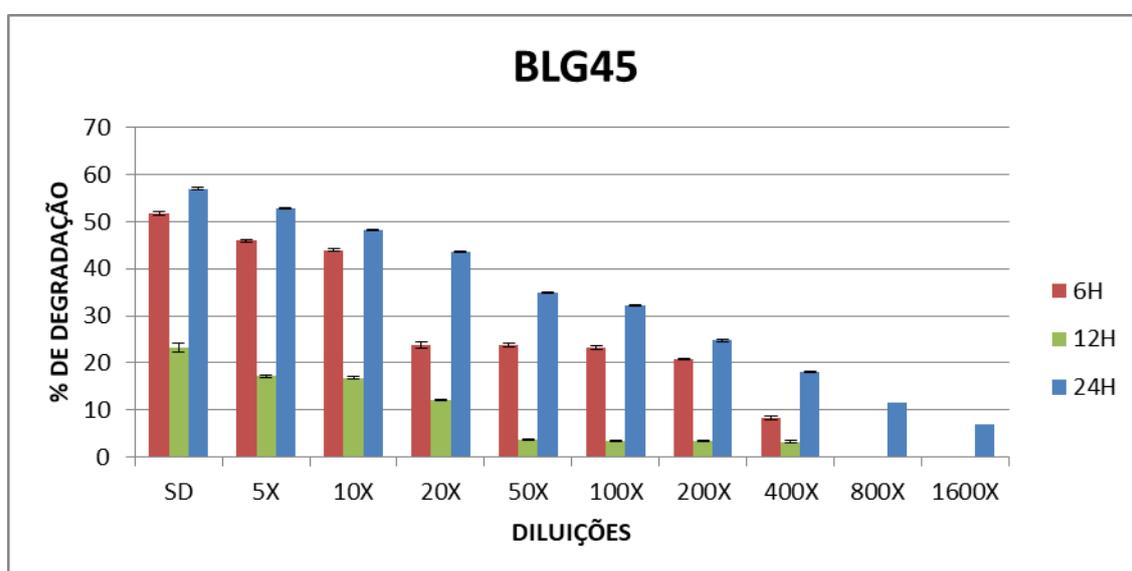


Figura 52. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG45 (*Burkholderia* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

Pouca variação foi observada entre os três extratos obtidos da bactéria BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*) (Figura 53).

Os índices de degradações dos três extratos variaram de 50 a 55 % não diluídos, caindo para em torno de 40 % até a diluição de 50X, exceto o extrato de 12 horas que apresentou uma queda maior de atividade.

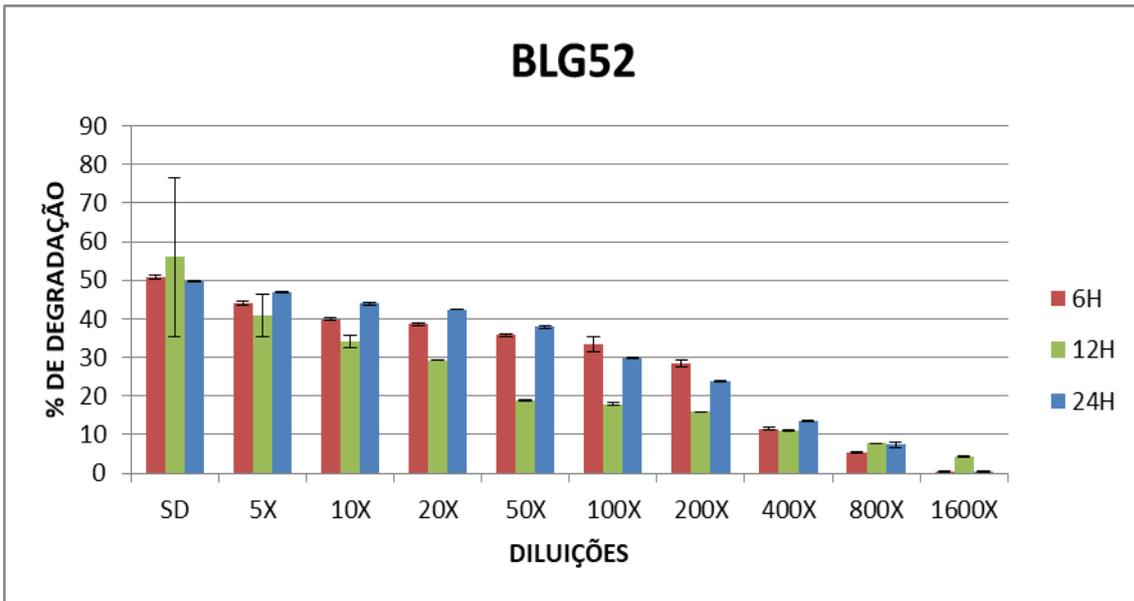


Figura 53. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

Com relação aos extratos da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) (Figura 54), o obtido com 24 horas se sobressaiu aos demais até a diluição de 5X, com os outros dois extratos se mantendo iguais até a diluição de 50X.

O extrato com 24 horas sem diluição mostrou uma atividade muito elevada, degradando quase 90 % do glúten, enquanto que as observadas com os outros dois extratos foram de aproximadamente 50 % até a diluição de 50X.

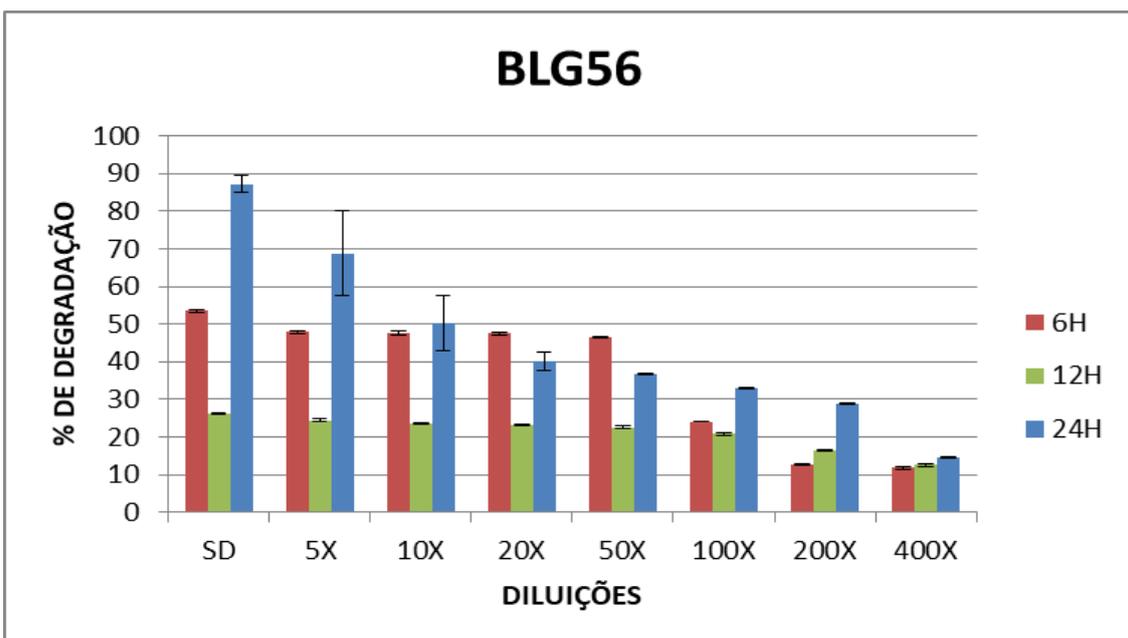


Figura 54. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

O extrato coletado com 24 horas de crescimento da bactéria BLG73 (*Bacillus* sp.) (Figura 55) também se mostrou superior aos demais, com o de 6 horas sendo superior ao de 12 horas até na diluição de 800X.

Não houve muita variação nas atividades do extrato de 24 horas entre as diluições de 5X a 50X, enquanto que o extrato de 6 horas mostrou uma queda acentuada ao ser diluída 10X. Com relação ao extrato de 12 horas ocorreu uma queda significativa ao diluí-la.

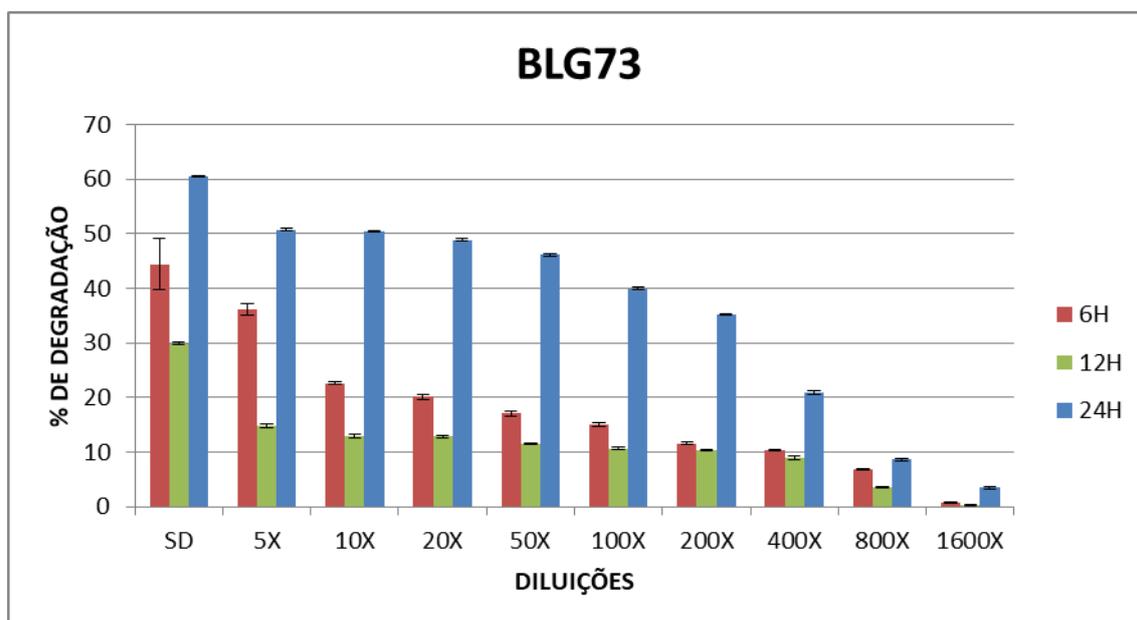


Figura 55. Percentual de degradação de glúten do extrato da bactéria BLG73 (*Bacillus* sp.), quando crescida em 6, 12 e 24 horas em glúten.

Portanto, observou-se uma grande diferença nas capacidades de degradação do glúten quando se coletou os extratos dessas bactérias nos tempos de 6, 12 e 24 horas, bem como ao diluí-los. Além disso, observou-se que o fato de colocar as bactérias para crescerem em meio contendo lactose ou glúten também influenciou no potencial de degradação do glúten por esses extratos.

Usando essas variáveis, foi possível obter capacidades de degradação entre um mínimo de 20,4 % usando o extrato de 6 horas com a BLG38 em meio de cultura contendo glúten, até um máximo de 87,3 % usando o extrato de 24 horas da BLG56 em meio de cultura contendo também o glúten (Tabela

22). Isso demonstra a ocorrência de proteases diferentes encontradas nessas bactérias, com capacidades de degradarem o glúten.

Os extratos com maiores potenciais de utilização econômica para a degradação do glúten foram os obtidos das BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.) por elas fazerem parte de gêneros com pouca possibilidade de patogenicidade. O uso de microrganismos não patogênicos desoneram os custos de produção industrial, pois não exigem maiores cuidados no manuseio do processo de produção. Desses, a(s) protease(s) mais promissora(s) é/são a(s) presente(s) no extrato de 24 horas da BLG56 cultivada no meio contendo glúten, por apresentar(em) a maior capacidade de degradação do glúten, 87,3 %, conforme mostrado na Tabela 22 e Figura 54.

O efeito da concentração na capacidade das enzimas em reagirem com os substratos é bastante conhecido (ALBE *et al.*, 1990; RISTENPART *et al.*, 2008; SALWANEE *et al.*, 2013) e serve de parâmetro para se avaliar seus potenciais usos biotecnológicos. As enzimas que conseguem degradar os substratos mesmo em concentrações muito baixas podem ser preferidas quando suas concentrações mais elevadas podem causar efeitos colaterais indesejáveis, bem como podem baratear o processo industrial, por usarem pequenas quantidades nas bioindústrias.

#### 4. Conclusões

Todas as bactérias produziram extratos com capacidade de degradação do glúten.

A fonte de carbono (lactose ou glúten) afetou a capacidade dessas bactérias em produzirem extratos capazes de degradarem o glúten.

O tempo de coleta dos extratos bacterianos influenciou nas suas capacidades de degradar o glúten.

Os extratos de 12 horas da maioria dessas bactérias foram os que mostraram menores capacidades de degradação do glúten.

Os extratos de 24 horas da maioria dessas bactérias foram os que mostraram maiores capacidades de degradação do glúten.

O maior percentual de degradação de glúten foi de 87,3 % usando o extrato obtido com 24 horas de crescimento da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) cultivada em meio de cultura contendo glúten.

Com base na capacidade de degradação, nos tempos de coletas dos extratos bacterianos e meios de cultura, pode-se concluir que as nove bactérias apresentam diferentes proteases capazes de degradarem o glúten.

A capacidade dos extratos degradarem o glúten variou com suas concentrações na solução de formas diferentes e essa característica pode servir como um teste a mais para diferenciar uns dos outros.

São necessários estudos mais detalhados, como o de purificação dos componentes dos extratos dessas bactérias, para avaliar cada uma dessas proteases individualmente, para escolher as de melhores potenciais biotecnológicos.

## DISCUSSÃO GERAL

Ao longo dos anos, a ciência vem documentando situações de intolerância aos alimentos e duas que se sobressaem são as relacionadas com a ingestão de lactose e glúten. Entre 5 % das pessoas do norte da Europa e 90 % em alguns países asiáticos sofrem de intolerância à lactose (Wikipédia, 2015), uma inabilidade para digerir completamente esse dissacarídeo predominante no leite e seus derivados (TÉO, 2002). Por outro lado, entre 0,5-1,0 % da população mundial possui a Doença Celíaca (intolerância ao glúten), mas entre os pacientes diabéticos esse percentual aumenta, variando entre 2,2 % e 13,8 %, com uma média de 4,1 % nos países europeus (MONT-SERRAT *et al.*, 2008).

A lactose não digerida, ao passar pelo cólon, é fermentada por bactérias, produzindo ácidos orgânicos de cadeia curta e gases (TÉO, 2002). Isto resulta em diversos sinais e sintomas clínicos, como diarreia, acompanhada de desidratação, principalmente nas crianças de baixa idade, evacuação explosiva logo após a ingestão do alimento, assadura perianal, distensão e dor abdominal, flatulência, desnutrição, acidose metabólica e enterite necrosante (LOPES *et al.*, 2008; MORIWAKI; MATIOLI, 2000; TÉO, 2002).

Já a Doença Celíaca, também conhecida como enteropatia sensível ao glúten, é uma doença intestinal inflamatória crônica, autoimune permanente, que se manifesta em indivíduos com predisposição genética através da ingestão de prolaminas (MEIRINHO, 2009; MORÓN *et al.*, 2009). Além do consumo do glúten e da suscetibilidade genética, também é necessária a presença de fatores imunológicos e ambientais para que a doença se manifeste (SDEPANIAN *et al.*, 1999). O glúten é uma substância elástica, aderente, insolúvel em água, responsável pela estrutura das massas alimentícias, constituído por frações de gliadina e de glutenina, que, na farinha de trigo, totalizam 85 % da fração proteica. O trigo é o único cereal que apresenta gliadina e glutenina em quantidade adequada para formar o glúten. No entanto, essas proteínas estão presentes em outros cereais, como cevada, centeio e aveia (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Diversas pesquisas têm mostrado que microrganismos encontrados na cavidade bucal e intestinos apresentam habilidade de degradar a lactose e o

glúten (DI CAGNO *et al.*, 2001; FERNANDEZ-FEO *et al.* 2013; FONDÉN, 2001; FUJIMURA *et al.*, 2010; ROWAT *et al.*, 2010). Em derivados do leite, como nos queijos e iogurtes, também foram encontradas bactérias com essa capacidade (GOBBETTI, 2005; HELLER, 2001; MASOTTI *et al.*, 2013), abrindo perspectivas de se obterem, através de isolamentos, novos gêneros e espécies de bactérias para resolverem ou minimizarem esse problema de saúde presente nas populações humanas de todas as regiões do planeta.

A utilização de microrganismos não patogênicos capazes de degradar a lactose e o glúten pode ser uma alternativa para que pessoas que possuem intolerância à lactose e Doença Celíaca possam consumir uma maior quantidade de alimentos sem a necessidade de preocupação com essas substâncias. Essa utilização pode ser: a) pelas suas ingestões no trato digestivo (digestório), caso eles sejam compatíveis e possam fazer parte da flora intestinal; b) usando suas enzimas como um complemento medicamentoso, junto com a alimentação; c) usando suas enzimas na área industrial para degradarem a lactose e o glúten presentes em alimentos antes que sejam ingeridos pelos seres humanos.

Era de se esperar que alimentos regionais amazônicos, como o queijo coalho, de onde foi isolada a maioria das bactérias utilizadas no presente estudo, além de alguns industrializados, como queijos e iogurtes importados de outras regiões, contivessem bactérias capazes de degradar a lactose e o glúten sem serem patogênicas aos seres humanos, abrindo um novo potencial para se encontrar componentes microbianos com elevadas possibilidades de uso biotecnológico. Foi com essa intenção que essa pesquisa foi realizada.

Parte dos resultados obtidos já era esperada e desejada, como a presença nos queijos regionais (queijo coalho), de bactérias capazes de degradar esses dois componentes alimentícios, bem como diferenças entre elas e entre as enzimas encontradas, abrindo novas perspectivas de pesquisas para a caracterização molecular e bioquímica visando delimitar os usos biotecnológicos tanto das bactérias em si, como probióticos, como os das suas enzimas purificadas.

No entanto, não era desejável que essas bactérias fossem de gêneros/espécies com potenciais de patogenicidade humana, como as *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, apenas para citar dois dos gêneros

encontrados, repletos de informações bibliográficas (FERRAREZE *et al.*, 2007; GARCIA-PAEZ *et al.*, 2013; NICODEMO; GARCIA-PAEZ, 2007; NYČ; MATĚLKOVÁ, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2011; SENOL, 2004; SILVA-FILHO *et al.*, 2013; WOJKOWSKA-MACH *et al.*, 2006) como exemplos de microrganismos capazes de causar danos aos seres humanos. Como o processo de fabricação desses queijos é artesanal, sem pasteurização do leite e sem o uso de um inoculante microbiano conhecido e padronizado, essa possibilidade existia, mas não explicava o fato desses queijos raramente causarem diarreias ou outros sintomas até mais severos provenientes de suas ingestões.

Segundo Vieira *et al.* (2008), o leite recém-ordenhado em condições de assepsia mínima pode conter entre  $5,0 \times 10^3$  a  $5,0 \times 10^4$  UFC bacterianas.mL<sup>-1</sup>, sendo desejável que o mesmo seja pasteurizado ou esterilizado (ALMEIDA *et al.*, 2002) para garantir um mínimo de qualidade higiênica do produto final. Há uma exigência legal brasileira, por exemplo, de que o queijo Minas frescal seja fabricado com leite pasteurizado, mas segundo Pereira *et al.* (1991), é bastante frequente sua comercialização sem esse pré-requisito.

Vieira *et al.* (2008) fazem uma revisão consistente mostrando, com base na literatura científica, que os queijos Minas frescal apresentam riscos à saúde humana, relatando que há registros da internação de 26.588 pessoas, em 2000 provenientes de toxinfecção alimentar de origem diversa, causando principalmente, diarreia, vômitos, febre, cólica abdominal, náuseas, flatulência e indisposição.

A explicação para a ausência ou baixa ocorrência de efeitos colaterais causados pela ingestão desses queijos veio ao longo da pesquisa, quando observou-se que o binômio alta acidez do estômago e a alcalinidade dos intestinos criam barreiras químicas para essas bactérias sobreviverem e prosperarem nesses dois ambientes do nosso sistema digestório. Como as populações de microrganismos nos alimentos geralmente é inferior a  $10^4$  células.g<sup>-1</sup>, segundo recomendações da Resolução RDC n.12 da ANVISA (2001), a acidez do estômago acaba reduzindo a possibilidade de causarem algum sintoma indesejável ao ser humano, pois uma redução drástica desses microrganismos também pode ocorrer se não estiverem adaptados ao pH 8,0 dos intestinos. Uma redução de grandeza logarítmica 2 ( $10^2$  células.g<sup>-1</sup>) no

estômago e outra igual nos intestinos é capaz de eliminar totalmente uma população bacteriana de grandeza logarítmica 4 ( $10^4$  células.g<sup>-1</sup> de alimento) ao entrar nos intestinos. Somente quando apresentarem populações elevadas, acima de  $10^6$  células.g<sup>-1</sup> de alimento é que essas bactérias podem passar pelo estômago naquele espaço de tempo suficiente para a digestão inicial do queijo (três primeiras horas, na maioria das vezes), atingindo os intestinos com elevadas populações. Na maioria das vezes que essa alta população está presente no queijo, seu aspecto e odor alertam o consumidor para o não consumo do produto. Somente se consumido é que essas bactérias poderiam colonizar os intestinos e causarem danos à saúde humana. Mesmo nessa situação, essas bactérias teriam que enfrentar a competição com a flora intestinal, para causarem os efeitos indesejáveis. Em indivíduos saudáveis, que se alimentam de uma ampla gama de alimentos e que por isso, possuem uma flora intestinal diversificada, essa competição pode ser suficiente para impedir a proliferação das bactérias indesejáveis, o que pode não acontecer em pessoas com uma flora debilitada pela ingestão de antibióticos ou que se alimentam de poucos produtos, possuindo então, uma flora relativamente homogênea.

Considerando que as bactérias a serem usadas como probióticos nos intestinos devem ser ingeridas em altas concentrações, acima de  $10^6$  células.g<sup>-1</sup> de alimento e que em altas densidades celulares aumenta a possibilidade de se recombinarem, não se recomenda usar, por questões de biossegurança, bactérias de gêneros que possuem grande número de espécies com potencial patogênico, mesmo quando não apresentarem essa característica indesejável.

Em vista disso, das bactérias estudadas no presente estudos, sete delas, como a BLG02, BLG28, BLG38 e BLG73, identificadas como do gênero *Bacillus*, BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) possuem algum potencial para serem usadas como probióticos. Esses gêneros têm poucas espécies consideradas patogênicas ao ser humano e caso estudos futuros confirmem não o serem, bem como apresentarem a capacidade de colonizarem os intestinos de forma harmônica com a microbiota desse ambiente, poderão ser recomendadas para esse fim.

As que não se enquadrarem nesse perfil de probióticas poderão ser supridoras das enzimas capazes de degradar a lactose e o glúten, após suas purificações pelas bioindústrias. Dessas, a que apresentou o maior percentual

de degradação de glúten (87,3 %), foi o extrato obtido com 24 horas de crescimento da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) cultivada em meio de cultura contendo glúten.

No entanto, o glúten é uma mistura de quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e globulinas são aproximadamente 15 % das proteínas. Os restantes 85 % correspondem às proteínas monomérica e polimérica, denominadas gliadina e glutenina, dos quais 40 % são gliadinas (PALMU, 2003). Levando em consideração que a fracção tóxica do glúten é a gliadina, sendo esta a responsável pelas manifestações clínicas da doença (MCGOUGH; CUMMINGS, 2005), estudos futuros deverão ser envidados no sentido de verificar quais dessas bactérias e quais os extratos são capazes de degradar apenas esse constituinte do glúten, permitindo ao organismo humano, aproveitar de forma natural os outros componentes desse complexo proteico.

A continuidade das pesquisas realizadas nesse estudo deverá levar em consideração, quais dessas bactérias não são patogênicas, e quais as enzimas poderão resultar em produtos biotecnológicos de uso comercial para a população humana que apresenta restrições metabólicas em consumirem a lactose e o glúten, abrindo perspectivas de terem uma vida mais saudável e isenta de imprevistos de indisposição alimentar.

## CONCLUSÕES GERAIS

Foram isoladas 75 bactérias dos 10 tipos de queijo e 10 tipos de iogurtes usados para os testes.

Das 75 bactérias testadas, 61 apresentaram formação de halo de degradação em meio contendo glúten.

Pelo Índice de Degradação de Glúten (IDG), das 61 bactérias avaliadas, 22 não apresentaram IDG durante o teste, 30 apresentaram IDG's considerados baixos, 9 IDG's foram considerados médios e nenhuma apresentou IDG considerado alto.

A fonte de carbono do meio de cultura (glúten ou lactose) influenciou as características morfológicas das colônias das 20 bactérias selecionadas como as melhores.

Dezesseis bactérias foram Gram Negativas e 4 Gram Positivas.

Sete bactérias foram catalase positivas e 13 foram catalase negativas.

Das 13 bactérias usadas na caracterização genética, foi possível identificar somente quatro ao nível de espécie.

Quatro isolados são do gênero *Pseudomonas* sp., quatro do gênero *Bacillus* sp., duas do gênero *Stenotrophomonas* sp., uma do gênero *Brevibacillus* sp., uma do gênero *Achromobacter* sp. e uma do gênero *Burkholderia* sp.

As doze bactérias mostraram potencial para serem usadas como probióticas (após confirmação de não patogenicidade) ou como supridoras de enzimas capazes de degradarem a lactose e o glúten.

Todas as bactérias mostraram sensibilidade à acidez equivalente à do estômago e à alcalinidade equivalente à dos intestinos humanos.

Essa bipolaridade acidez/alcalinidade pode ser um mecanismo de defesa do organismo humano contra a ação de bactérias patogênicas ou indesejáveis.

Para que bactérias desejáveis sejam utilizadas como probióticas, elas precisam ser ingeridas em altas concentrações.

Das doze bactérias testadas, as com maiores potenciais de utilização como probióticas, desde que comprovadamente não sejam patogênicas, são as

BLG28 (*Bacillus* sp.), BLG38 (*Bacillus* sp.), BLG45 (*Burkholderia* sp.), BLG52 (*Brevibacillus parabrevis*), BLG56 (*Achromobacter* sp.) e BLG73 (*Bacillus* sp.) por fazerem parte de gêneros com pouca possibilidade de patogenicidade e por apresentarem crescimento positivo nas duas primeiras horas em pH 2,3.

O uso de pH 2,3 ou 8,0 a uma temperatura de 55 °C pode servir para diminuir as possibilidades de contaminações de bactérias indesejáveis no processo de produção industrial de probióticos.

A fonte de carbono (lactose ou glúten) afetou a capacidade dessas bactérias em produzirem extratos capazes de degradarem o glúten.

O tempo de coleta dos extratos bacterianos influenciou nas suas capacidades de degradar o glúten.

Os extratos de 12 horas da maioria dessas bactérias foram os que mostraram menores capacidades de degradação do glúten.

Os extratos de 24 horas da maioria dessas bactérias foram os que mostraram maiores capacidades de degradação do glúten.

O maior percentual de degradação de glúten foi de 87,3 % usando o extrato obtido com 24 horas de crescimento da bactéria BLG56 (*Achromobacter* sp.) cultivada em meio de cultura contendo glúten.

Com base na capacidade de degradação, nos tempos de coletas dos extratos bacterianos e meios de cultura, pode-se concluir que as nove bactérias apresentam diferentes proteases capazes de degradarem o glúten.

A capacidade dos extratos degradarem o glúten variou com suas concentrações na solução de formas diferentes e essa característica pode servir como um teste a mais para diferenciar uns dos outros.

São necessários estudos mais detalhados, como o de purificação dos componentes dos extratos dessas bactérias, para avaliar cada uma dessas proteases individualmente, para escolher as de melhores potenciais biotecnológicos.

## BIBLIOGRAFIA

AGGETT, P.J.; AGOSTINI, C.; AXELSSON, I.; EDWARDS, C.A.; GOULET, O.; HERNELL, O. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 36:329-37. 2003.

AHMED, S.; KATTIMANI, L.; DIVATAR, M.; GAJARE, S.; SHIVALEE, A.; FARHEEN, A.; MASARATH IRFANA, M. Optimization of lactase production under submerged fermentation by *Lactobacillus sp.* KLSA 22. **Int. J. Pure App. Biosci.** 4 (4):212-220. 2016.

AKBAR, T.; ZAFAR, M.; KNMIPER, D. Microbial production of protease: isolation and optimization. **International Journal of Science and Research,** 3(7):107-110. 2012.

ALBE, K.R.; BUTLER, M.H.; WRIGHT, B.E. Cellular concentrations of enzymes and their substrates. **J. theor. Biol.** 143: 163-195. 1990.

ALEXANDRE, T.L. **Espectrometria de Raios-X Aliada à Quimiometria no Estudo de Vegetais.** Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. 2007.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M.J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry,** v.33, no 1, p.21-28, 1998.

ALMEIDA, C.P.M. **Efeito do fator concentração nas características de iogurte com baixo teor de lactose obtido por ultrafiltração.** Dissertação. Escola de Engenharia Mauá. Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia. São Caetano do Sul. 2008.

ALMEIDA, E.S.F.; SIGARINI, C.O.; FERREIRA, M.B. Perfil microbiológico de queijo tipo Minas frescal de produção artesanal e inspecionada, comercializado no município de Cuiabá-MT. **Higiene Alimentar.** 2002; 16(92/93): 51-58. 2002.

ALMEIDA, J.F.; LEITÃO, C.H.S.; NASCIMENTO, E.R.; VIEIRA, K.C.M.; ALBERTO, E.M.; PEREIRA, V.L.A. Avaliação físico-química do leite de cabra *in natura* em alguns rebanhos de Minas Gerais e Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.** 2009.

ALTAMINARO, M.M.; BLACKBURN, J.M.; AGUAYO, C.; FERSHT, A.R. Directed evolution of new catalytic using the alpha/beta-barrel scaffold. **Nature,** v. 403, n. 6770, p. 617-622, 2000.

ALVES, V.O. **Avaliação higiênico-sanitária de amostras de queijos minas frescal artesanais comercializados em feiras livres da cidade de Volta Redonda-RJ e suscetibilidade antimicrobiana das estirpes patogênicas isoladas.** Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 2013.

ANJUM, F.M.; KHAN, M.R.; AHMAD, D.; MUHAMMAD, S.; IMRAN, P.; ARSHAD, M.U. Wheat gluten: High molecular weight glutenin subunits-structure, genetics, and relation to dough elasticity, **Journal of Food Science** 72:56-63. 2007.

ANTUNES, A.E.C; OLEJ, B. Intolerância e sensibilidade aos componentes do leite. In: ANTUNES, A.E.C; PACHECO, M.T.B. (Org.). **Leite para Adultos: Mitos e Fatos Frente à Ciência**. São Paulo: Varela, p. 19-42, 2009.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**, AgraFNP, 360p. 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC Nº 12, 02/01/2001**. [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b) (Acesso em 29/09/2017)

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. Módulo IV. Acesso em 16 de Outubro de 2015.

ARAÚJO, W.N.; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVA, A.V.A.F.; SILVEIRA, V.F.; BARROS, S.L.B. Determinação do nível de contaminação por coliformes totais no queijo Minas comercializado na Região Metropolitana de Salvador – Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v. 2, n.1, p. 5-9 , 2001.

ARAÚJO, H. M. C.; ARAÚJO, W. M. C.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutrição**, Campinas, 2393:467-474, 2010.

AURICCHIO, S.; DE RITIS, G.; DE VINCENZI, M.; MINETTI, M.; SAPORA, O.; SILANO, V. Agglutination activity of gliadin-derived peptides from bread wheat: implications for coeliac disease pathogenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 21:428–433. 1984.

AURICCHIO, S.; TRONCONE, R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: WALKER, W.A.; DURIE, P.; HAMILTON, Jr.; WALKER-SMITH, J.A.; WATKINS, J.B. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. Ontario: BC Decker Inc. p. 677-700. 2000.

BACELAR JÚNIOR, A.J.; KASHIWABARA, T.G.B; NAKAOKA, V.Y.; SILVA, E. Intolerância a lactose. Revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. 4(4):38-42. 2013.

BAKKEN, A.P.; HILL Jr.; AMUDSON, C.H. Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized  $\beta$ -Galactosidase Reactor to Hydrolyze the Lactose Constituent of Skim Milk. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 36, n. 3, p. 293-309, 1990.

BARBOSA, F.H.F.; MARTINS, F.S.; BARBOSA, L.P.J.; NICOLI, J.R. Microbiota indigena do trato gastrointestinal. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Aracaju, v. 10, n. 1, p. 78-93, jan./jun. 2010.

BARBOSA, C.R.; ANDREAZZI, M.A. Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. **V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**. Anais Eletrônico. Centro Universitário de Maringá, Paraná. 2010.

BARBOSA, A.F.; LOPES, F.J.; SILVA, V.R.O.; SILVA, M.H.L.; MINIM, V.P.R.; SILVA, R.C.S.N. Aceitação sensorial de iogurte sabor pêssego acrescido de diferentes concentrações de aroma e polpa por meio da técnica de mapa de preferência. **Ver. Inst, Latic. "Cândido Tostes"**, nº390, 68:52-58, 2013.

BARROS, P.C.O.G.; NOGUEIRA, L.C.; RODRIGUEZ, É.M.; CHIAPPINI, C.C.J. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v.18, n.122, p. 57-61, 2004.

BATISTA, D.V.S.; CARDOSO, R.L.; CEDRAZ, K.A.; LIMA, L.C.S; TAVARES, J.T.Q. Aceitabilidade sensorial e caracterização físico-química do iogurte de banana c. Terra. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 10, nº18, p. 50. 2014.

BECCHI, C.S. **Estudo do índice do leite tipo B "in natura" produzido na bacia leiteira do Vale do Taquari, RS**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS. 2003.

BEHMER, M.L.A. Considerações sobre o leite. In: **Tecnologia do Leite**. 10. ed. São Paulo, SP: Nobel S.A., cap 1, p.15-20, 1980.

BEHMER, M.L.A. Leite. In: **Como aproveitar bem o seu leite no sítio ou chácara**. 6. ed. São Paulo, SP: Nobel S.A., cap. 2, p. 74-91, 1984.

BEREKAA, M.M.; BARAKAAT, A.; EL-SAYED, S.M.; EL-AASSAR, S.S. Degradation of Natural Rubber by *Achromobacter* sp. NRB and Evaluation of Culture Conditions. **Polish Journal of Microbiology**. V. 54, n.1, 55-62. 2005.

BERG J.; TYMOCZKO J.; STRYER L. 2002. **Biochemistry**. W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6, 2002.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establishment of indices for the study of phosphate solubilization by soil bacteria. **Ars Pharmaceutica** 17:399-406. (in Spanish). 1976.

BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; MIGUEL-VIRTO, C.; URIBARREN, P.; JUSTE, R.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 990-994, 2001.

BEZERRA, C. **Intolerância x Alergia**. <http://www.medicobrasil.com.br/noticias>. Acessado em 08 de outubro de 2015.

BJÖRKSTÉN, B.; SEPP, E.; JULGE, K.; VOOR, T.; MIKELSAAR, M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 108 (4):516–20. 2001. PMID 11590374. doi:10.1067/mai.2001.118130

BLÜMEL, S.; MARK, B.; BUSSE, H.J.; KÄMPFER, P.; STOLZ, A. Pigmentiphaga kullae gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. **Int J Syst Evol Microbiol** 51: 1867–1871. 2001.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Proteínas e Aminoácidos. In: **Introdução a Química de Alimentos**. 2 ed. São Paulo, SP: Varela, 74-91. 1992.

BORNEMAN J, TRIPLETT EW. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Appl Environ Microbiol**. 1997 Jul;63(7):2647-53.

BRANDT, K.; SAMPAIO, M.; MIUKI, C. Importance of the intestinal microflora. **Pediatria**, Sao Paulo, v. 28, n. 2, p. 117-127, ago./set. 2006.

BRASIL, Legislação, **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, diet, light e enriquecidos**, São Paulo: Fonte Comunicação e editora, p. 47, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Resolução nº5, de 13 de novembro de 2000. Oficializa os Padrões de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 27 dez. Seção 1, p. 9-12. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46**, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 24 out. 2007. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 08 de outubro de 2015.

BROOKE, J.S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. 25:2-41. 2012.

BULHÕES, A.C.S. **Análise molecular do gene da lactose-florizina hidrolase em indivíduos tolerantes e intolerantes à lactose. Dissertação de mestrado**. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2006.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion. Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. Vol. 57:4. 2007.

CARMINATTI, C.A. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CASTRO, M. **Consumo de iogurtes quadruplicou no país na última década. Disponível em [http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2014/09/12/internas\\_economia,568263/consumo-de-iogurtes-quadruplicou-no-pais-na-ultima-decada.shtml](http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2014/09/12/internas_economia,568263/consumo-de-iogurtes-quadruplicou-no-pais-na-ultima-decada.shtml)**. Publicado em 12/09/2014. Acesso em 18 de Novembro de 2015.

CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. *Acta Scientiarum. Agronomy* (Impresso), v. 32 (1), p. 161-169, 2010.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VISCA, P. Burkholderia cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in Microbiology*. Vol. 14, n. 6, p. 277-286, 2006.

COELHO, L.F. **Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas**. Dissertação do Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical. Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, 59 p. 2006.

COLLINS, M.D.; PHILLIPS, B.A.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 39:2:105-108. 1989.

COROZOLLA, W.; RODRIGUES, A. G. **Intolerância à Lactose e Alergia à Proteína do Leite de Vaca. E o desafio de como diferenciá-las.** [http://unifia.edu.br/revista\\_eletronica/revistas/saude\\_foco/artigos/ano2016/021\\_intolerancia\\_lactose\\_alergia.pdf](http://unifia.edu.br/revista_eletronica/revistas/saude_foco/artigos/ano2016/021_intolerancia_lactose_alergia.pdf). Acesso: 22/09/2016.

CORTEZ, M. A. S; CORTEZ, N. M. S. **Qualidade do leite: Boas práticas agropecuárias e ordem higiênica**. Niterói: Ed. UFF, 77p. 2008.

CRESPO PEREZ, L.; VILLASANTE, G.C.; RUIZ, A.C.; LEÓN, F. Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. *European Journal of Internal Medicine*, 23, p. 9-14. 2012.

CUNHA, F.L. **Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e contagem de células somáticas em leite de cabra produzido na região de Nova Friburgo-RJ. Metodologia tradicional versus metodologia eletrônica**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, 2007.

DAS, G.; PRASAD, M.P. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. **International Research Journals of Microbiology**, 1(2):26-31. 2010.

DE GRAAF, A.A.; VENEMA, K. Gaining insight into microbial physiology in the large intestine: a special role for stable isotopes. **Adv Microb Physiol**. 53:73–168. 2007.

DE VOS, P.; TRÜPER, H.G.; TINDALL, B.J. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, Xth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, minutes of the meetings, 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. **Int J Syst Evol Microbiol**. 55:1: 525-532. 2005.

DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos. BRADESCO. **Leite e Derivados. Agosto de 2016**. [www.economiaemmidia.com.br](http://www.economiaemmidia.com.br). Acesso em 21/09/2016

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; LAVERMICOCCA, P.; DE VINCENZI, M.; GIOVANNINI, C.; FACCIA, M.; GOBBETTI, M. Proteolysis by Sourdough Lactic Acid Bacteria: Effects on Wheat Flour Protein Fractions and Gliadin Peptides Involved in Human Cereal Intolerance. **American Society for Microbiology**. Vol. 68, No. 2, 2001.

DICKE, W. **Coeliac disease: Investigation of harmful effects of certain types of cereal on patients with coeliac disease**. University of Utrecht. 1950.

DICKS, I.M.T.; PLESSIS, E.M.; DELLAGLIO, F.; LAUER, E. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the Neotype of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. **Int J Syst Bacteriol**. 46:1: 337-340. 1996.

DOMARESKI, J.L.; BANDIERA, N.S.; SATO, R. T.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; SANTANA, E.H.W. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Archivos latinoamericanos de nutricion**. Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Vol. 60:3, 2010.

DONG, K.; HAO, C.Y.; WANG, A.L.; CAI, M.H.; YAN, Y.M. Characterization of HMW Glutenin Subunits in Bread and Tetraploid Wheats by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Cereal Research Communications** 37:65-72. 2009.

DOOLEY, J.S.G.; ROBERTS, T.A. Control of vegetative micro-organisms in foods. **British Medical Bulletin**, 56(1):142-157. 2000.

DUMOND, P.; MORISSET, M.; SERGEANT, P.; KANNY, G. Allergie alimentaire au lait de vache ou intolerance au lactose? **Journal de Pédiatrie et de Puériculture**. 2006.

EGERT, M.; DE GRAAF, A.A.; MAATHUIS, A.; DE WAARD, P.; PLUGGE, C.M.; SMIDT, H. Identification of glucose-fermenting bacteria present in an in vitro model of the human intestine by RNA-stable isotope probing. **FEMS Microbiol Ecol.** 60:126–35. 2007.

EHOWBRASIL. Qual a função da catalase? Disponível em <[http://www.ehow.com.br/funcao-catalase-sobre\\_6604/](http://www.ehow.com.br/funcao-catalase-sobre_6604/)>. Acesso em: 21 de Outubro de 2015.

ERFCL, Equipo Regional de Fomento y Capacitación de Lechería de la FAO. **Manual de Composición y propiedades de la leche.** Santiago de Chile. 26-45. 1981.

EUZÉBY, J.P.; KURO, T. Corrigenda to the Validation Lists. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 51, p. 1933-1938, 2001.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.568-572, mar-abr, 2006.

FARIAS, F.F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**, v.8, 2004. Disponível em: <<http://www.e-gastroped.com.br/dec04/intolerancia.htm>>. Acesso em: 14 de Outubro de 2015.

FARO, H.C. **Doença celíaca: revisão bibliográfica.** Monografia de Especialização em Pediatria. Hospital Regional da Asa Sul. Brasília, DF. 58p. 2008.

FERNANDEZ-FEO, M.; WEI, G.; BLUMENKRANZ, G.; DEWHIRST, F.E.; SCHUPPAN, D.; OPPENHEIM, F.; HELMERHORST, E.J. The Cultivable Human Oral Gluten-Degrading Microbiome and its Potencial Implications in Celiac Disease and Gluten Sensitivity. **Clin Microbiol Infect.** 19(9):E386-E394, 2013.

FERRAREZE, M.V.G.; LEOPOLDO, V.C.; ANDRADE, D.; SILVA, M.F.I.; HAAS, V.J. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem.** 20(1):7-11. 2007.

FIGUEIREDO, E.A.P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.V.; VILAR, M.C.M.; LOUREIRO, N.G.; PEREIRA, R.G. *Pseudomonas Aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva.** Vol. 19, n. 4, p. 421-427, Outubro-Dezembro, 2007.

FISCHER, J. **Hidrólise de Lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Programa de Pós-graduação em

Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG. 2010.

FODA, M.I.; LOPEZ-LEIVA, M. Continuous Production of Oligosaccharides from Whey Using a Membrane Reactor. **Process Biochemistry**, v.35, n.6, p.581-587. 2000.

FODÉN, R. Adaptation to lactose in lactose malabsorbers – importance of the intestinal microflora. **Scandinavian Journal of Nutrition/Näringsforskning**. Vol 45:174, 2001.

FREITAS, S.S. **Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos**. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) 112p. – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 1994.

FUJIMURA, K.E.; SLUSHER, N.A.; CABANA, M.D; LYNCH, S.V. Role of the gut microbiota in defining human health. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 8(4):435-454, 2010.

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. 2. ed. São Paulo: Globo. 295 p. 1991.

FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Alimentos. Área de Bromatologia. Universidade de São Paulo, SP. 2010.

GEE, S. On the celiac affection. **St Barth Hosp Rep**, 24, p. 17-20. 1888.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M.H. Hydrolysis of Lactose – a Literature Review. **Process Biochemistry**, v.20, n.1, p.2-12. 1985.

GHALY, A.E.; BEN-HASSAN, R.M. Kinetics of Batch Production of Single-cell Protein from Cheese Whey. **Applied Biotechnology**. V. 50, n.1, p. 79-92, 1995.

GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science & Technology**. 16:57-69, 2005.

GOMES, M.J.P. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária**. FAVET-UFRGS. 48p. 2013.

GOLDMAN, D.A.; KLINGER, J.D. Pseudomonas cepacia: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **J. Pediatr**. 108:806–812. 1986.

GOMILA, M.; PRINCE-MANZANO, C.; SVENSSON-STADLER, L.; BUSQUETS, A.; ERHARD, M.; MARTINEZ, D.L.; LALUCAT, J.; MOORE,

E.R.B. Genotypic and Phenotypic Applications for the Differentiation and Species-Level Identification of *Achromobacter* for Clinical Diagnoses. **PLOS ONE**. 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0114356

GORDON, S.R.; STANLEY, E.J.; WOLF, S.; TOLAND, A.; WU, S.J.; HADIDI, D.; BAKER, D.; PULTZ, I.S.; SIEGEL, J.B. Computational design of an  $\alpha$ -gliadin peptidase. **Journal of the American Chemical Society**, 134, p. 20513-20520. 2012.

GRACIA-PAEZ, J.I.; FERRAZ, J.R.; FRANÇA E SILVA, I.A.; ROSSI, F.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. - *Smqnr* variants in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 55(6): 417-20, 2013.

GRACIA-PAEZ, J.I.; FERRAZ, J.R.; FRANÇA E SILVA, I.A.; ROSSI, F.; LEVIN, A.S. & COSTA, S.F. - *Smqnr* variants in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 55(6): 417-20, 2013.

GRANATO, D. Leites fermentados: algumas considerações. **Leite & Derivados**, v.16, n.100, p.16-33, 2007.

GRATA, K.; NABRDALIK, M.; LATALA, A. Effect of different carbon sources on amyolytic activity of *Bacillus* spp. isolated from natural environment. **Proceedings of ECOpole**, 2(2):321-324. 2008.

GRIFFITHS, M.W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp present in milk. **Journal of Food Protection**, v.59, n.9, p.790-792, 1990.

GUARNER, F. Papel de la fl ora intestinal en la salud y em la enfermedad. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 22, n. 2, p. 14-19, maio 2007.

GUARNER, F.; MALAGELADA JUNIOR, R. Gut fl ora in health and disease. **Lancet**, London, v. 8, n. 361, p. 512- 519, feb. 2003. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, v.40, n.7, p. 667-672, jul. 2005.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos do município do Rio Preto da Eva, Amazonas. **Ver. Ciênc. Agrár.** Belém, n. 48, p. 55-70, jul/dez. 2007.

HE, T.; VENEMA, K.; PRIEBE, M.G.; WELLING, G.W.; BRUMMER, R.J.M.; VONK, R.J. The role of colonic metabolism in lactose Intolerance. **European Journal of Clinical Investigation**. Vol38, 541-547. 2008.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**.73(suppl):374S–9S. 2001.

HILL, I.D.; DIRKS, M.H.; LIPTAK, G.S.; COLLETTI, R.B.; FASANO, A.; GUANDALINI, S. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 40:1-19. 2005.

HOBMAN, P.G. Review of Process and Products for Utilization of Lactose in Deproteinad Milk Serum. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2630-2653. 1984.

HUGH, R.; GILARDI, G.L. Pseudomonas. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP (eds) Manual of clinical microbiology, 3rd edn. **American Society for Microbiology**, Washington DC, pp 288–317. 1980.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA. 1994.

HUSAIN, Q. B-Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 30, p. 41-62, 2010.

JAYANI, R.S., SAXENA, S., GUPTA, R. Microbial pectinolytical enzymes: a review. **Process Biochem.**, v.40, p.2931– 2944, 2005.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S. e TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial setor: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

JIN, D.; KONG, X.; LI, Y.; BAI, Z.; ZHUANG, G.; ZHUANG, X.; DENG, Y. Biodegradation of di-*n*-Butyl Phthalate by *Achromobacter* sp. Isolated from Rural Domestic Wastewater. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 12,13510-13522. 2015. DOI:10.3390/ijerph121013510

JULIET, L. C.; FERNANDEZ, V. A. *Stenotrophomonas maltophilia*. **Rev Chilena Infectol**. v. 23, p. 247-8, 2006.

KESKIN, D.; EKMEKÇI, S. Investigation of The Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in Foods and The effect of salt and pH on *P. aeruginosa*. Hacettepe **J. Biol. & Chem.**, 36(1):41-46. 2008.

KHAMBHALA, P.; PALIWAL, P.; KOTHARI, V. Microwave mutagenesis of *Brevibacillus Parabrevis* for enhanced cellulase production, and investigation on thermostability of this cellulase. **bioRxiv BETA**. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1101/064410>

KILBANE, J.J.; CHATTERJEE, D.K.; CHAKRABARTY, A.M. Detoxification of 2,4,5-T from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. **Appl. Environ. Microbiol.** 1983.

KING, E.O.; WARD, M.K. e RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis With na Immobilized  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, n.8, p.583-592. 2000.

LASA, I.; BERENGER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. **Microbiologia**, 9:77-89, 1993.

LERNER, A. New therapeutic strategies for celiac disease. **Autoimmunity Reviews**, 9, p. 144-147. 2010.

LIMA, Carla Daniela de Las Casas. **Avaliação microbiológica e química do queijo minas artesanal da Serra do Salitre-MG**. Tese (Doutorado em Microbiologia do Instituto de Ciências biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais. 2005.

LOMER, M.C.E.; PARKES, G.C.; SANDERSON, J.D. Reviewarticle: I lactose intolerancein clinicalpractice–mythsandrealities. **Aliment PharmacolTher**. 27, 93–103. 2007.

LOPES, R.R.S.; SABRA, A.; CABRAL, G.C.; RODRIGUES, G.; SABRA, S; SABRA, A. **Prevalência de intolerância à lactose em pré-escolares e escolares no município de Duque de Caxias**. 6ª Mostra Acadêmica Unimep, 2008.

LOPES, D.C.F. **Desenvolvimento de Bebida Láctea Adicionada de Ácido Linoléico Conjugado e Ensaio Clínico em Mulheres Obesas**. Dissertação. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte. 2010.

MADIGAN, M.T.; OREN, A.; Thermophilic and halophilic extremophiles. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2, 265-269, 1999.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo Prentice Hall, 608p. 2004.

MAGALHAES, F. M. M. ; MOREIRA, F. M. S. ; BALDANI, J. I. ; SOUTO, S. M. ; KUYKENDALL, J. R. ; DOBERERINER, J. . A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Brasil, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGALHAES, F. M. M. ; MOREIRA, F. M. S. ; DOBEREINER, J. . Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 15, n.4, p. 246-252, 1984.

MALAJOVICH, M.A. [www.bteduc.bio.br/guias/58\\_Caracterizacao\\_morfologica\\_de\\_colonias\\_microbianas.pdf](http://www.bteduc.bio.br/guias/58_Caracterizacao_morfologica_de_colonias_microbianas.pdf). Acessado em 06/10/2015.

MAPA. **Laboratório Nacional Agropecuário. Determinação de glicídios redutores em lactose pelo Método de Lane-Eynon em Leite.** Código: MET POA/19/01/01. Pág. 1-7, 2013.

MARAFON, A.P. **Otimização das propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em tecnologia bioquímico-farmacêutica. Área de Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2010.

MASOTTI, F.; DE NONI, I.; CATTANEO, S.; BRASCA, M.; ROSI, V.; STUKNYTE, M.; MORANDI, S.; PELLEGRINO, L. Occurrence, origin and fate of pyroglutamyl-  $\gamma$ -casein in cheese. **International Dairy Journal.** 33:90-96, 2013.

MATHIESON, I.; LAZARIDIS, I.; ROHLAND, N.; MALLICK, S.; PATTERSON, N.; ROODENBERG, S.A.; HARNEY, E.; STEWARDSON, K.; FERNANDES, D.; NOVAK, M.; SIRAK, K.; GAMBA, C.; JONES, E.R.; LLAMAS, B.; DRYOMOV, S.; PICKRELL, J.; ARSUAGA, J.L.; CASTRO, J.M.B.; CARBONELL, E.; GERRITSEN, F.; KHOKHLOV, A.; KUZNETSOV, P.; LOZANO, M.; MELLER, H.; MOCHALOV, O.; MOISEYEV, V.; GUERRA, M.A.R.; ROODENBERG, J.; VERGÈS, J.M.; KRAUSE, J.; COOPER, A.; ALT, K.W.; BROWN, D.; ANTHONY, D.; LALUEZA-FOX, C.; HAAK, W.; PINHASI, R.; REICH, D. Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. **Nature.** 2015. DOI: 10.1038/nature16152

MATTAR, R.; MAZO, D.F.C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Ver. Assoc. Med. Bra.** 56:2:230. 2010.

MCGOUGH, N.; CUMMINGS, J.H. Coeliac disease: a diverse clinical syndrome caused by intolerance of wheat, barley and rye. **Proc Nutr Soc** 64:434-50. 2005.

MEIRINHO, S.G. **Aplicação de um sistema de multi-sensores para a detecção de gliadinas: discriminação semi-quantitativa entre alimentos com glúten e sem glúten.** Dissertação. Escola Superior Agrária de Bragança. 2009.

MENDES, F.R.; LEANDRO, N.S.M.; ANDRADE, M.A.; CAFE, M.B.; SANTANA, E.S.; STRINGHINI, J.H. Qualidade bacteriológica de ovos contaminados com *Pseudomonas aeruginosa* e armazenados em temperatura ambiente ou refrigerados. **Cienc. Anim. Bra.** V.15, n.4, p.444-450, Goiânia, out/dez. 2014. DOI: 10.1590/1089-6891v15i431244

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

MENNA, P.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59:2934-2950, 2009.

MIORANZA, T.M.; MÜLLER, M.A.; KUHN, O.J. *Pseudomonas*: principais características e espécies fitopatogênicas. **Journal of Agronomic Sciences.** V.3, n. especial, p. 74-85, Umuarama. 2014.

MINELLI-OLIVEIRA, C. **Caracterização das amilases produzidas por isolados de rizóbios e mutantes de *Bacillus* sp. provenientes de solos amazônicos.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, 100p. Junho de 2013.

MOBASSALECH, M.; MONTGOMERY, R.H.; BILLER, J.A.; GRABD Jr. Deselopment of Carbohydrate dosorption in the fetus and neonate. *In*: FEBERBAUM, R.; FALCÃO, M. **Nutrição de Recém Nascido.** São Paulo. Ed. Atheneu, p. 42. 2003.

MONT-SERRAT, C.; HOINEFF, C.; MEIRELLES, R.M.R.; KUPFER, R. Diabetes e Doenças Auto-Imunes: Prevalência de Doença Celíaca em Crianças e Adolescentes Portadores de Diabetes Melito Tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 52/9. 2008.

MONTGOMERY, R.; BÜLLER, H.A.; RINGS, E.H.H.; GRAND, R.J. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. **FASEB J.**1991.

MORAES, F.C. **Estudo da patogenicidade de isolados de *Burkholderia* sp e *Stenotrophomonas maltophilia* em amostras clínicas.** Dissertação do Programa de Mestrado em Biologia Parasitária da Universidade CEUMA. São Luís, 72 p. 2014.

MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Influência b-Galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. **Arq. Ciências saúde UNIPAR**, Paraná, v. 4, n. 3, p. 283-290, set./dez. 2000.

MORÓN, B.; CEBOLLA, Á.; MANYANI, H.; ÁLVAREZ-MAQUEDA, M.; MEGÍAS, M.; THOMAS, M.C.; LÓPEZ, M.C.; SOUSA, C. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. **Am. J. Clin. Nutr.** 87:405–14. 2008.

MUKHERJEE, P.; ROY, P. 2016. Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. **Front. Microbiol.** 7:967, 14p. 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00967.

MOUSSA, T.A.A.; MOHAMED, M.S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN.

**Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 31, n. 4, pp. 867-880, october-december. 2014. doi.org/10.1590/0104-6632.20140314s00002473

MUNDO EDUCAÇÃO. <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica.htm>. (Acesso em 13 de Janeiro de 2016).

NAJAFI, M.F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**, 8(2):197-203. 2005.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4ª edição. 2005.

NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Bras. Patol. Med. Lab.**, 47(4):409-420. 2011.

NICODEMO, A.C.; GARCIA-PAEZ, J.I. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. **Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis.** 26:229-237. 2007. DOI 10.1007/s10096-007-0279-3

NICHOLSON, W.L. Roles of Bacillus endospores in the environment. **Cell Mol Life Sci** 59:410–416. 2002.

NOVIK, G.; SAVICH V.; KISELEVA, E. An insight into beneficial *Pseudomonas* bacteria. In: Shah, M.M. editor, Microbiology in agriculture and human health. **INTECH**, p. 73-105. 2015.

NYČ, O.; MATĚJKOVÁ, J. *Stenotrophomonas maltophilia*: Significant Contemporary Hospital Pathogen – review. **Folia Microbiol.** 55(3), 286-294. 2010.

OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; IBORRA, J.L.; MANJÓN, A. Beta-galactosidase Immobilization for Milk Lactose Hydrolysis: A simple experimental and modelling study of batch and continuous reactors. **Biochemical Education**, v.28, n3, p.164-168. 2000.

OKSANEN P, SALMINEN S, SAXELIN M, HÄMÄLÄINEN P, IHANTOLA-VORMISTO A, MUURASNIEMI-ISOVIIITA L, NIKKARI, S.; OKSANEN, T.; PORSTI, I.; SALMINEN, E. Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus* GG. **Ann. Med.** 22(1):53-56. 1990.

OKURA, M.H. **Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal comercializados na região do triângulo mineiro**. Tese. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. 2010.

OLIVEIRA, L.A. DE; MAGALHÃES, H.P. de. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.203-208, 1999.

OLIVEIRA, A.N. **Characterization of amylase and protease produced by indigenous central Amazonian rhizobia strains.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 150pp, 2006.

OLUWAFEMI, F.; IBEH, I.N. Microbial contamination of seven major weaning foods in Nigeria. **J. Health Popul. Nutr.** 29(4):415-419. 2011.

PAIXÃO, L.A.; CASTRO, F.F.S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde.** Brasília. v.14, n.1, p. 85-96, 2016. DOI: 10.5102/ucs.v14i1.3629

PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOUPOLOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v.23, n.4, p.333-339, 1973.

PALLERONI, N.; BRADBURY, J. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. **Int J Syst Bacteriol.** 43(3): 606–9. 1993.

PALLERONI, N. J. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: CORNELIS, P. ***Pseudomonas, genomic and molecular biology.*** Caister Academic Press, 2008.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.; GOMES, E.; Da Silva, R. Purification and characterization of two beta-glucosidases. **Folia Microbiol.** 47, 685, 2002.

PALMU, P.S.T. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo.** Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003.

PANDA, A.K.; BISHT, S.S.; DEMONDAL, S.; KUMAR, N.S.; GURUSUBRAMANIAN, G.; PANIGRAHI, A.K. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. **Antonie van Leeuwenhoek.** 105:623-639. 2015. DOI 10.1007/s10482-013-0099-7

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PAULLEY, J.W. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhea; jejunal and lymph-node biopsies. **British Medical Journal.** p. 1318-1321. 1954.

PERATI, P.; BORBA, B.; ROHRER, J. Determination of Lactose in Lactose-Free Milk Products by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. **Thermo Fischer Scientific**, Sunnyvale, CA, USA. 2014.

PEREIRA, B.G. **Estrutura de comunidades bacterianas em solos sob cultivo de frutíferas na Amazônia Central, Brasil.** 2010. Dissertação

(Agricultura no Trópico Úmido) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

PEREIRA, M.L.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo “tipo Minas”. **Rev Microbiol.**, 22: 349-50. 1991.

PEREIRA, R. B. **Caracterização microbiológica de alguns tipos de queijos regionais brasileiros**. Monografia (Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas). – Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.

PICARELLI, A.; DI TOLA, L.; SABBATELLA, M.; GRECO R.; SILANO, M.; DE VINCENZI, M. Amino acid sequence of the  $\alpha$ -gliadin induces anti-tiendomysial antibody production during *in vitro* challenge. **Scand. J. Gastroenterol.** 34:1099–1102. 1999.

PIETZAK, M.M. Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance with treatment. **Gastroenterology**. 128:135-141. 2005.

PINTO, P.S.A.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Queijo minas: problema emergente de Saúde Pública. **Higiene Alimentar**, v. 10, p. 22-27, 1996.

PLANALTO DO GOVERNO. **Lei N° 10.674. de 16 de maio de 2003**. [www.planalto.gov.br/ccivil\\_3/leis/2003/L10.674.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_3/leis/2003/L10.674.htm). Acesso em 23 de setembro de 2016.

PRABAKARAN, V.; SOMA PRABHA, A.; BLESSY THAYALIN, T. S. Screening and production of protease enzyme from marine microorganism and its industrial application. **IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry**, 1(4):33-41. 2015.

PRAMILA, R.; PADMAVATHY, K.; RAMESH, K.V.; MAHALAKSHMI, K. *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis* - Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). **Journal os Bacteriology Research**. V. 4(1), p.9-14, march 2012. DOI:10.5897/JBR12.003 ISSN 2006- 9871 ©2012 Academic Journals

PRATESI R, GANDOLFI L. Doença celíaca: a afecção com múltiplas faces. **J Pediatr**. 81:357-8. 2005.

PRESCOOT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology 6<sup>th</sup> edition**. Published by McGraw-Hill Science/Engineering/Math Hardcover Unknown Binding – March 2, 2004

QUAGLIA, G.; MATEOS-NEVADO, B. **Ciencia y Tecnologia de la Panificación**. Acribia. 1991.

QUINTANA, R.C.; CARNEIRO, L.C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do queijo Minas Frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos, GO. **Rev. Bras. Saúde. Prod. An. Local**, v.8, n.3, p.205-211, jul./set., 2007.

RADZICKA, A.; WOLFENDEN, R., "A proficient enzyme.", **Science**, 6(267), p. 90-93, 1995.

RIBEIRO, M.C., METZGER, J.P., MARTENSEN, A.C., PONZONI, F., HIROTA, M.M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142, 1141–1153. 2009.

RICHARD, G.C. Oxidative Stress and Aging: Catalase Is a Longevity Determinant Enzyme. **Rejuvenation Research**.8:138-140. 2005.

RICHMOND, M.L.; GRAY, J.I.; STINE, C.M. Beta-Galactosidase – Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.0, p.1759-1771. 1981.

RISTENPART, W.D.; WAN, J.; STONE, H.A. Enzymatic reactions in microfluidic devices: Michaelis-Menten Kinetics. **Anal. Chem.** 80:3270-3276. 2008.

RODRIGUES, F.S. **Análise Filogenética de Bactérias Rizosféricas de duas Espécies Frutíferas da Amazônia Central Usando a Técnica de Sequenciamento do Gene 16SrDNA**. 2008. Dissertação (Agricultura no Trópico Úmido) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

RODRIGUES, L.S.; DI DIOLA, T.S.R.; ROSSI, F. *Stenotrophomonas maltophilia*: resistência emergente ao SMX-TMP em isolados brasileiros. Uma realidade? **J. Bras. Patol. Med. Lab.** V.47, n.5, 511-517. Outubro 2011.

RODRIGUES, A.S.M. **A Doença Celíaca: etiopatogenia, diagnóstico, aspectos clínicos e tratamento**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, 75p. 2013.

ROWAT, A.C.; ROSENBERG, D.; HOLLAR, K.A.; STONE, H.A. The Science of Pizza: The Molecular Origins of Cheese, Bread, and Digestion Using Interactive Activities for the General Public. **Journal Food Science Education**. Vol. 9, 2010.

RUSYNYK, R.A.; STILL, C.D. Lactose intolerance. **J Am Osteopath Assoc**. 2001.

SAAD, S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Tocantins, v. 42, n. 1, p. 1-16, jan./mar. 2006. doi: 10.1590/S1516-93322006000100002.

SABRA, A.; WILLS, A. Diarréia Osmótica por Hidratos de Carbono. In: Sabra, A. **Diarréia Aguda e Crônica em Pediatria**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica. p. 48-68. 1994.

SAID, S.; PIETRO, R. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. In.: Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa**, p. 1-7, 2004.

SANTOS, R.; VARAVALHO, M. A importancia de probiotico para o controle e/ou reestruturacao da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, Sao Paulo, v. 4, n. 1, p. 40-49, jan. 2011.

SAPATA, F.F.; RUSSO, L.G.; ABREU, T.Q.; SILVA, W.A.; GONÇALVES, F.B. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais, coliformes a 45° C e *Escherichia coli*, em queijo Minas Frescal. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 22, n. 165, p. 75-81. out, 2008.

SAVOIA, D.; ZUCCA, M. Clinical and Environmental *Burkholderia* Strains: biofilm production and intracellular survival. **Current Microbiology**. 54:440. Junho de 2007.

SCHILLINGER, U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. **Int J Food Microbiol**. 47:79-87. 1999.

SDEPANIAN, V.L.; MORAIS, M.B; FAGUNDES-NETO, U. Doença celíaca: a evolução dos conhecimentos desde sua centenária descrição original até os dias atuais. **Arq Gastroenterol**. 36(4):244-57. 1999.

SDEPANIAN, V.L.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Doença celíaca: avaliação da obediência à dieta isenta de glúten e do conhecimento da doença pelos pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil (ACELBRA). **Arq Gastroenterol**. 38(4):232-9. 2001.

SEGEL, I.H. **Enzyme Kinetics**: Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. New York: John Wiley and Sons, 1993.

SENO, E. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. **J Hosp Infect** 57:1–7. 2004.

SHAHEEN, M.; SHAH, A.A.; HAMEED, A.; HASAN, F. Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* bs1. **Pak. J. Bot.**, 40(5):2161-2169. 2008.

SHAN, L.; MOLBERG; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, G.M.; SOLLID, L.M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, 297, p. 2275-2279. 2002.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; KOMAGATA, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **Int J Syst Bacteriol** 46:939–946. 1996.

SHUKLA, H. Lactose intolerance in health and disease. **Nutr Food Sci.**2:66-70. 1997.

SIDDIQUI, Z; OSAYANDE, M.D. Selected Disorders of Malabsorption. **Primary Care Clin. Office Practice.** 38:395-414. 2011.

SILVA, A.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**, 53:68–71 DOI: 10.1007/s00284-005-0431-1. 2006.

SILVA, H.G.C. **Qualidade do leite de vaca: microbiologia, resíduos químicos e aspectos de saúde pública.** Monografia de conclusão da especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, Campo Grande. 2009

SILVA, A.I.D.; PEREIRA, F.J.C.; BEIRÃO, M.C.R.V.; GOMES, M.R.F.S.; MOURA, P.C., PORFÍRIO, P.A.; FERNANDES, P.D.L. **Produção de iogurte.** Projeto FEUP. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. 2010.

SILVA, R.P. **Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA.** Dissertação. Universidade de São Paulo, SP. 2010a.

SILVA, L. C.; MACHADO, T. B.; SILVEIRA, M. L. R.; ROSA, C. S. da; BERTANGNOLLI, S. M. M. Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria – RS. **Disc. Scientia.** Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-120, 2012.

SILVA-FILHO, L.V.R.F.; FERREIRA, F.A.; REIS, F.J.C.; BRITTO, M.C.A.; LEVY, C.E.; CLARK, O.; RIBEIRO, J.D. Infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística: evidências científicas sobre o impacto clínico, diagnóstico e tratamento. **J. Bras. Pneumol.** 39(4):495-512. 2013.

SILVA, M.V.V.; COIMBRA, V.C.S.; NETO, S.V.C.; VASCONCELOS, A.F.F.; FERREIRA, A.M.P.; SILVA, I.P. **Determinação do teor de lactose em leite flúido pelo método Lane-Eynon.** 54<sup>o</sup>- Congresso Brasileiro de Química. Natal;Rio Grande do Norte. 2014.

SORENSEN, R.; NOVAK, N. The Use of Michaelis-Menten Kinetics in Cell Biology and Physiology Teaching Laboratories. **Biochemical Education.** v. 24, n.1, p. 26-28, 1996.

SOLLID, L.M.; KHOSLA, C. Novel therapies for coeliac disease. **Journal of Internal Medicine**, 269, p. 604-613. 2011.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido.** Dissertação de

Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 178 p. 2005.

SPIPKER, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. Identification and distribution of *Achromobacter* species em cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**. 12:298-301. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.10.002>

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.D.; KÄMPFER, P. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Int J Syst Evol Microbiol** 52:1043–1047. 2002.

STANIER, R.Y. Grupos importantes de eubactérias unicelulares. In: **Mundo dos Micróbios**. Cap.18, 1969.

STURMER, E.S.; CASASOLA, S.; GALL, M.C.; GALL, M.C. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** 27(4):264-272. 2012.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yogur Ciencia y Tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 368p. 1991.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology**. 3.ed. Cambridge, New York: CRC, 791p. 2007.

TAVARES, J.T.Q.; CARDOSO, R.L.; COSTA, J.A.; FADIGAS, F.S.; FONSECA, A.A. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Quim. Nova**, vol. 33, No. 4, 805-809, 2010.

TEICHMANN, I. M. **Tecnologia culinária**. 2 ed. 364p. Caxias do Sul, RS. Educs, 2009.

TÉO, C.R.P.A. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Ciências saúde UNIPAR**, Paraná, v. 6, n. 3, p. 135-140, set./dez. 2002.

TEVES, P.M.; MEDINA, J.S.; ESPINOZA, Z.I.G. Análisis de la prueba de tolerancia a la lactosa. **Rev. Gastroenterol Peru**, Lima, v. 21, n. 4, oct./dic. 2001.

**The Catalytic Site Atlas at The European Bioinformatics Institute** (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>) (Acesso em 14 de Outubro de 2015).

TOMASINI, R.G.A.; AMBROSI, I. Aspectos econômicos da cultura de trigo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 59-84. 1998.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre. 934 p. 2012.

UEDA, K.; SEKI, T.; KUDO, T.; YOSHIDA, T.; KATAOKA, M. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **J. Bacteriol.**, 181, 78-82, 1999.

UGGIONI, P.L.; FAGUNDES, R.L.M. Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos. **Hig. Aliment**, São Paulo, v. 21, n. 140, p. 24-29, abril 2006.

VAN DE KAMER, J.H. Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. **Acta Paediatrica**, 42, p. 223-231. 1953.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; CONYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LI PUMA, J.J. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacea* complex bacteria, may confound test results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. Amsterdam, v.33, p.143-149. 2002.

VARAVALLO, M.A.; THOMÉ, J.N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 29(1):83-104. 2008.

VASLSECHI, O.A. **O leite e seus derivados**. Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal. Departamento de tecnologia agroindustrial e socioeconomia rural. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de São Carlos. Araras, SP. 2001.

VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la lche**. Espanha (Zaragoza) Editorial Acribia, 288-291, 1988.

VESA, T.H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. Lactose intolerance. **J Am Coll Nutr**. 2000.

VICENTE, J. **Determinação da Incerteza Expandida Associada à Análise de Açúcares Redutores pelo método de Lane-Eynon**. Dissertação. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2010.

VIEIRA, K.P.; LEDESMA, M.M.; ROSA, C.M.; HASSEGAWA, R.H. Contaminação de queijo Minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde **ConScientiae Saúde**, 7(2):201-206. 2008.

VILATI, M. **Alimentos sem lactose proporcionam vida saudável aos intolerantes. Produtos diferenciados, com mais qualidade e sabor, são atrativos para quem não pode consumir derivados do leite**. (<http://www.portalsatc.com/site/interna.php>) (Acesso em 16 de Outubro de 2015) Publicado em 26 de Março de 2014.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook, 15. London), 164 p., 1970.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **Int Dairy J.** 10(4):271-5. 2000.

VOGEL, F. **Genética Humana: Problemas e abordagens.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 508- 511 p. 2000.

WALL, R.; ROSS, R.P.; RYAN, C.A. Role of gut microbiota in early infant development. **Clinical Medicine: Pediatrics,** Auckland, v. 3, p. 45-54, mar. 2009.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins, **Food Microbiology** 24:115–119. 2007.

WINN, W.JR.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.; SCHRECHENBERGER, P.C.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico 6<sup>a</sup>** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

WOJKOWSKA-MACH, J.; BULANDA, M.; ROZANSKA, A.; KOCHAN, P.; HECZKO, P.B. Hospital-acquired pneumonia in the intensive care units of Polish hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 27(7): 784-6. 2006.

XUEMEI LI; ZHOU, Q.Z.K.; CHEN, X.D. Pilot-scale lactose hidrolisis using  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton fabric. **Chemical Engineering and Processing.** v. 46, p. 497-500, 2007.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiol Immunol.** 37(4):335. 1992.

YANG, S.; OKOS, M.R. Effects of Temperature on Lactose Hydrolysis by Immobilized Beta-Galactosidase in Plug-Flow Reactor. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 33, n. 7, p. 873-885. 1989.

YOUNG, J. M. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. **Journal of Plant Pathology,** v.92, n.1, p.S1.5-S1.14, 2010.

ZEGARRA, J.J.Q.; BOTTEON, R.C.C.M.; OLIVEIRA, B.C.R.S.; BOTTEON, P.T.L.; SOUZA, M.M. Pesquisa de microrganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira,** v.10, n.1, p. 312-321. 2009.

# ANEXOS

## ANEXO 1. SEQUÊNCIAS DAS BACTÉRIAS

### BLG01

AAGATTCCCTATTATTCTTCTTGTGGGCAGCAGTGGGGATTATTGGCCAATGGG  
CGAAA  
TCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTT  
TAAGT  
TGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAA  
GCAC  
CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCG  
GAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGG  
CTCAAC  
CTGGGAACTGCATCCAAAAGTGTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATT  
TCCTG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCA  
CCTGGA  
CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  
GAGGAA GTCCCA

RDP » » domain Bacteria (1)  
» » » phylum "Proteobacteria" (1)  
» » » » class Gammaproteobacteria (1)  
» » » » » order Pseudomonadales (1)  
» » » » » » family Pseudomonadaceae (1)  
» » » » » » » unclassified\_Pseudomonadaceae (1)

### BLG02

GCGGAAGATTCCCTTTATTCTTTTCCTGAGCCGCCGTAGGGAATCATTGCCATG  
GACGA  
AAGTCTGAAGCAGCACCGCCGCGTGAAGTGGTGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAGCTC  
TTTTG  
TTAGGGAAGAACAAGCACCGTTCGAATACGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA  
GAAAG  
CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTGGCAAGCGTTGT  
CCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAACCCCC  
GGCTC  
AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG  
AATTCC  
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA  
CTCTCT  
GGTCTGTAAGTACCCTAAGGACCAAAGGCGGGGGAGCAAACAGGATTAA

RDP » » domain Bacteria (1)  
» » » phylum Firmicutes (1)  
» » » » class Bacilli (1)  
» » » » » order Bacillales (1)  
» » » » » » family Bacillaceae 2 (1)  
» » » » » » » unclassified\_Bacillaceae 2 (1)

**BLG06**

TACTCCTATACGGGGCAGCAGTGGGTAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC  
CAGCC  
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA  
AGGGC  
AGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACT  
TCGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG  
TAAAGC  
GCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA  
CTGCAT  
CCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGG  
TGAAA  
TGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATAC  
TGACAC  
TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAAAGGATTAGATACCGAGGATAGTCC

RDP » » domain Bacteria (1)  
» » » phylum "Proteobacteria" (1)  
» » » » class Gammaproteobacteria (1)  
» » » » » order Pseudomonadales (1)  
» » » » » » family Pseudomonadaceae (1)  
» » » » » » » unclassified\_Pseudomonadaceae (1)

**BLG16**

CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGT  
GGGTGA  
AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAA  
TACCC  
GGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGC  
CGCGGT  
AATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGT  
GGTCG  
TTTAAGTCCGTTGTAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGG  
GCGAC  
TAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAG  
ATCAGG  
AGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACG  
AAAGCG TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCGGGGTTAGTCCC

RDP » » domain Bacteria (1)  
» » » phylum "Proteobacteria" (1)  
» » » » class Gammaproteobacteria (1)  
» » » » » order Xanthomonadales (1)  
» » » » » » family Xanthomonadaceae (1)  
» » » » » » » genus *Stenotrophomonas* (1)  
99% de semelhança com *Stenotrophomonas maltophilia*

**BLG23**

GGACTATCCCGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGT  
CAGTA  
TCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTCA  
CCGC  
TACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCA  
GTTC

CCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTGCTGAACCACCTACGCGCGCTT  
TACGC  
CCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGA  
AGTTA  
GCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCT  
TCCT  
CCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCT  
GGATC AGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCT

RDP

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum "Proteobacteria" (1)
- » » » » class Gammaproteobacteria (1)
- » » » » » order Pseudomonadales (1)
- » » » » » » family Pseudomonadaceae (1)
- » » » » » » » genus Pseudomonas (1)

### **BLG25**

TACTCCTACGGGGGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT  
CCAGCC  
ATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGAAAGA  
AATCC  
AGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAAC  
TTCGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTACTCGGAATTACTGGGCG  
TAAAGC  
GTGCGTAGGTGGTCTTTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAC  
TGCAT  
TGGATACTGGGCAACTAGAGTGTGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAG  
TGAAA  
TGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACAC  
TGACAC  
TGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCC

RDP

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum "Proteobacteria" (1)
- » » » » class Gammaproteobacteria (1)
- » » » » » order Xanthomonadales (1)
- » » » » » » family Xanthomonadaceae (1)
- » » » » » » » genus Stenotrophomonas (1)

### **BLG28**

GACTTCGGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAA  
GGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTACGGTAGAACAAGTGCTAGTTG  
AATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTAC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT  
TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA  
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG  
AGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGG  
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCAACGG

RDP

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum Firmicutes (1)
- » » » » class Bacilli (1)
- » » » » » order Bacillales (1)
- » » » » » » family Bacillaceae 1 (1)
- » » » » » » » genus Bacillus (1)

**BLG33**

TCCTACGGGAGTCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA  
GCCATG  
CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGG  
GCAGT  
AAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCG  
TGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA  
AGCGCG  
CGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG  
CATCCA  
AACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGA  
AATGC  
GTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGA  
CACTGA  
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

RDP

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum "Proteobacteria" (1)
- » » » » class Gammaproteobacteria (1)
- » » » » » order Pseudomonadales (1)
- » » » » » » family Pseudomonadaceae (1)
- » » » » » » » genus Pseudomonas (1)

**BLG38**

GGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTT  
CCCT  
AACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTGCTCCGTC  
AGACT  
TTCGTCCATTCTGAAGATTCTACTCCTACGGGAGGTAGCAGTAGGGAATCTTCCGC  
AATGG  
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA  
AACTCT  
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTA  
ACCAG  
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTATCC  
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  
CCACG  
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAA  
GTGGAA  
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGACT  
TTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA

GATACC  
CTGGTAGTCC

RDP

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum Firmicutes (1)
- » » » » class Bacilli (1)
- » » » » » order Bacillales (1)
- » » » » » » unclassified\_Bacillales (1)

**BLG45**

GGACTACCCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGT  
CAGTA  
TTGGCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTC  
ACTGC  
TACACGTGGAATTCACCCCCCTCTGCCATACTCCAGCGCTGCAGTCACCAATGC  
AGTTC  
CCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCGGTCTTACAGCACCGCCTGCGCACGCTT  
TACGC  
CCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT  
AGTTA  
GCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCCACCAGGGGTATTGGCCCCGATGAT  
TTCTT  
TCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATTGCT  
GGATC  
AGGGTTGCCCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG

RDP

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum "Proteobacteria" (1)
- » » » » class Betaproteobacteria (1)
- » » » » » order Burkholderiales (1)
- » » » » » » family Burkholderiaceae (1)
- » » » » » » » genus Burkholderia (1)

**BLG52**

TTAGCTGTGGCTTCTCGTCAGGTACCGTCAAGGTACCGGCCCTATTCGAACGGC  
ACGTG  
TTCGTCCCTGACAACAGAACTTTACAATCCGAAGACTTTCATCGTTCACGGGGCGT  
TGCT  
CCATCAGACTTTCGTCCATTGTGAAAATTTATCCTTCCGGGATGCAGCAGTAGGGA  
AATT  
TTCCACAAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCT  
TCGGA  
TTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTGCCGTTTGAATAGGGCGGTACCT  
GGACG  
GTACCTGACAAGAAAGCCACGGCAAATTACGTGCCACCAGCCGCGGTAATACATA  
GGTGG  
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAATTC  
TGGTG  
TTAAAGCCCGGAGCTCACCTCCGGTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCAAGAGTGCA  
GAAGA  
GGAAAGCGGTATTCCACGTGTACCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC

CAGTGG  
CGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAG  
GATTAGATACCCTGGGTAGTCC

RDP

» » domain Bacteria (1)  
» » » phylum Firmicutes (1)  
» » » » class Bacilli (1)  
» » » » » order Bacillales (1)  
» » » » » » unclassified\_Bacillales (1)  
98% de semelhança com *Brevibacillus parabrevis*

### BLG56

TAGCTGTGGCTTTCTGGTAAGGTACTGTCAAGGTACGGGCCAGTTATTAAGGTAC  
TTGTT  
TTTCCCTTACAAAAGAGTTTTACGATCCGAAATCCTTTTTCACTCCCGCGGGCGGN  
GTCC  
TTCAGACNCTCGCCANNGCGAAGTTTTTACTCCTACCGGGGGGCAGCAGTGGG  
GAATTT  
TGGACAATGGGGGAAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTGTGATGAAGGCCTT  
CGGGTT  
GTAAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAAAGTCGTGGGTTAATACCCCGGAATCTGA  
CGGTA  
CCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
GTGCAA  
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGTAAGA  
TGTGA  
AATCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTTAACTACCGGGACTAGAGTGTGTC  
AGAG  
GGAGGTGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACC  
GATGGC  
GAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGAGCA  
AACAGG  
ATTAGATACCCTGGGTAGTCC

RDP

» » domain Bacteria (1)  
» » » phylum "Proteobacteria" (1)  
» » » » class Betaproteobacteria (1)  
» » » » » order Burkholderiales (1)  
» » » » » » family Alcaligenaceae (1)  
» » » » » » » unclassified\_Alcaligenaceae (1)  
97% de semelhança com *Achromobacter* sp.

### BLG73

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTC  
AGTTA  
CAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCA  
CCGCT  
ACACGTGGAATTCCAATCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACC  
CTCC  
CCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTT  
TACGCC

CAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA  
GTTAG  
CCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTG  
TTCTT  
CCCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCT  
CCGTC  
AGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTAGGGA  
ATCTT  
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAACACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCG  
GATCGT  
AAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGAATAAGGCGGGTCCTTGACG  
GTCCC  
TAACCAAAGCCAGGCCAAATACGTGCCACCGCCGCGTAATACCTAAGGTGGC  
AAGCTT  
TGTCCGGAATTTTTGGG

RDP

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum Firmicutes (1)
- » » » » class Bacilli (1)
- » » » » » order Bacillales (1)
- » » » » » » family Bacillaceae 2 (1)
- » » » » » » » unclassified\_Bacillaceae 2 (1)