

ELIANA DOS SANTOS LEANDRO

**DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA AO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DE
ESTIRPES DE *Lactococcus lactis* DE ECOSISTEMAS DISTINTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

L437d
2013

Leandro, Eliana dos Santos, 1977-

Diversidade e resistência ao processo de liofilização de
estirpes de *Lactococcus lactis* de ecossistemas distintos / Eliana
dos Santos Leandro. – Viçosa, MG, 2013.
x, 72f. : il. ; 29cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Lactococcus lactis*. 2. Bactéria do ácido láctico.
3. Antioxidantes. 4. Secagem por congelamento. 5. Stress
(Fisiologia). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.35

ELIANA DOS SANTOS LEANDRO

DIVERSIDADE E RESISTÊNCIA AO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Lactococcus lactis* DE ECOSISTEMAS DISTINTOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2013

Dra. Graciela Kunrath Lima

Prof. Odilon Gomes Pereira

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)

Prof^a. Poliane Alfenas Zerbini
(Coorientadora)

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

Aos meus pais, Paulo e Livia

A minha irmã, Adriana

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortificar diante de todos os obstáculos, pelas oportunidades que a vida me reservou e por me conceder o que há de mais valioso, minha família.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela formação e pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Paulo e Lívia pelos ensinamentos da vida, imenso amor, incentivo, dedicação e por não medirem esforços para me ajudar.

À professora Célia Alencar de Moraes a minha gratidão pela orientação, confiança, atenção, incentivo e pelos ensinamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho pelo incentivo, atenção, aconselhamento, amizade e força nos momentos mais difíceis.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges pela atenção e sugestões.

À professora Poliane Alfenas Zerbini pela orientação durante a realização dos experimentos.

Ao professor Hilário pelas sugestões e pela atenção.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia que contribuíram para a construção do meu conhecimento.

À Dra Graciela Kunrath Lima, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da UFMG pela ajuda nas análises no citômetro de fluxo.

Ao Cláudio José Borela Espescht pela atenção e sugestões.

Ao professor Odilon por conceder amostras de silagem para realização dos experimentos.

A amiga Talita pelo carinho e pela amizade.

A todos os amigos do laboratório de Microbiologia Industrial: Marcelo, Fernanda Freitas, Fernanda Pietro, André, Diego, Ana Paula, Mariane e Davi.

A Tatinha e a Samira pela ajuda na execução dos trabalhos e pela amizade.

A Lisiane pela amizade e pela força nos momentos mais difíceis.

Ao Marcelo pela ajuda, pela discussão dos experimentos e especialmente pela amizade.

A Fernanda Pietro pela ajuda na análise dos resultados do PCR em tempo real.

A Fernanda Freitas pelo convívio e pela amizade.

Ao André pela boa convivência e amizade.

A Lívia do laboratório de Fisiologia de Micro-organismo pela ajuda nos momentos difíceis.

A funcionária Rita do laboratório de Microbiologia Industrial pela boa convivência e pela ajuda no laboratório.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente os funcionários da secretaria e do almoxarifado.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Júlio e Paulo, pela disponibilidade e atenção.

Ao funcionário Karlos do laboratório de Petróleo pela ajuda na utilização de equipamentos.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos: Lívia, Caio e Robson.

A todos os amigos do laboratório de Micorrizas e genética de micro-organismos.

A Lilian, do departamento de zootecnia, pela amizade e pelo esclarecimento de algumas dúvidas sobre silagem.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia pela ajuda na coleta de amostras.

Ao Maurício Lapertosa, da fazenda Belcon, por conceder a realização da coleta de leite de búfala.

A todos os amigos da graduação, mestrado e do doutorado.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

ELIANA DOS SANTOS LEANDRO, filha de Paulo Antônio Leandro e Livia Maria dos Santos Leandro, nasceu em Viçosa, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2001, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Laticínios, em julho de 2006.

Em agosto de 2006, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em 17 de fevereiro de 2009, com o título de *Magister Scientiae*.

Em março de 2009, iniciou o curso de Doutorado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 27 de fevereiro de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	ivi
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1 – <i>Lactococcus lactis</i>: Diversidade e funcionalidade de glutatona em condições de estresse.....	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
Capítulo 2 – Diversidade de <i>Lactococcus lactis</i> em diferentes ecossistemas	13
RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Amostras	16
2.2. Extração de DNA bacteriano de amostras ambientais	16
2.3. Amplificação por Nested PCR	16
2.4. Análise do produto PCR do 16S rDNA por DGGE.....	17
2.5. Análise e Construção de bibliotecas de rDNA 16S.....	17
2.6. Análise das sequências de DNA.....	18
2.7. Análise filogenética.....	18
2.8. Número de acesso das sequências de nucleotídeos	19
2.9. Isolamento e identificação dos isolados	19
3. RESULTADOS	20

3.1. Perfil da comunidade de <i>L. lactis</i> por DGGE.....	20
3.2. Identificação de <i>L. lactis</i>	21
3.3. Análise da diversidade de <i>L. lactis</i> pelo sequenciamento da biblioteca de clones do 16S rDNA.....	24
4. DISCUSSÃO.....	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
Capítulo 3 – Viabilidade de estirpes de <i>Lactococcus lactis</i> após a liofilização de isolados de silagem e leite avaliadas por citometria de fluxo	32
RESUMO	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODO.....	36
2.1. Estirpes e condições de conservação.....	36
2.2. Análise da integridade das células	36
2.2.1. Preparo das amostras controle.....	36
2.2.2. Marcadores fluorescentes e procedimento de coloração	36
2.2.3. Análise por citometria de fluxo.....	37
2.2.4. Análise dos dados.....	37
2.3. Contagem em placa	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Análise das estirpes liofilizadas pelo método de citometria de fluxo	39
3.1.1. Análise do controle positivo e negativo	39
3.1.2. Determinação de células íntegras e lesadas de estirpes de <i>L. lactis</i> após a liofilização	42
3.2. Análise por contagem em placa	44
4. CONCLUSÃO	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
Capítulo 4 - Influência das condições de cultivo no acúmulo de glutatona, na expressão do gene <i>gshR</i> e na resistência ao processo de liofilização em <i>Lactococcus lactis</i> LVA. 2	49
RESUMO	50

1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODO.....	52
2.1. Detecção de síntese e/ou transporte de GSH.....	52
2.2. Condições de cultivo para caracterização fisiológica.....	52
2.3. Preparação do extrato livre de células	52
2.4. Avaliação de GSH.....	53
2.5. Detecção do gene <i>gshR</i>	53
2.6. Análise da expressão do gene <i>gshR</i>	55
2.7. Liofilização	56
2.8. Análise de células viáveis	56
3. RESULTADOS.....	58
3.1. Presença de GSH em <i>L. lactis</i> LVA. 2.....	58
3.2. Aumento da concentração de GSH intracelular	59
3.3. Expressão do gene <i>gshR</i> em diferentes condições de cultivo.....	61
3.4. Avaliação da viabilidade	63
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÃO	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CONCLUSÃO GERAL	72

RESUMO

LEANDRO, Eliana dos Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Diversidade e resistência ao processo de liofilização de estirpes de *Lactococcus lactis* de ecossistemas distintos.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho, Poliane Alfenas Zerbini e Arnaldo Chaer Borges.

O processo de liofilização é o método mais utilizado na conservação da viabilidade de bactérias do ácido láctico. Entretanto, a viabilidade de muitas estirpes é comprometida após o processo de liofilização. Assim, para investigar se estirpes de *Lactococcus lactis* isoladas em ecossistemas não lácteos são mais tolerantes que as de ambiente lácteo, ao processo de liofilização, primeiramente foi investigada a diversidade de estirpes de *L. lactis* em diferentes ecossistemas, e a possibilidade de isolar essas estirpes. A detecção de estirpes de *L. lactis* pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi observada em todas as amostras analisadas. Entretanto, o isolamento dessas estirpes só foi possível nas amostras de leite de vaca da raça Holandesa, de búfala, e de cabra e em silagens de capim-braquiaria e de amendoim forrageiro. Dentre as estirpes isoladas, a estirpe isolada de leite de búfala (LBU. 1) foi detectada pela técnica de citometria de fluxo e também pelo método de contagem em placa, como sendo a estirpe mais tolerante ao processo de liofilização. Já a estirpe de *L. lactis* isolada de leite de vaca (LVA. 2) foi a mais sensível ao processo de liofilização. Pelo fato da estirpe de *L. lactis* LVA. 2 ser a mais sensível ao processo de liofilização, e também por acumular mais glutatona reduzida (GSH) do que as outras estirpes, essa cultura foi selecionada para estudar a influência das condições de cultivo no acúmulo de GSH, expressão do gene *gshR* e na resistência ao processo de liofilização. O acúmulo de glutatona por *L. lactis* LVA. 2 não confere proteção aparente às células após o processo de liofilização. As condições de cultivo avaliadas (cultivo aeróbio estático, aeróbio com agitação, meio anaeróbio e aeróbio estático com adição de NaCl) permitiram acúmulo acentuado de GSH em relação ao cultivo aeróbio estático, que é a condição de cultivo comumente empregada para *L. lactis*. A expressão do gene *gshR*, exceto no cultivo com a adição de NaCl, foi consistente com as condições de cultivo. Entretanto, o cultivo com a adição de NaCl foi a condição que conferiu maior proteção às células após a liofilização. Um estudo mais minucioso deverá ser realizado para verificar como realmente GSH atua em *L. lactis* LVA. 2.

ABSTRACT

LEANDRO, Eliana dos Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Diversity and resistance to lyophilization process of strains of *Lactococcus lactis* distinct ecosystems.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-Advisers: Antônio Fernandes de Carvalho, Poliane Alfenas Zerbini and Arnaldo Chaer Borges.

The lyophilization process is the method used to preserve viability of lactic acid bacteria. However, the viability of many strains is compromised after the lyophilization process. Therefore, to investigate if strains of *Lactococcus lactis* isolated from non-dairy ecosystems are more tolerant than the dairy environment, to the lyophilization process, we first investigated the diversity of strains of *L. lactis* in different ecosystems, and the ability to isolate these strains. The detection of strains of *L. lactis* by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was observed in all samples. However, isolation of these strains was possible only in milk samples from Holstein cows, female buffalo milk, goat milk and grass and forage peanut silage. Among the isolated strains, the strain isolated from female buffalo milk (LBU. 1) was detected by flow cytometry and also by plate counting method, as being the most tolerant strain lyophilization process. In contrast, the strain of *L. lactis* isolated from cow milk (LVA. 2) was the most sensitive to lyophilization. Because the strain of *L. lactis* LVA. 2 was more sensitive to lyophilization process and also accumulated more reduced glutathione (GSH) than the other strains, this culture has been selected to study the influence of culture conditions on the accumulation of GSH, gene expression *gshR* and resistance to the lyophilization process. The accumulation of glutathione by *L. lactis* LVA. 2 does not protects apparently cells after lyophilization. Growing conditions evaluated (static aerobic, aerobic with agitation, anaerobic and aerobic static with added NaCl) allowed an accentuated accumulation of GSH compared to static aerobic, which is the cultivation condition commonly used to *L. lactis*. 2. Expression of gene *gshR*, except in cultivation with addition of NaCl, was consistent with the growing conditions. However, cultivation with addition of NaCl was the condition that conferred greater protection to cells after lyophilization. A more detailed study should be conducted to see how exactly GSH acts on *L. lactis* LVA. 2.

INTRODUÇÃO GERAL

A busca de novas estirpes de *Lactococcus lactis* em ecossistemas não lácteo tem sido visto por muitos pesquisadores como uma alternativa para produção de queijos com sabores diferenciados dos já existentes. As estirpes de *L. lactis* isoladas de plantas produzem compostos associados ao *flavor* diferenciados das estirpes isoladas de leite, e, além disso, demonstram ser mais resistentes a condições de estresse osmótico, ocasionado pela adição de NaCl, e também mais resistentes a condições ácidas. Entretanto, ainda não foi avaliado se as estirpes de *L. lactis* isoladas de ambiente não lácteo são mais resistentes ao processo de liofilização.

Algumas estirpes de *L. lactis* apresentam mecanismos de defesa que podem proteger as células dos danos ocasionados pelo processo de liofilização. A capacidade de transportar o tripeptídeo glutationa (GSH) na forma reduzida tem sido observada em algumas estirpes de *L. lactis*, e o seu papel funcional, na sobrevivência das células, foi constatado quando essas estirpes são expostas a condições de estresse oxidativo, ácido e osmótico. Além da capacidade de acumular GSH, algumas estirpes de *L. lactis* apresentam a enzima glutationa redutase (*gshR*), que tem o papel de manter a concentração de GSH alta na célula para que o equilíbrio redox na célula seja alcançado. Entretanto, o papel funcional de GSH em *L. lactis* ainda não foi avaliado após o processo de liofilização.

Assim, diante do exposto este trabalho teve como finalidade investigar a diversidade e a resistência ao processo de liofilização de estirpes de *L. lactis* de ecossistemas distintos. Para alcançar esses objetivos, no capítulo 2 foi avaliada a diversidade de estirpes de *L. lactis* em diferentes ecossistemas, e também foi realizado o isolamento dessa espécie nos diferentes ecossistemas selecionados. No capítulo 3, foi investigado se as estirpes de ambiente não lácteo são mais tolerantes ao processo de liofilização do que as estirpes isoladas de ambientes lácteo. Já no capítulo 4, foi avaliado se GSH exerce proteção em *L. lactis* LVA. 2 após o processo de liofilização, e também foi avaliado o efeito de diferentes condições de cultivo no acúmulo de GSH, na expressão do gene *gshR* e na resistência após o processo de liofilização.

Capítulo 1 – *Lactococcus lactis*: Diversidade e funcionalidade de glutathiona em condições de estresse

Capítulo 1 - *Lactococcus lactis*: Diversidade e funcionalidade de glutatona em condições de estresse

O gênero *Lactococcus* compõe-se de bactérias do ácido láctico (BAL) gram-positivas, catalase negativa que apresentam genoma pequeno, em torno de aproximadamente $2.345 \pm 5\text{kb}$, contendo em média 35,4 % do conteúdo G+C (Teuber & Geis, 2006). Este gênero é classificado em sete espécies, *Lactococcus lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis* e *L. fujiensis*, sendo que a espécie *L. lactis* apresenta três subespécies (*cremoris*, *lactis* e *hordniae*) e uma biovariedade formadora de diacetil (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) (Wright, 2012). Dentre essas espécies, *L. lactis* se destaca pela sua importância tecnológica, onde ambas as subespécies *lactis* e *cremoris* são utilizadas como culturas *starter* na produção de vários tipos de queijos pela indústria de laticínios, e são responsáveis pela qualidade, segurança microbiológica e vida de prateleira destes produtos (Mayo et al., 2010).

O critério utilizado para a seleção de estirpes de *L. lactis* para utilização como culturas *starter* na produção de queijo tem sido a capacidade de converter de forma rápida a lactose do leite em ácido láctico, causando assim um rápido decréscimo no pH do leite. Além dessa característica, é importante que as estirpes de *L. lactis* utilizadas industrialmente na produção de queijo sejam tolerantes aos métodos de conservação de cultura (congelamento ou liofilização), de modo a não afetar a sua viabilidade e consequentemente a sua atividade de acidificação em leite (Leroy & De Vuyst, 2004).

A liofilização é o processo convencional de desidratação de BAL onde as culturas são congeladas, e em seguida desidratadas pela retirada de água livre e também da água ligada às macromoléculas. Durante a etapa de desidratação as células são expostas a condições de estresse osmótico e oxidativo, que devido à remoção de água, ocorre um comprometimento com a osmoregulação da célula e também com a estabilidade de proteínas, DNA, RNA e dos lipídeos da membrana (Santivarangkna et al., 2007; Santivarangkna et al., 2008; Meng et al., 2008). Embora o objetivo do processo de liofilização seja aumentar a estabilidade das BAL durante o período de estocagem, a sensibilidade às condições do processo acaba afetando a sua viabilidade. Para proteger dos danos ocasionados pelo processo de liofilização, substâncias crioprotetoras são adicionadas à suspensão de células, no entanto, alta taxa de

sobrevivência após o processo de liofilização e durante o período de estocagem não é alcançada em muitos micro-organismos somente com o uso de substâncias crioprotetoras (Morgan et al., 2006).

Atualmente, estudos realizados por vários pesquisadores têm demonstrado que a seleção de ecossistemas não lácteos tem favorecido a seleção de estirpes de *L. lactis* com capacidade de formar compostos diferenciados associados ao *flavor* e produção de antimicrobianos. Além disso, estirpes de *L. lactis* isoladas de vegetais tem demonstrado serem mais tolerantes a condições de estresse osmótico, ocasionado pela presença de NaCl, e também a condições ácidas (Vlieg et al., 2006). Entretanto, nenhum estudo ainda avaliou se existe relação entre a fonte de isolamento do micro-organismo com a resistência ao processo de liofilização.

O conhecimento da diversidade de comunidades microbianas em amostras de leite, queijo, silagem e do trato intestinal de peixe expandiu-se com a aplicação das técnicas que não dependem de cultivo. Técnicas moleculares como DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) e bibliotecas metagenômicas são técnicas que não dependem de cultivo e que tem sido muito utilizadas, em estudos preliminares, para a bioprospecção de micro-organismos de interesse (Quigley et al., 2011).

A diversidade de comunidades microbianas em leite tem sido avaliada pela técnica de DGGE (Quigley et al., 2011). O sequenciamento das bandas do gel de DGGE tem confirmado a presença de *L. lactis* em leite de vaca (Raats et al., 2011), cabra e de ovelha (Casalta et al., 2009). *L. lactis* é considerada uma espécie abundante em leite *in natura*, entretanto sob condições de refrigeração a comunidade microbiana do leite pode ser alterada, levando ao decréscimo da população de *L. lactis* (Raats et al., 2011).

Queijos elaborados com leite *in natura* de vaca (Raats et al., 2011), cabra e de ovelha (Casalta et al., 2009) são avaliados quanto à diversidade e dinâmica das comunidades microbianas nos diferentes estágios de processamento. A análise de queijos no final do período de maturação por PCR-DGGE tem demonstrado que *L. lactis* permanece dominante até o final da maturação (Casalta et al., 2009), entretanto não é detectado diretamente por isolamento em ágar (Martín-Platero et al., 2009). Isso se deve à susceptibilidade de *L. lactis* às condições ambientais formadas pela microbiota presente no queijo como, por exemplo, produção de ácido acético por lactobacilli heterofermentativos, o qual podem matar os lactococci ou criar uma condição que

permita entrar em estado viável, porém não cultivável (VNC) (Martín-Platero et al., 2008).

Em queijo elaborado com leite de ovelha *in natura* foi constatado a presença de estirpes de *L. lactis* com alto potencial para serem utilizadas como culturas *starters* na produção de queijos. Características como, atividade de coagulação do leite, atividade proteolítica, resistência a fagos foram observadas (Feutry et al., 2012). Em leite de égua foram identificadas duas estirpes de *L. lactis* com capacidade de produzir *flavor* e com grande tolerância a condições de estresse (Bendimerad et al., 2012).

A técnica de PCR-DGGE tem sido utilizada para acompanhar a sucessão de bactérias do ácido láctico durante o período de ensilagem de forragens (Dolci et al., 2011). Em silagem de capim (*Chloris gayana Kunth*) não foi possível pelos métodos convencionais de cultivo, isolar estirpes de *L. lactis*. Apenas na gramínea fresca foi possível isolar essa espécie pelos métodos convencionais de cultivo. Entretanto, pela análise do perfil de DGGE e sequenciamento das bandas, *L. lactis* é detectado em silagens com 15, 30 e 90 dias de estocagem (Parvin & Nishino, 2010). A susceptibilidade de *L. lactis* às condições ambientais presentes durante a ensilagem faz com que seja substituída por estirpes de *Lactobacillus* tolerantes a essas condições (McDonald et al., 1991).

As estirpes de *L. lactis* isoladas de plantas têm demonstrado características genéticas similares às estirpes isoladas de leite de vaca, entretanto apresentam características fenotípicas adicionais, tais como, habilidade de fermentar muitos tipos de carboidratos, e tolerância a condições de estresse (por exemplo, alta concentração de NaCl) (Nomura et al., 2006). As estirpes de *L. lactis* isoladas de leite e culturas *starter* utilizadas industrialmente desempenham melhor a fermentação da lactose, atividade de coagulação e atividade proteolítica do que estirpes de *L. lactis* isoladas de vegetal. No entanto, as estirpes de *L. lactis* de vegetais são capazes de produzir compostos de aroma bastante acentuados (Gutiérrez-Méndez, et al., 2008; 2010). No entanto, ainda não é clara a relação existente entre a fonte de isolamento e habilidade de produção de aroma (Gutiérrez-Méndez, et al., 2008).

A microbiota intestinal do peixe Salmon (*Salmo salar* L.) foi avaliado pela técnica de DGGE, e a presença de *L. lactis* foi identificada (Hovda et al., 2012). Estirpes de *L. lactis* tem sido isoladas do trato intestinal do peixe Coastal (Itoi et al., 2008),

Clarias gariepinus (African catfish), e dos peixes sardinha *Sardina pilchardus* e *Boops boops* (Sahnouni et al., 2012).

Estirpes de *L. lactis* isoladas do intestino dos peixes *Sardina pilchardus* e *Boops boops* apresentam características desejáveis para aplicação em alimentos, como, atividade antagonista contra alguns micro-organismos indicadores (*Staphylococcus aureus* ATCC25923; *Escherichia coli* ATCC25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Klebsiella pneumoniae*; *Bacillus cereus*; *Salmonella* e *Enterococcus faecalis*), atividade de acidificação em leite, atividade proteolítica e sensibilidade a alguns antibióticos (cloranfenicol, tetraciclina, amicacina e rifamicina). Entretanto, a maioria das estirpes de *L. lactis* produzem aminas biogênicas, exceto *L. lactis diacetylactis* BL10. (Sahnouni et al., 2012). A presença de aminas biogênicas, em alta concentração em alimentos, tem sido associada com efeito tóxico, e por isso estirpes produtoras de aminas biogênicas são indesejáveis em alimentos (Suzzi & Gardini, 2003).

A presença de genes envolvidos em mecanismos de proteção a condições de estresse ácido, osmótico, oxidativo e pelo decréscimo ou aumento de temperatura já foram constatados em *L. lactis* (Sanders et al., 1999). Atualmente, a presença de genes envolvidos no metabolismo de glutatona, e também a capacidade de importar a glutatona do meio extracelular para o meio intracelular da célula tem sido um mecanismo novo de proteção a várias condições de estresse que é estudado em *L. lactis*.

A glutatona é um tripeptídeo que se encontra presente em eucariotos, bactérias gram- negativas e em menor proporção em bactérias gram-positivas (Copley & Dhillon, 2002; Fahey et al., 1978). A glutatona é formada por três aminoácidos, glutamato, cisteína e glicina. As enzimas/genes que fazem parte do sistema glutatona são a γ -glutamylcisteína sintetase (*gshA*), glutatona sintetase (*gshB*), glutatona redutase (*gshR/gor*) e glutatona peroxidase (*gpo*). A biossíntese de GSH envolve a formação de uma ligação peptídica entre glutamato e cisteína que é catalizada pela γ -glutamylcisteína sintetase (GshA), e outra ligação peptídica é formada entre γ -Glu-Cys e glicina que é catalizada por glutatona sintetase (GshB) (Copley & Dhillon, 2002). Muitos organismos podem importar a glutatona presente no meio extracelular e utilizar em várias reações celulares. A importação de glutatona em procariotos é realizada pelo transportador CydDC, que é composto por duas subunidades (CydC e CydD) (Pittman et al., 2005).

A glutathione exerce várias funções no sistema biológico, como por exemplo, como agente antioxidante, no aumento das funções imunológicas e atividade de detoxificação celular (Wu et al., 2004). Muitas das funções da glutathione são alcançadas pela conversão da glutathione reduzida (GSH) em glutathione na forma oxidada (GSSG), que acontece devido à atuação da enzima glutathione peroxidase. A glutathione redutase atua neste sistema regenerando a forma oxidada (GSSG) em glutathione reduzida (GSH) para manter a homeostase intracelular (Jones, 2002).

Estudos têm demonstrado que *L. lactis* não tem capacidade de sintetizar glutathione, no entanto a capacidade de importar para o seu meio intracelular tem sido observada (Li et al., 2003). Atualmente, a suplementação do meio de cultivo com glutathione tem sido o foco de vários trabalhos para avaliar o seu efeito em várias condições de estresse. Algumas funções de GSH em *L. lactis* e seu mecanismo proposto já foram avaliados.

O estresse oxidativo é o resultado da elevada exposição das células a espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, anions superóxidos, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e hidroperóxidos. *L. lactis* é exposto a essas condições durante o cultivo, entretanto mecanismos especializados para combater o estresse oxidativo têm sido constatados e, esses incluem, enzimas como superóxido dismutase, o sistema NADH oxidase e peroxidase e acúmulo de glutathione (Cabiscol et al., 2000). Dentre esses mecanismos, o acúmulo de glutathione tem sido alvo de estudos por pesquisadores em BALs (Pophaly et al., 2012; Li & Zhang, 2012). Em *L. lactis*, que apresentam capacidade de importar glutathione, observou-se que a suplementação do meio quimicamente definido (MQD) com glutathione, independente da fase de crescimento em que se encontra, permite melhor crescimento em condições de aerobiose (Li et al., 2003). Estes pesquisadores observaram também, que células cultivadas em MQD suplementado com GSH apresentaram maior resistência ao tratamento com peróxido do que as cultivadas em MQD sem suplementação (Li et al., 2003).

L. lactis é uma bactéria neutrófila que apresenta crescimento ótimo em meio extracelular com pH em torno de 6,3 a 6,9 (Even et al., 2003). O metabolismo de *L. lactis* é homofermentativo, e com isso acaba gerando ácido como produto final (principalmente ácido láctico) o qual resulta na acidificação do meio e subsequente estresse ácido. O estresse ácido tem efeito letal na fisiologia celular de *L. lactis*, incluindo danos à membrana celular e inibição de enzimas do sistema de transporte

(Hutkins & Nannen, 1993). Mecanismos de resistência ao estresse ácido em *L. lactis*, como bomba de prótons e o mecanismo de geração de substâncias alcalinas a partir do catabolismo de aminoácidos já foram identificados e caracterizados. A importação de glutathione por *L. lactis* tem sido mencionada como um novo mecanismo de proteção ao estresse ácido. Zhang et al. (2007), demonstraram que o cultivo de *L. lactis* SK11 em MQD suplementado com glutathione permite a célula manter o pH_i alto em 2,5 por 30 minutos, e em pH 4,0 por 4 horas, permitindo-se assim, maior sobrevivência a essas condições. Entretanto, esses pesquisadores argumentam que glutathione não tem um efeito direto no aumento do pH_i, mas possivelmente possa estar envolvida em mecanismos de glutathionilação de proteínas, como a da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, que ajuda a sustentar a glicólise.

A presença de mecanismos de resistência ao estresse osmótico em *L. lactis* é importante para tolerar a alta concentração de NaCl em queijos. O acúmulo de osmoprotetores por *L. lactis* em condições hiperosmótica é conhecido como um mecanismo de resistência presente em *L. lactis* para enfrentar essa situação (Guillot et al, 2000). Recentemente, Zhang et al.(2010 a) observaram que as células de *L. lactis* SK11 que contém glutathione exibem uma sobrevivência maior a exposição a NaCl 5 M, quando comparado com as células de *L. lactis* SK11 sem glutathione. Esse resultado também foi observado por microscopia eletrônica, onde foi possível observar a integridade dessa estirpe por 24 horas de exposição à NaCl 5 M, enquanto com a célula sem glutathione a integridade foi mantida somente por 2 horas de exposição ao NaCl. Pela análise proteômica comparativa, esses autores verificaram que várias enzimas glicolíticas de *L. lactis* são significativamente reguladas na presença de glutathione.

Em *L. lactis* o papel protetor de glutathione durante o processo de liofilização ainda não foi avaliado. Entretanto, em *Lactobacillus sanfranciscensis* essa funcionalidade já foi constatada. Esses pesquisadores observaram um aumento significativo na viabilidade das células que foram suplementadas com glutathione. Este efeito protetor tem sido atribuído à prevenção da oxidação dos ácidos graxos da membrana e a manutenção do comprimento da cadeia de ácidos graxos (Zhang et al., 2010 b).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bendimerad, N.; Kihal, M.; Berthier, F. (2012). Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Science & Technology* 92, 249 – 264.
- Cabiscol, E. Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Biology Chemical* 275, 27393-27398.
- Casalta, E., Sorba, J., Aigle, M., Ogier, J. (2009). Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology* 133, 243-251.
- Copley, S. D. & Dhillon, J. K. (2002). Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biology* 3, 1–16.
- Dolci, P.; Tobacco, E.; Borreani, G. (2011). Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (21), 7499 – 7507.
- Even, S., Lindley, N. D., Coccagn-Bousquet, M. (2003). Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology* 149, 1935–1944.
- Fahey, R. C., Brown, W. C., Adams, W. B., Worsham, M. B. (1978). Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal Bacteriology* 133, 1126–1129.
- Feutry, F.; Torre, P.; Arana, I.; Garcia, S.; Desmasures, N.; Casalta, E. (2012). *Lactococcus lactis* strains from raw ewe's Milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese área: levels, genotypic and technological diversity. *Dairy Science & Technology*.
- Guillot, A., Obis, D., Mistou, M-Yyes. (2000). Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of food Microbiology* 55, 47 – 51.
- Gutiérrez-Méndez, N.; González-Córdova, A. F.; Nevárez-Moorillón, G. V.; Rivera-Chavira, B. (2008). Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with and electronic nose and sensory analysis. *Journal Dairy Science* 91, 49 – 57.
- Gutiérrez-Méndez, N.; Rodríguez-Figueroa, J. C.; González-Córdova, A. F.; Nevárez-Moorillón, G. V.; Rivera-Chavira, B.; Vallejo-Cordoba, B. (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Canadian Journal Microbiology* 56, 432-439.
- Hovda, M. B.; Fontanillas, R.; Mcgurk, C.; Obach, A.; Rosnes, J. T. (2012). Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 43, 154 – 159.

- Hutkins, R. W., Nannen, N. L. (1993). pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal Dairy Science* 76, 2354–2365.
- Itoi, S.; Abe, T.; Washio, S.; Ikuno, E.; Kanomata, Y.; Sugita, H. (2008). Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology* 121, 116-121.
- Jones, D. P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods in Enzymology* 348, 93–112.
- Leroy, F. & DE Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional *starter* cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67-78.
- Li, Y. & Zhang, Y. (2012). Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness. *Current Opinion in Biotechnology* 24, 1 – 6.
- Lin, Y., Hugenholtz, J., Abee, T., Molenaar, D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5739 – 5745.
- Martín-Platero, A. M.; Maqueda, M.; Valdivia, E.; Purswani, J.; Bueno, M. M. (2009). Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology* 26, 294-304.
- Mayo, B. (2010). Dairy Lactococci. *Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food*, 191 – 194.
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106, 1406 – 1416.
- MCdonald, P.; Henderson, A. R.; Heron, S. J. E. (1991). *The biochemistry of silage*. 2^aed. Aberystwyth: Chalcombe Publications, 340 p.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying: a review. *Journal of Microbiology Methods* 66, 183 – 193.
- Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology* 101 (2), 396 - 405.
- Parvin, S., Nishino, N. (2010). Succession of lactic acid bacteria in wilted rhodesgrass silage assessed by plate culture and denaturing gradient gel electrophoresis. *Grassland Science* 56, 51-55.
- Pittman, M. S., Robinson, H. C., Poole, R. K. (2005). A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *Journal of Biological Chemistry* 280, 32254–32261.

- Pophaly, S. D., Singh, R., Pophaly, S. D., Kaushik, J. K., Tomar, K. (2012). Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 11, 1 – 14.
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T. P., Paul Ross, R. (2011). Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150, 81-94.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D., Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology* 28, 465-471.
- Sahnouni, F.; Matallah-Boutiba, A.; Chemlal, D.; Boutiba, Z. (2012). Characterization of technological properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish caught in the Coast of Oran Algeria. *Agricultural Journal* 7 (2), 81 – 87.
- Sander, J. W., Venema, G., Kok, J. (1999). Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 483 – 501.
- Santivarangkna, C., Wenning, M., Foerst, P., Kulozik, U. (2007). Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal Applied Microbiology* 102, 748 – 756.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1 -13.
- Suzzi, G. & GardinI, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal Food Microbiology* 88, 41 – 54.
- Teuber, M. & Geis, A. (2006). The genus lactococcus. *Prokaryotes*, 4, 205-228.
- Vlieg, J. E. H.; Rademaker, J. L.; Bachmann, H.; Molenaar, D.; Kelly, W. J. K.; Siezen, R. (2006). Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 183-190.
- Wright, A. V. (2012). Genus *Lactococcus*. *Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional aspects*. Fourth edition, Taylor & Francis.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition* 134, 489–492.
- Zhang, J., Fu, R., Hugenholtz, J., Li, Y., Chen, J. (2007). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5268 – 5275.

Zhang, Y., Zhang, Y., Zhu, Y., Mao, S., Li, Y. (2010 a). Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3177 – 3186.

Zhang, J., Du, G., Zhang, Y., Liao, X., Wang, M., Chen, J. (2010 b). Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2989 -2996.

Capítulo 2 – Diversidade de *Lactococcus lactis* em diferentes ecossistemas

RESUMO

A diversidade de estirpes de *L. lactis* em amostras de leite de diferentes espécies animais (vaca da raça Holandesa e Nellore, búfala, ovelha, cabra, porca e égua), de silagem de capim e amendoim forrageiro, do trato intestinal dos peixes tilápia e surubim e também de queijo artesanal da Serra da Canastra foram avaliadas. Os resultados obtidos quanto à diversidade de estirpes de *L. lactis* pela análise do perfil de DGGE, com a utilização de primers específicos para *L. lactis*, demonstrou que *L. lactis* está presente nessas amostras. Entretanto, o isolamento em ágar M17 não foi possível em várias amostras. Pela análise da diversidade em bibliotecas de clones do 16S rDNA de *L. lactis* construídas para as amostras de silagem de capim, leite de búfala e do trato intestinal de peixe tilápia concluímos que grande parte das estirpes de *L. lactis* não é cultivável em meio ágar M17. Portanto, é necessário o estabelecimento de novas condições de cultivo para avaliar a possibilidade de recuperar essas estirpes, principalmente nos ecossistemas não convencionais para o isolamento de *L. lactis*.

Palavras chaves: *Lactococcus lactis*, ecossistemas, diversidade.

1. INTRODUÇÃO

Lactococcus lactis é uma bactéria do ácido láctico que se destaca pela sua importância como cultura *starter* na produção de queijos pela indústria de laticínios. Essa estirpe é comumente isolada de leite *in natura* ou queijos elaborados com leite *in natura* (Teuber & Geis 2006). Entretanto, a sua presença também é identificada em alguns vegetais (Nomura et al., 2006) e no intestino de alguns peixes (Itoi et al., 2009). As estirpes de *L. lactis* isoladas de vegetais demonstram capacidade de produzir compostos associados ao *flavor* diferenciados dos já conhecidos, e isto tem sido visto por pesquisadores como uma oportunidade de incorporar essas estirpes como culturas adjuntas na produção de queijo (Gutiérrez-Méndez et al, 2008; Gutiérrez-Méndez et al., 2010).

Para introduzir novas estirpes de *L. lactis* provenientes de fontes não lácteas na indústria de laticínios, é necessário avaliar se as condições de cultivo empregadas para o isolamento dessa estirpe em leite será também adequado para recuperar as estirpes de fontes não lácteas. O meio de cultivo M17 é o meio comumente empregado para o cultivo de *L. lactis* (Terzaghi & Sandine, 1975). Entretanto a efetividade desse meio de cultivo em recuperar estirpes de *L. lactis* provenientes de ambientes não lácteos, ainda não foi confirmada.

A diversidade de *L. lactis* em diferentes fontes pode ser avaliada por técnicas que não dependem de isolamento, como por exemplo, por DGGE e pela construção de bibliotecas de clones do 16 S rDNA (Quigley et al., 2011). As informações alcançadas com esses métodos podem evitar várias tentativas de isolamento do micro-organismo de interesse, caso a estirpe de interesse não seja detectada na amostra. Além disso, esses métodos fornecem a informação do número de estirpes distintas que são possivelmente cultiváveis.

Assim, diante do exposto o objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade das condições de cultivo em meio M17 em recuperar estirpes de *L. lactis* de fontes lácteas e não lácteas. Para confirmar a efetividade das condições de cultivo, métodos que não dependem de isolamento foram também utilizados. As amostras que foram avaliadas neste estudo foram: amostras de leite de diferentes espécies animais (vaca da raça Holandesa e Nellore, búfala, ovelha, cabra, porca e égua), de silagem de capim (*Brachiaria brizantha* Cv. Marandu) e amendoim forrageiro (*Arachis Pintoi* Cv.

Belmonte), do trato intestinal dos peixes tilápia e surubim e também do queijo artesanal da Serra da Canastra.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Amostras de leite de várias espécies de animais (vacas da raça Holandesa e Nellore, búfala, ovelha, cabra, porca e égua), de silagem (capim e de amendoim forrageiro), do trato intestinal de peixe (tilápia e surubim) e de queijo artesanal da Serra da Canastra foram utilizadas para avaliar a diversidade de *L. lactis* por métodos que não dependem de cultivo e pelo método tradicional de isolamento. Amostras de silagem foram obtidas após 1 dia de ensilagem em silos de PVC, e o trato intestinal dos peixes foram coletados após 3 dias sem dieta.

2.2. Extração de DNA bacteriano de amostras ambientais

A extração de DNA bacteriano de leite, queijo e trato intestinal de peixe foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos por Rosolof et al.(2010), Hein et al. (2001) e Yang et al. (2007), respectivamente. A extração de DNA de silagem foi realizada a partir de 10 g de silagem que foram transferidas para 90 mL de tampão de extração (0,1 % de tween 20 %, 10 mM de Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 7,5) e em seguida homogeneizada. A amostra foi filtrada e centrifugada a 6,000 g por 10 minutos e o sedimento ressuspensionado em 1 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0. Dessa suspensão alíquotas de 480 µL foram usadas para iniciar a extração de DNA com o Kit de extração de DNA Wizard® (Promega) usado conforme as recomendações do fabricante.

2.3. Amplificação por *Nested* PCR

O DNA genômico extraído das amostras selecionadas foram utilizados na primeira PCR, utilizando o par de primers BLS342F/1392R (Blackwood et al., 2006) específico para eubacteria pertencente ao filo Firmicutes. O produto de PCR dessa reação foi utilizado na segunda PCR, com os primers específicos para *L. lactis* LAC136F (TTTGAGCGGGGGACAACATT) e LAC878R (TATTGCGTTAGCTGCGATACA), seguida de uma terceira PCR com primers p2 e p3 específico para eubacteria pertencente ao filo Firmicutes (acrescido de um grampo GC na extremidade 5' para a análise de DGGE) (Muyzer et al., 1993). A PCR foi realizada

com o kit GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), em um volume final de 25 μ L, contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatados (dNTP), 0,5 μ M de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase, 7,5 μ g de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), 20 ng de DNA e água milli-Q para completar o volume final da reação. As amostras foram amplificadas em Termociclador (Analítica, TC-512) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 95 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 90 segundos e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Este programa foi utilizado em todas as reações. Os produtos PCR foram estocados a – 20 °C até o momento de sua utilização.

2.4. Análise do produto PCR do 16S rDNA por DGGE

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada com o sistema “DCode™ Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad Califórnia USA) para separação dos produtos PCR obtidos por *Nested*-PCR. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (8 % p/v de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) usando um gradiente de desnaturação de 40 a 60 % de uréia e formamida (100 % correspondendo a uréia 7M e 40 % p/v de formamida) aumentando com a direção da corrida eletroforética. A eletroforese foi realizada com uma voltagem constante de 60 V por 16 horas em uma temperatura constante de 60 °C. Após a eletroforese, o gel foi corado por 20 minutos com uma solução de SYBR® Gold (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante, e o resultado foi capturado no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagen). A análise do perfil de bandas foi realizada utilizando o programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O índice de diversidade geral de Shannon’s, (*H*), foi determinado com base no número e a intensidade relativa das bandas em cada perfil DGGE. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente Dirce de similaridade pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para análise dos agrupamentos.

2.5. Análise e Construção de bibliotecas de rDNA 16S

Os produtos da PCR da segunda reação realizada com o par de primers específicos para *L. lactis*, conforme anteriormente descrito, das amostras de leite de búfala, silagem de capim e do trato intestinal de peixe tilápia foram utilizados para

construção de bibliotecas de clones do 16S rDNA. Os amplicons foram clonados em pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA) conforme recomendações do fabricante. Toda a reação de ligação foi usada para transformar células de *Escherichia coli* JM109 ultracompetentes, e os clones obtidos foram selecionados para realização da PCR de colônia. A reação de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos; 72 °C por 5 minutos para extensão final dos primers M13F/ M13R para amplificar plasmídeos (Promega, Madison, USA). Os produtos PCR obtidos foram sequenciados, e a diversidade de clones na biblioteca foi investigada pela análise das sequências obtidas, e também pela análise de rarefação (Heck et al., 1975), usando o programa Analytic Rarefaction 1.318 (aRarefactWin). A cobertura da biblioteca de clones foi calculada com a fórmula $[1-(n/N)]$ (Good, 1953), onde n é o número de sequências distintas e N é o número de clones analisados.

2.6. Análise das sequências de DNA

As sequências dos isolados e clones foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank, e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos. As sequências do gene 16S rDNA que apresentaram similaridade igual ou maior que 97 % foram consideradas como pertencentes a uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (UTO) (Altschul et al., 1997).

2.7. Análise filogenética

Os alinhamentos múltiplos das sequências do gene 16S rRNA dos isolados de *L. lactis* e também de sequências de *L. lactis* obtidas do banco de dados do GenBank foram criados com a utilização do programa CLUSTALW e MEGA 5.1[®] (Tamura et al., 2011). A reconstrução da árvore filogenética por Inferência Bayesiana no programa MrBayes 3.1 foi realizada utilizando o método Markov chain Monte Carlo para 10 milhões de gerações. Foram feitas duas corridas independentes com quatro cadeias simultâneas, usando as configurações originais do programa. O modelo de substituição de nucleotídeos usado foi o estabelecido pelo programa MrModelTest, usando o critério Akaike (Posada & Buckley, 2004). As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações e 25 % delas foram descartadas como “burn-in”. A probabilidade posterior, representada

em cada nó da árvore construída, representa uma indicação do suporte daquele nó baseado no conjunto de dados.

2.8. Número de acesso das sequências de nucleotídeos

As sequências dos isolados de *L. lactis* e dos clones obtidos foram depositadas no banco de dados do GenBank com número de acesso de JX893524 a JX893535 e JX893536 a JX893614, respectivamente.

2.9. Isolamento e identificação dos isolados

Amostras de leite, silagem, queijo e do trato intestinal de peixe foram utilizadas também para o isolamento de estirpes de *L. lactis*. As amostras foram diluídas seriadamente em água peptonada (0,1 % p/v), e plaqueadas em ágar M17 contendo 5 % de lactose, 5 % de carbonato de cálcio e 0,06 % de púrpura de bromocresol, incubadas a 30 °C e 37 °C por 48 horas. Após a incubação, foram selecionadas pelo menos cinco colônias, de cada amostra, com características morfológicas distintas. A identificação dos isolados foi realizada por sequenciamento, e o par de primers P027/1378R (Heuer et al., 1997) foi utilizado para amplificação do fragmento do gene 16S rDNA de eubacteria pela PCR. O DNA dos isolados foi extraído com Kit Wizard® (Promega), e 20 ng do DNA foram adicionados na mistura de reação, conforme descrito anteriormente, para a realização da PCR. As amostras foram amplificadas em termociclador utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos; 72 °C por 5 minutos para extensão final dos primers.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil da comunidade de *L. lactis* por DGGE

A análise do perfil de DGGE das diferentes amostras, com a utilização de primers específicos para *L. lactis*, demonstrou a presença dessa bactéria em todos os ambientes e com padrões de bandas distintos (Figura 1).

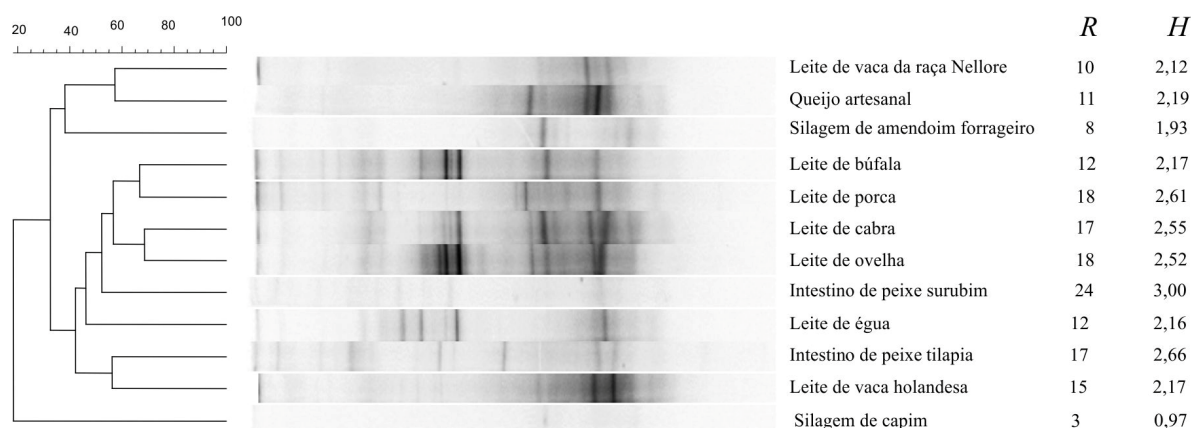


Figura 1 - Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos de rDNA 16S de comunidades de *Lactococcus lactis* presentes em diferentes ecossistemas naturais. A riqueza (*R*) e o índice de diversidade (*H*) de estirpes de *L. lactis* foram determinados para cada amostra. A escala de distância foi determinada pelo método UPGMA para a análise dos agrupamentos.

Pela a análise de agrupamento do perfil DGGE, agrupamentos específicos com um valor de similaridade relativamente alto, em torno de 55 % e 70 % foram observados entre as amostras de leite de búfala e porca, leite de cabra e ovelha, leite de vaca da raça Nellore e queijo artesanal, e entre leite de vaca da raça Holandesa e o trato intestinal do peixe tilápia. Um maior número de UTOs (estimado pelo número total de bandas no perfil DGGE) foi obtido na amostra do trato intestinal de peixe surubim, enquanto a amostra de silagem de capim apresentou o menor número de UTOs. A amostra do trato intestinal de peixe surubim apresentou maior número de bandas, e a de silagem de capim o menor número dessas bandas, indicando diferenças em riqueza.

3.2. Identificação de *L. lactis*

Dentre as 12 amostras submetidas à análise microbiológica pelo método convencional de plaqueamento em meio ágar M17, somente 5 amostras, leite de vaca da raça Holandesa, leite de cabra, leite de búfala e silagem de capim e amendoim, apresentaram colônias típicas de *L. lactis* (Tabela 1).

Tabela 1 – Informações sobre as sequências obtidas do produto PCR do 16 S rDNA das estirpes isoladas.

Estirpes	Fonte	Estirpe referente	Identidade (%)	Número de acesso
LVA. 2	Leite de vaca	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	100	DQ171718.1
LCA. 1	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i>	99	GQ337891.1
LCA. 2	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i>	99	GQ337885.1
LCA. 4	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	EU869288.1
LCA. 5	Leite de cabra	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	EU869288.1
LBU. 1	Leite de búfala	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	EU869288.1
SBR. 1	Silagem de capim	<i>Lactococcus lactis</i>	99	JF703669.1
SBR. 3	Silagem de capim	<i>Lactococcus lactis</i>	100	GQ337867.1
SBR. 4	Silagem de capim	<i>Lactococcus lactis</i>	100	GQ337891.1
SBR. 5	Silagem de capim	<i>Lactococcus lactis</i>	100	GQ337882.1
SAM. 12	Silagem de amendoim	<i>Lactococcus lactis</i>	100	GQ337882.2

A temperatura de incubação a 30 °C possibilitou a obtenção de colônias típicas, exceto com a amostra de leite de búfala, em que colônias típicas foram somente observadas na temperatura de incubação a 37 °C. A identificação dos 25 isolados foi confirmada pela análise das sequências de nucleotídeos obtidas do gene 16S rRNA. Dentre os 25 isolados selecionados para sequenciamento do produto PCR obtido, somente 11 isolados apresentaram sequências com alta identidade (99 e 100 %) com sequências de *L. lactis* já disponíveis no banco de dados do Genbank. A árvore filogenética reconstruída pela inferência bayesiana revela uma relação filogenética existente entre as sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA dos isolados obtidos com sequências de estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* que estão depositadas no Genbank (Figura 2).

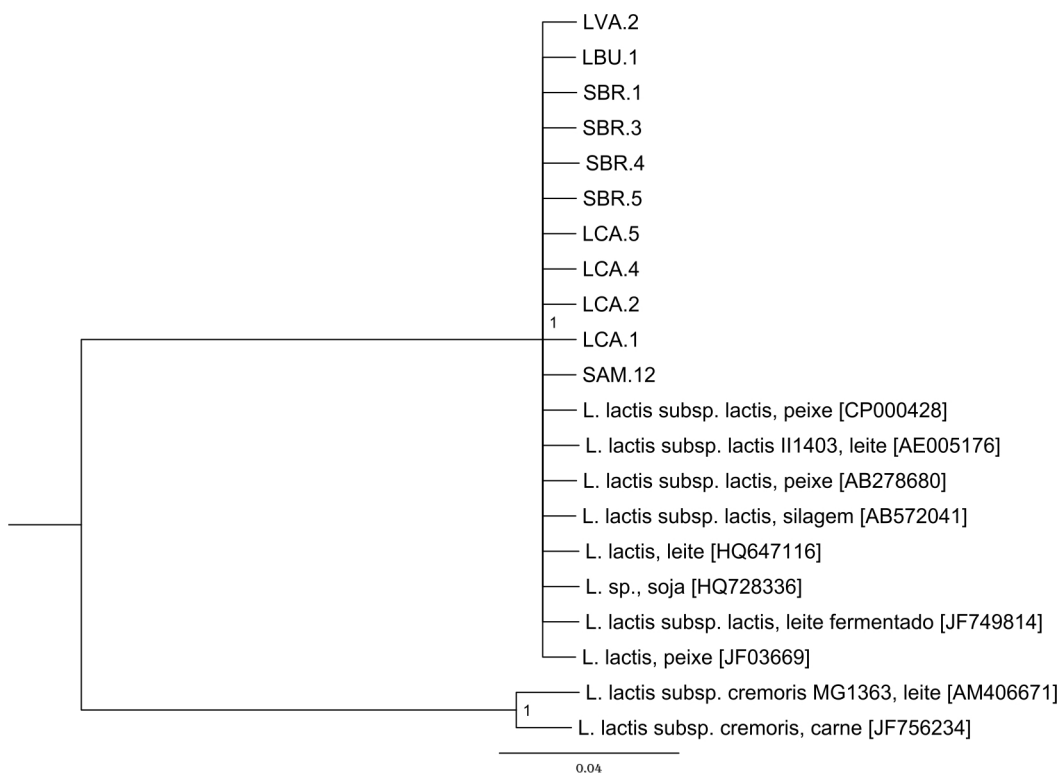


Figura 2 – Árvore filogenética baseada na sequência do gene DNA ribossomal 16 S de estirpes de *Lactococcus lactis*, mostrando a relação dessas estirpes com outras estirpes relatadas (número de acesso no parêntese). Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayesiana. As análises foram coletadas amostrando-se cada 500 gerações.

3.3. Análise da diversidade de *L. lactis* pelo sequenciamento da biblioteca de clones do 16S rDNA

Para investigar os resultados contraditórios observados entre os resultados obtidos pela PCR-DGGE e pelo método de isolamento, bibliotecas de clones do 16S rDNA foram construídas. Assim, selecionamos a amostra de leite de búfala e do trato intestinal de tilápia de modo a representar as amostras onde foi possível identificar somente uma estirpe de *L. lactis*, e amostras em que a presença de *L. lactis* não foi identificada, respectivamente. Enquanto a amostra de silagem de capim foi selecionada para confirmar a menor diversidade observada pelo perfil de DGGE. A análise de sequências de clones distintos obtidas com as amostras de DNA bacteriano de leite de búfala, de silagem de capim e do trato intestinal do peixe tilápia resultaram em sua maioria em sequências que apresentam similaridade > 97 % aos genes 16S rRNA de *L. lactis* presentes no GenBank (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências de clones de *Lactococcus lactis* obtidas de amostras de leite de búfala, intestino de peixe tilápia e silagem de capim, e porcentagem de similaridade com as sequências do Genbank.

Amostras	Clone (% similaridade)	Cobertura da biblioteca	Identificação	Número de acesso no Genbank.
Leite de búfala	BUF12 (99)	89,65 %	<i>Lactococcus lactis</i>	AB593359.1
	BUF16 (99)		<i>Lactococcus lactis</i>	AB593359.1
	BUF33 (96)		Uncultured bacterium clone	JF233929.1
Intestino de peixe tilápia	TIL7 (99)	87,5 %	<i>Lactococcus lactis</i>	AB593359.1
	TIL14 (90)		<i>Lactococcus lactis</i>	GQ337867.1
	TIL19 (100)		<i>Lactococcus lactis</i>	AB593359.1
	TIL37 (96)		Uncultured bacterium clone	GQO74140.1
Silagem de capim	BRA6 (99)	85 %	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JF758863.1
	BRA7 (99)		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	GQ246741.1
	BRA15 (99)		Uncultured bacterium clone	JF167006.1

As curvas de rarefação das três bibliotecas estão mostradas na Figura 3. O decréscimo na taxa de detecção de sequências distinta demonstra que grande parte da diversidade das três bibliotecas foi alcançada.

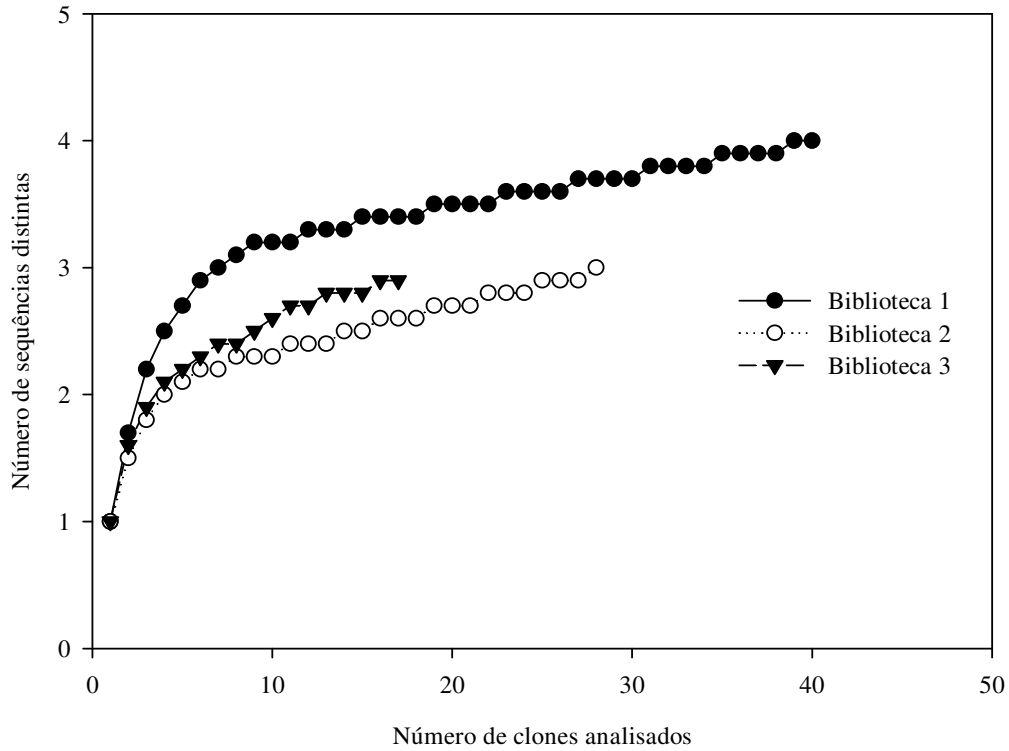


Figura 3 - Curvas de rarefação representando a diversidade de sequências esperadas de clones de rDNA 16S para cada biblioteca construída. Biblioteca 1: Intestino de peixe tilápia; Biblioteca 2: Leite de búfala; Biblioteca 3: Silagem de capim.

4. DISCUSSÃO

L. lactis encontra-se amplamente distribuído na natureza (Salama et al., 1995), e há um grande interesse em explorar o potencial de novas estirpes isoladas em diferentes ecossistemas para produção de compostos de aroma (Ayad et al., 2002). As condições encontradas nos ambientes de coleta de amostras neste estudo são diferentes e isso refletiu nos valores de riqueza encontrados. O maior valor de riqueza obtido para amostra do trato intestinal do peixe surubim pode estar associado com a estação do ano (Hagi et al., 2004) e a dieta (Heikkinen et al., 2006) que tem demonstrado afetar a abundância de estirpes de *L. lactis* na microbiota intestinal de peixes. A população de *L. lactis* que normalmente compõe a microbiota epifítica de espécies de plantas utilizadas para obtenção de silagem é considerada baixa (Ohomomo et al., 2002). Possivelmente, o baixo valor de riqueza obtido para a amostra de silagem de capim está associado a essa característica. Entretanto, o maior valor de riqueza obtido para amostra de silagem de amendoim, em comparação a amostra de silagem de capim, possivelmente possa esta associado com a composição nutricional dessa espécie de planta, que é maior que a de silagem de capim. Em relação ao valor de riqueza apresentado pelas as amostras de leite, de diferentes espécies de animais, o procedimento de higienização do ambiente em que eles vivem, e também o procedimento de higienização dos tetos são fatores importantes a serem levados em consideração quanto à diversidade microbiana, pois a presença de *L. lactis* em leite é resultante da contaminação ambiental.

O fato de não se obter o crescimento de colônias típicas de *L. lactis* em meio ágar M17 em várias amostras, pode estar associado a condições de cultivo não adequadas, como foi observado para amostra de leite de búfala, onde não foi possível obter colônias típicas a 30 °C, mas foi possível o isolamento de *L. lactis* quando a temperatura foi elevada para 37 °C. Como neste trabalho os ecossistemas selecionados são não convencionais para o isolamento de *L. lactis*, exceto o leite de vaca da raça Holandesa e queijo, é possível que as estirpes existentes nos ecossistemas, onde não foi possível isolar colônias típicas, sejam mais fastidiosas necessitando de um meio diferente que o M17 para poderem ser recuperadas. O estado viável não cultivável (VNC) tem sido verificado em lactococci quando o meio ágar M17 é utilizado (Martín-Platero et al., 2009). Vale ressaltar, que os fatores intrínsecos e extrínsecos, inerentes ao local da coleta das amostras, podem propiciar um estresse ambiental responsável pela

transição de grande parte da população dominante para o estado VNC. O queijo é origem convencional para o isolamento de *L. lactis*, mas o fato de se tratar de um queijo com aproximadamente 30 dias de maturação, as condições ambientais formadas pela microbiota presente no queijo pode ter impedido a recuperação de células ativas. Condições de pré-enriquecimento, anteriores ao plaqueamento em ágar M17 podem alterar esse quadro.

A discrepância entre os resultados obtidos por perfil de DGGE e isolamento de culturas de *L. lactis* pode ser explicada pela presença de estirpes de *L. lactis* fastidiosas ou em estado VNC que não são capazes de crescer em meio ágar M17, ou ainda pela presença de células não viáveis que são detectadas por PCR-DGGE. Portanto, o momento da coleta e do isolamento pode ter sido crucial. A identificação de *L. lactis* na biblioteca de DNA bacteriano do trato intestinal do peixe tilápia reforça essas suposições quanto à presença de *L. lactis*. Essas mesmas inferências se aplicam à biblioteca de DNA bacteriano de leite de búfala, quando pela a análise de rarefação observou-se mais estirpes distintas do que a única encontrada em ágar M17. Também vale ressaltar que, apesar de ser possível comparar a diversidade de comunidades pela variável riqueza e pelo índice de diversidade por meio da análise dos perfis eletroforéticos de DGGE, estirpes de *L. lactis* tem demonstrado múltiplos operons rRNA (*rrnA – rrnF*), como também já foi observado em muitas outras bactérias, e com isso acaba levando a resultados contraditórios devido a formação de mais de uma banda correspondente à mesma estirpe (Bolotin et al., 2001).

Assim, este estudo demonstrou que vários ambientes naturais são ricos em estirpes de *L. lactis* diversas, entretanto é necessário avaliar outros meios de cultivos, e também condições de cultivos quando ecossistemas não convencionais são selecionados para o isolamento de *L. lactis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402.
- Ayad, E. H. E., Verheul, A., Bruinenberg, P., Wouters, J. T. M., Smit, G. (2003). Starter culture development for improving the *flavor* of Proosdij-type cheese. *International Dairy Journal* 13 (2), 159 – 168.
- Blackwood, C.B., Oaks, A., Buyer, J.S. (2006). Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6193-6198.
- Bolotin, A., Wincker, P., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* 11(5), 731 – 753.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 19, 3-11.
- Good, I.J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 40, 237–264.
- Gutiérrez-Méndez, N., González-Córdova, A. F., Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira, B. (2008). Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with and electronic nose and sensory analysis. *Journal Dairy Science* 91, 49 – 57.
- Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira, B., Vallejo-Cordoba, B. (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Canadian Journal Microbiology* 56, 432-439.
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., Hoshino, T. (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234, 335-346.
- Heck, K.L., Van Belle, G., Simberloff, D. (1975). Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* 56, 1489-1461.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemilainen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D., Wright, A. V. (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 259-268.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Wagner, M. (2001). Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time

- quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3122-3126.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3233-3241.
- Itoi, S., Yuasa, K., Washio, S., Abe, T., Ikuno, E., Sugita, H. (2009). Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish (2009). *Journal Applied Microbiology* 107, 867-874.
- Martín-Platero, A. M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J., Bueno, M. M. (2009). Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology* 26, 294-304.
- Muyzer, G., DE Wall, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from Milk and plants. *Journal of Applied Microbiology* 101 (2), 396-405.
- Ohmomo, S., Tanaka, O., Kitamoto, H.K., Cai, Y. (2002). Silage and microbial performance, old history but new problem. *Japan Agricultural Research Quarterly* 36, 59 – 71.
- Pérez, G., Cardell, E., Zárata, V. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 537-546.
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T. P., Paul Ross, R. (2011). Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150, 81-94.
- Rasolofo, E. A., St-Gelais, D., Lapointe, G., Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology* 138, 108-118.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Salama, M. S., Musafija-Jeknic, T., Sandine, W. E., Giovannoni, S. J. (1995) An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of lactococcus including *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Journal Dairy science* 78, 1004-1017.

- Singh, S. K., Ahmed, S. U., Pandey, A. (2006). Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry* 41 (5), 991-1000.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and evolution* 28, 2731-2739.
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 29, 807-813.
- Teuber, M., Geis, A. (2006). The genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4, 205-228.
- Yang, G., Bao, B., Peatman, E., Li, H., Huang, L., Ren, D. (2007). Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*. *Aquaculture* 262, 183-191.

Capítulo 3 – Viabilidade de estirpes de *Lactococcus lactis* após a liofilização de isolados de silagem e leite avaliadas por citometria de fluxo

RESUMO

A tolerância de estirpes de *L. lactis* ao processo de liofilização é um dos critérios utilizados na seleção de culturas para uso como cultura *starter* na produção de queijo. Neste estudo foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo e contagem em placa, a viabilidade de estirpes de *L. lactis*, isoladas de silagem e de leite, após o processo de liofilização. O kit Live/Dead (BacLight™), o qual contém os corantes syto9/PI, foi utilizado para corar as células para análise em citômetro de fluxo. As células desidratadas também foram plaqueadas em ágar M17 e incubada a 30 °C por 24 horas. A estirpe de *L. lactis* LBU. 1, isolada de leite de búfala, foi a que apresentou maior tolerância ao processo de liofilização, tanto pela técnica de citometria de fluxo quanto pelo método de contagem em placa. Embora as estirpes de *L. lactis* isoladas de silagem não sejam as mais resistentes ao processo de liofilização, vale ressaltar que em relação às estirpes isoladas de fontes convencionais, como leite de vaca e cabra, apresentaram maior tolerância ao processo de liofilização.

Palavras chaves: *Lactococcus lactis*, liofilização, viabilidade, citometria de fluxo.

1. INTRODUÇÃO

Lactococcus lactis é uma bactéria láctica de grande importância para indústria de laticínios, como cultura *starter*, na produção de queijos. As estirpes de *L. lactis* selecionadas para uso na produção de queijos devem apresentar alta atividade de acidificação. A liofilização é utilizada como método de conservação de culturas de bactérias do ácido láctico. Entretanto, as condições de estresse geradas afetam o estado fisiológico das células, levando à perda de viabilidade e atividade de acidificação (Coulibaly et al., 2010). Alguns estudos discutem a necessidade de manter um alto nível de viabilidade e atividade de acidificação das bactérias lácticas durante o congelamento, liofilização e estocagem prolongada (Selwal, et al., 2011; Strasser et al., 2009). Conseqüentemente, alguns estudos têm sido realizados para melhorar a resistência das bactérias do ácido láctico ao processo de liofilização. O uso de substâncias protetoras (Pyar et al., 2011) e aplicação de estresse subletais (Simões et al., 2010) antes do processo de liofilização têm sido realizados para aumentar a tolerância das células durante a liofilização ou congelamento. Entretanto, além desses tratamentos é necessário que as estirpes utilizadas apresentem uma resistência natural ao processo de liofilização, isto é, independente dos tratamentos que são aplicados antes do processo de liofilização.

A viabilidade de culturas *starter* é tradicionalmente quantificada pela técnica de contagem em placa, a qual avalia a capacidade das células em crescer em meio apropriado, e conseqüentemente a população dos cultiváveis é determinada. A contagem de colônia em placa é o método convencional para quantificar a sobrevivência, entretanto, devido à baixa sensibilidade da técnica, a seleção de estirpes de *L. lactis* com maior tolerância ao processo de liofilização poderá ser dificultada. Assim, a utilização de métodos mais sensíveis e rápidos que forneçam informações a respeito da integridade celular tem sido uma alternativa em estudos onde a sobrevivência tem sido monitorada (Bouix & Ghorbal, 2012b).

A citometria de fluxo é um método rápido que analisa célula por célula, e que utiliza critérios de dispersão da luz e corantes fluorescentes específicos para obter informação quanto ao aspecto estrutural e funcional da célula, respectivamente (Susan & Nebe-Von-Caron, 2010). As subpopulações podem ser distinguidas com base nas distintas características de fluorescência ou pela dispersão da luz, a qual é relacionada com o volume celular, estrutura e propriedades da superfície. Muitos marcadores

fluorescentes têm sido usados para analisar diferentes parâmetros fisiológicos, tais como integridade da membrana (Soejima et al., 2012), atividade de enzimas intracelulares (Paparella et al., 2008), vitalidade celular (Michal et al., 2009), potencial de membrana (Xu et al., 2008) e pH intracelular (Marchetti et al., 2009). O kit de determinação de viabilidade Live/Dead (BacLight™, invitrogen) tem sido utilizado em combinação com o citômetro de fluxo para estimar o número de bactérias viáveis, e também a contagem total de bactéria (Kramer et al., 2009). O BacLight™ é composto de dois corantes que se ligam aos ácidos nucleicos, o corante Syto 9 que cora todas as células com fluorescência verde, enquanto o PI penetra somente em células com a integridade da membrana comprometida, corando as células com a fluorescência vermelha (Boulos et al., 1999).

Estirpes de *L. lactis* isoladas de material vegetal produzem compostos diferenciados associados ao *flavor*, o que não é observado com as estirpes isoladas de leite ou queijo. Além disso, essas estirpes tem demonstrado maior tolerância a condições de estresse osmótico, ocasionada pela presença de NaCl, e também maior tolerância a ambientes ácidos (Nomura et al., 2006). Entretanto, ainda não foi estudado se estirpes de *L. lactis* isoladas de material vegetal são mais tolerantes ao processo de liofilização. Assim diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar a tolerância a liofilização de estirpes de *L. lactis* isoladas de silagem e de leite por meio da técnica de citometria de fluxo. Além disso, utilizamos também a técnica de contagem em placa para avaliar a eficiência dos dois métodos na diferenciação de estirpes resistentes e sensíveis ao processo de liofilização.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Estirpes e condições de conservação

Cinco estirpes isoladas em diferentes fontes foram estudadas: *L. lactis* LVA. 2 (leite de vaca), *L. lactis* LBU.1 (leite de búfala), *L. lactis* LCA .5 (leite de cabra), *L. lactis* SBR .5 (silagem de capim) e *L. lactis* SAM. 12 (silagem de amendoim forrageiro). As estirpes foram cultivadas em caldo M17 suplementado com 0,5 % de glicose por 14 horas a 30 °C, em seguida inóculo de 1 % dessa cultura ativa foi adicionada em 10 mL do mesmo meio de cultivo e a cultura foi incubada a 30 °C por 7 horas. Alíquotas de 1 mL da cultura coletada no início da fase estacionária de crescimento foram centrifugadas (10.000 x g, 5 minutos, a 4 °C) e em seguida o sedimento de células obtido foi lavado duas vezes com água peptonada 0,1 % (p/v) e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 1 mL de água peptonada e estocado a – 80 °C por 3 horas. As amostras congeladas foram desidratadas em liofilizador (Enterprise II, Terroni[®]) por 7 horas. Amostras liofilizadas foram reconstituídas em 1 mL de água peptonada 0,1 % por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a reconstituição, as amostras foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo e contagem em placa.

2.2. Análise da integridade das células

2.2.1. Preparo das amostras controle

Para obtenção dos controles positivo e negativo, a cultura ativa de cada estirpe foi inoculada (inóculo de 1 %) em caldo M17 e incubada por 5 horas a 30 °C de modo a coletar as células frescas em fase de crescimento exponencial para obtenção do controle positivo. Alíquotas de 1 mL das células coletadas foram incubadas a 70 °C por 10 minutos de modo a obter células mortas como controle negativo. Diferentes proporções de células vivas e mortas foram misturadas para avaliar a capacidade dos corantes em discriminar célula vivas de células mortas.

2.2.2. Marcadores fluorescentes e procedimento de coloração

Os corantes fluorescentes Syto9 e PI do kit de viabilidade de bactéria LIVE/DEAD[®] BacLight[™] (Molecular probes, Invitrogen) foram utilizados, mas o protocolo de coloração fornecido pelo fabricante foi alterado em algumas etapas. Alíquotas das soluções estoque dos corantes Syto (3,34 mM) e PI (20 mM) foram

diluídas em solução salina 0,85 % (p/v), de modo a obter uma concentração do Syto9 e do PI de 0,83 mM e 5 mM, respectivamente. As células desidratadas reconstituídas em água peptonada 0,1 % foram diluídas em salina 0,85 % (p/v) de modo a alcançar 10^4 a 10^5 UFC.mL⁻¹. Alíquotas de 100 µL dessa suspensão de células diluídas foram adicionadas em 900 µL de salina 0,85 %, e 1,5 µL de cada corante foram adicionados. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente em local protegido da luz, e em seguida foram centrifugadas (13.000 x g, 3 minutos, 4 °C) e o sedimento formado foi resuspenso em 300 µL de salina 0,85 % (p/v) antes da análise em citômetro de fluxo.

2.2.3. Análise por citometria de fluxo

As análises pela técnica de citometria de fluxo foram realizadas em citômetro de fluxo Guava EasyCyte Plus[®]. O citômetro é equipado com laser de argônio que emite luz azul a 488 nm. A fluorescência vermelha das células coradas com PI e a fluorescência verde das células coradas com Syto9 foram detectadas pelos filtros 583/26 nm e 525/30 nm, respectivamente. A análise em citômetro de fluxo foi realizada usando escala logarítmica, as voltagens dos detectores foram ajustadas com células não coradas, e as compensações foram feitas com células marcadas com um único corante. Os gates nos gráficos de FSC/SSC foram usados para discriminar as bactérias. As análises foram realizadas utilizando fluxo baixo (0,24 µl seg.⁻¹), e os dados dos eventos (10.000 eventos por amostra, contados no gate definidor de bactérias em FSCxSSC) foram coletados e analisados usando Cytosoft 5.3 Guava[®].

2.2.4. Análise dos dados

Os dados foram coletados e analisados utilizando o programa Cytosoft 5.3 Guava[®]. As subpopulações foram identificadas utilizando gráfico de pontos. Os gates foram definidos nos gráficos de pontos de FSC *versus* SSC e de fluorescência verde *versus* fluorescência vermelha. Os dados foram analisados usando tabelas estatísticas que indicam o número e a porcentagem de células coradas determinadas por cada detector, bem como a intensidade de fluorescência de cada sinal de fluorescência, em cada gate ou região de interesse definidos.

2.3. Contagem em placa

A cultivabilidade das células liofilizadas foi avaliada por contagem em placa. Após várias diluições seriadas em salina 0,85 %, as diluições seriadas selecionadas foram plaqueadas em ágar M 17 de acordo com a técnica de microgotas (Morton, 2001) e incubadas a 30 °C por 24 horas. Os resultados obtidos são provenientes de três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise das estirpes liofilizadas pelo método de citometria de fluxo

3.1.1. Análise do controle positivo e negativo

A marcação das células frescas (Figura 1 a) e mortas pelo calor (70 ° C por 10 minutos) (Figura 1 b) com syto 9 foi avaliada .

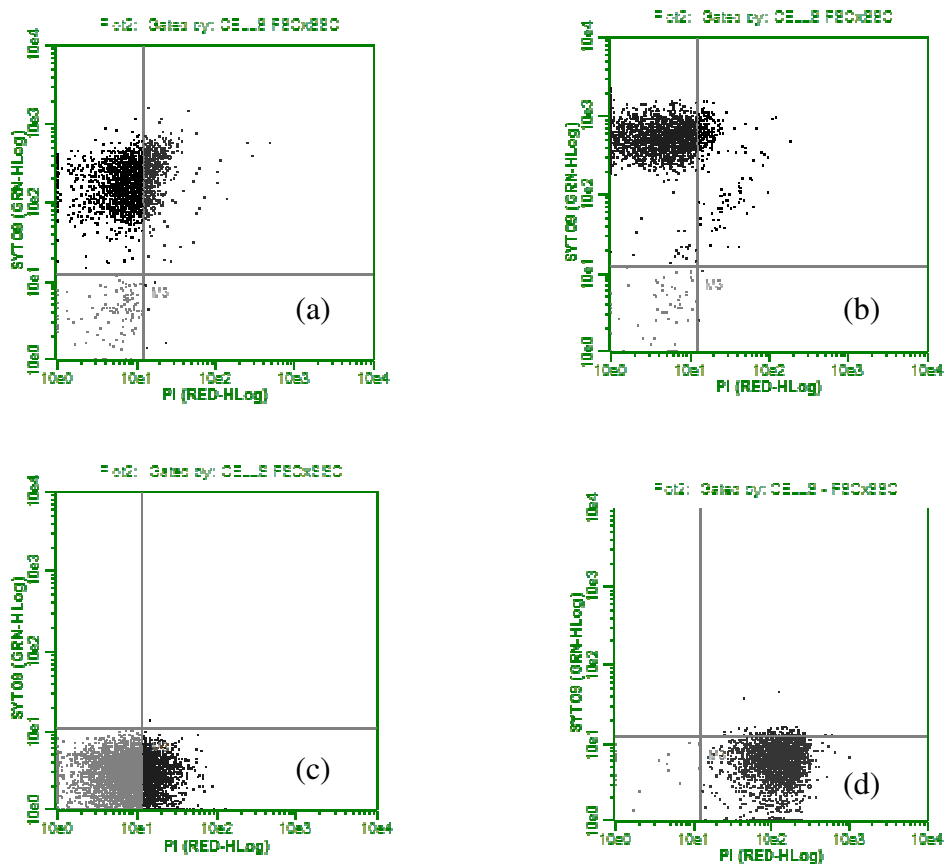


Figura 1 - Gráfico de pontos representando o sinal de fluorescência do Syto 9 e PI de *L. lactis* LVA. 2. Células frescas (a) e células mortas pelo calor (b) marcadas com Syto 9. Células frescas (c) e células mortas pelo calor (d) marcadas com PI.

A fluorescência verde foi observada nas células frescas e mortas pelo calor. Entretanto, a fluorescência verde em células mortas (Figura 1 b) ficou mais acentuada. Provavelmente em células mortas a sua entrada é facilitada, o que resulta em maior intensidade de fluorescência verde. Já com as células frescas marcadas com PI observou-se que parte dessa população foi marcada com PI, e a outra ficou sem marcação. Esperava-se obter células totalmente não marcadas, mas mesmo as células sendo coletadas na fase de crescimento exponencial é difícil ajustar adequadamente essa etapa, pois os próprios produtos do metabolismo da célula (ácido láctico, H_2O_2 , diacetil, bacteriocinas) podem comprometer a viabilidade das mesmas, e quando coradas com PI essa população de células é detectada. Resultado semelhante foi observado quando a suspensão de células frescas foi corada simultaneamente com syto 9 e PI (Figura 2 a). As células mortas coradas com os dois corantes apresentaram quase 100 % da população com marcação com fluorescência vermelha, sendo um resultado satisfatório (Figura 2 b). A detecção da proporção de células frescas (50 %) e mortas pelo calor (50 %) em uma mesma mistura, marcada simultaneamente com syto 9 e PI confirmou a capacidade discriminatória dos corantes na quantificação de células vivas e mortas (Figura 2 c).

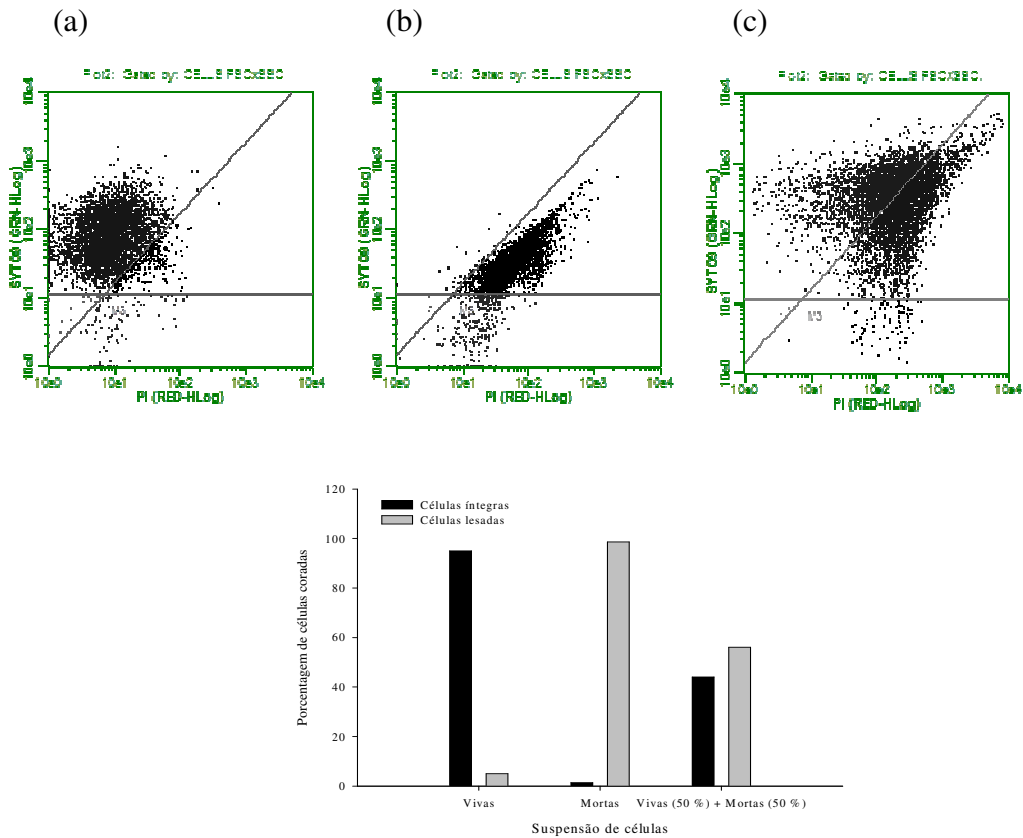


Figura 2 – Gráfico multiparamétrico obtido após a marcação dupla com Syto 9/ PI em células vivas frescas (a), células mortas frescas (b) e da mistura contendo células de *L. lactis* LVA. 2 mortas pelo calor (50 %) e frescas (50 %) (c).

Embora a proporção de células mortas tenha sido maior do que 50 % acredita-se que as células que sofreram algum tipo de dano durante o cultivo possam estar incluídas neste total. Apesar da interferência da complexidade do estado fisiológico das células durante o cultivo, a discriminação entre células vivas e mortas foi satisfatória nas amostras controles.

3.1.2. Determinação de células íntegras e lesadas de estirpes de *L. lactis* após a liofilização

Os corantes PI e syto 9 foram usados simultaneamente para avaliar a viabilidade de cinco estirpes de *L. lactis*, isoladas de diferentes fontes, após o processo de liofilização. A Figura 3 mostra a porcentagem de células marcadas com syto 9 (células íntegras) e com PI (células lesadas).

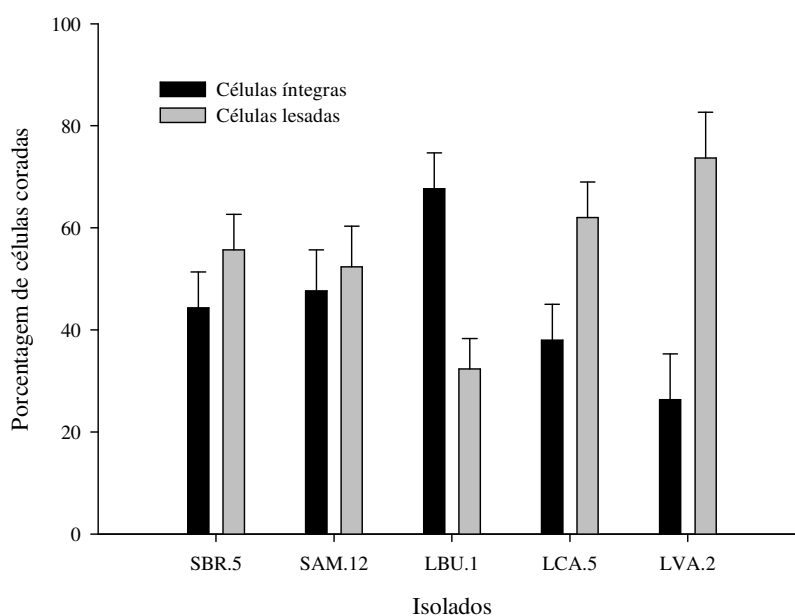


Figura 3 – Porcentagem de células íntegras e lesadas das cinco estirpes de *L. lactis* após o processo de liofilização, analisadas pelo método de citometria de fluxo. Os dados são valores médios de três repetições.

Diferenças aparentes foram observadas entre as cinco estirpes. A estirpe LBU. 1 foi a que apresentou maior porcentagem de células íntegras, enquanto a estirpe LVA. 2 apresentou a menor porcentagem de células íntegras. Neste estudo, as suspensões de células foram liofilizadas sem a adição de substâncias protetoras (açúcares, aminoácidos, polissacarídeos e substâncias complexas). A ausência dessas substâncias durante a liofilização pode ter facilitado a identificação de estirpes resistentes e sensíveis à liofilização. Além disso, pelo fato do corante PI não marcar necessariamente somente células mortas, mas também células com pequenos danos na membrana citoplasmática, isto acaba tornando a técnica de citometria de fluxo muito sensível, e consequentemente facilita a identificação de estirpes resistentes e sensíveis ao processo de liofilização (Novo et al., 2000).

As estirpes SBR. 5 e SAM. 12 isoladas de silagem de capim e de amendoim forrageiro, respectivamente, embora não sejam as mais tolerantes ao processo de liofilização, vale resaltar que a estirpe LBU. 1, isolada de leite de búfala, com maior tolerância ao processo de liofilização, não é uma fonte convencional para isolamento de estirpes de *L. lactis*. Mas a tolerância ao processo de liofilização das estirpes isoladas de silagem só foi comprovada quando comparada com as estirpes LVA. 2 e LCA. 5 que foram isoladas em ecossistemas convencionais, como leite de vaca e cabra, respectivamente. É possível, que as estirpes isoladas de silagem tenham sofrido seleção para mecanismos de resistência, decorrente das condições da planta, que podem ter contribuído assim com a tolerância ao processo de liofilização.

No geral, a porcentagem de células íntegras detectadas por citometria de fluxo foi baixa. Isto se deve provavelmente à ausência de substâncias crioprotetoras, e também pelo fato das células terem sido coletadas no início fase estacionária de crescimento. Normalmente células coletadas no final da fase estacionária, devido a condições de estresse nutricional, têm vários mecanismos de resistência ativados nessa condição, o que leva a um aumento na tolerância a várias outras condições de estresse, como por exemplo, durante o processo de liofilização (Morgan et al., 2006). Embora sejam estirpes diferentes, uma alta porcentagem de células íntegras foi alcançado com as estirpes de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 após terem sido coletadas no final da fase estacionária e liofilizadas em uma suspensão contendo sacarose (10 %) e glicose (10 %) (Kramer et al., 2009). Além desses fatores, as condições de reconstituição da cultura após o processo de

desidratação, como o tipo de meio para reconstituição das células, e também o tempo de reconstituição são fatores primordiais na recuperação da integridade das células (Muller et al., 2010), e que podem ter comprometido a obtenção de uma maior porcentagem de células íntegras. Além disso, pequenas lesões podem ser detectadas pela citometria, mas essas podem não comprometer a viabilidade da célula.

3.2. Análise por contagem em placa

Diante dos resultados obtidos com a contagem em placa (Figura 4), não foi possível observar relação entre as duas técnicas.

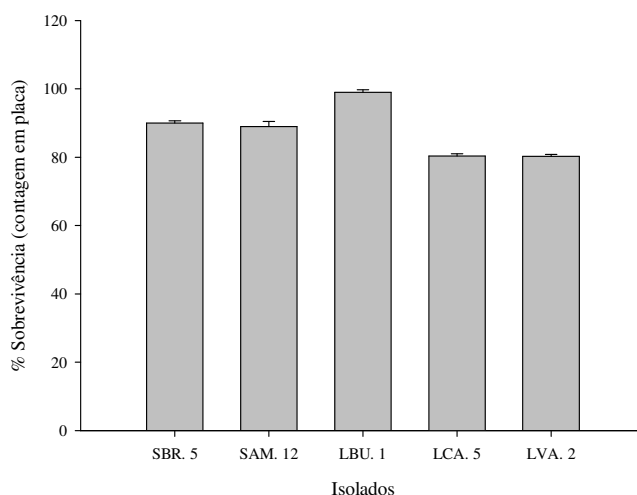


Figura 4 – Porcentagem de sobrevivência de estirpes de *L. lactis* após o processo de liofilização determinado pelo método de contagem em placa. Os resultados são valores médios provenientes de três repetições.

Uma alta porcentagem de células lesadas foi detectada pela técnica de citometria de fluxo, enquanto uma grande população de células se mostrou cultivável pelo método de contagem em placa. Alguns estudos têm verificado que uma fração das células marcadas com PI em uma população de células injuriadas, detectada pela técnica de citometria de fluxo, é capaz de crescer em placas com ágar (Papadimitriou et al., 2006). Isso acontece porque o PI é considerado um marcador sensível que marca as células

danificadas, e, portanto, sendo um indicador ruim para células mortas (Novo et al., 2000). Possivelmente, grande parte das células que foram marcadas com PI apresentavam danos reversíveis, e em condições ótimas de cultivo, foram capazes de se recuperar e crescer. Alguns estudos têm verificado para muitos micro-organismos alta relação entre o método de contagem em placa com o de citometria de fluxo (Bouix et al., 2001a; Bunthof et al., 2002b; Rault et al., 2007), enquanto, outros indicam que o método de análise por citometria de fluxo não é um indicador de cultivabilidade (Amor et al., 2002; Bunthof et al., 1999a). Essas variações podem estar relacionadas com as diferenças nas espécies e estirpes avaliadas, bem como dos corantes e equipamentos utilizados para as análises. No presente estudo, embora não tenha sido observada relação entre as duas técnicas, o perfil de sobrevivência entre as estirpes foi praticamente mantido quando comparado à porcentagem de células íntegras obtidas pelo método de citometria de fluxo. Os resultados da porcentagem de sobrevivência das cinco estirpes de *L. lactis*, alcançados a partir do método de contagem em placa ficaram muito próximos, o que dificulta a seleção de estirpes resistentes e sensíveis ao processo de liofilização.

4. CONCLUSÃO

A citometria de fluxo combinada com os corantes syto9/PI demonstrou ser um método sensível, por permitir a identificação de estirpes de *L. lactis* sensíveis e resistentes à liofilização. Acredita-se que a tolerância ao processo de liofilização observada pelas estirpes de *L. lactis* LBU. 1, SBR. 5 e SAM. 12 pode estar relacionada com a característica do ambiente em que foram isoladas. Além disso, é uma oportunidade para as indústrias de produção de culturas *starter* incorporarem essa técnica nas etapas do processo de produção de culturas, de modo a aperfeiçoar as condições operacionais de maneira mais ágil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amor, K. B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F. M., Akkermans, A. D., Vos, W. M., & Abee, T. (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during Bile Salt Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 5209-5216.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., & Desjardins, R. (1999). Live/Dead[®] BacLight[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal Microbiology Methods*, *37*, 77-86.
- Bouix, M. & Leveau, J. Y. (2001a). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, *107*, 217-225.
- Bouix, M., & Ghorbal, S. (2012b). Rapid enumeration of *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 1-7.
- Bunthof, C. J., Braak, V., Breeuwer, P., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1999a). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 3681-3689.
- Bunthof, C. J. & Abee, T. (2002b). Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairys starters. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 2934-2942.
- Coulibaly, I., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Fauconnier, M., Lognay, G., & Thonart, P. (2010). The resistance to *freeze-drying* and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*, 1-9.
- Kramer, M., Obermajer, N., Matijasic, B. B., Rogelj, I., & Kmetec, V. (2009). Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilized product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology Biotechnology*, *84*, 1137-1147.
- Marchetti, A., Lelong, E., & Cosson, P. (2009). A measure of endosomal pH by flow cytometry in *Dictyostelium*. *BMC Research Notes*, *2*, 7.
- Michal, K., Baszczyński, M., Lehnert, R., Mota, A., Teixeira, J. A., & Brányik, T. (2009). Flow cytometry for age assessment of a yeast population and its application in beer fermentations. *Journal of Institute of Brewing*, *115*, 253-258.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiology Methods*, *66*, 183-193.
- Morton, R. D. Aerobic plate count. In: Downes, F. P., Ito, K. (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. APHA, cap. 16, p. 1183-193.

- Muller, J. A. Stanton, C., Sybesma, W., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2010). Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. *Journal Applied Microbiology*, *108*, 1369-1379.
- Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., & Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology*, *101*, 396-405.
- Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H., & Shapiro, H. M. (2000). Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*, 827-834.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kleetsas, D., & Tsakalidou, E. (2006). Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *International Journal of Food Microbiology*, *111*, 197-205.
- Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., chaves-López, C., Serio, A., Marsilio, F., & Suzzi, G. (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *19*, 1174-1182.
- Pyar, H., & Peh, K. (2011). Effect cryoprotective agents on survival and stability of *Lactobacillus acidophilus* cultured in food-grade medium. *International Journal of Dairy Technology*, *64*, 578-584.
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J., & Bouix, M. (2007). Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freeze and during frozen storage. *Cryobiology*, *55*, 35-43.
- Selwal, K., Selwal, M., & Gandhi, D. N. (2011). Effect of freeze drying process on some properties of *Streptococcus thermophilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*, 1500-1505.
- Simões, C., Alakomi, H., Maukonen, J., & Saarela, M. (2010). Expression of *clpL1* and *clpL2* genes in *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 after exposure to acid and heat stress treatments or to freeze-drying. *Beneficial Microbes*, *1*, 253-257.
- Soejima, T., Minami, J., & Iwatsuki, K. (2012). The exclusive use of flow cytometry to evaluate the antibiotic-susceptibility. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1820*, 1980-1986.
- Susan, M., & Nebe-Von-Caron, G. (2010). Functional single-cell analyses: flow cytometry and sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology Revision*, *34*, 554-587.
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., & Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *107*, 167-177.

Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 174-179.

Capítulo 4 - Influência das condições de cultivo no acúmulo de glutatona, na expressão do gene *gshR* e na resistência ao processo de liofilização em *Lactococcus lactis* LVA. 2

RESUMO

A funcionalidade de glutathiona (GSH) após a liofilização e a influência das condições de cultivo sobre o acúmulo de GSH, expressão do gene *gshR* e também na viabilidade após a liofilização foram investigadas em *Lactococcus lactis* LVA. 2. A GSH não conferiu proteção aparente a *L. lactis* LVA. 2 após o processo de liofilização. O acúmulo de GSH nas condições de cultivo em meio anaeróbico, aeróbico sob agitação e aeróbico com adição de NaCl permitiram acúmulo de GSH mais acentuado do que o cultivo aeróbico estático, que é a condição de cultivo normalmente empregada. A expressão do gene *gshR* nas condições de cultivo em meio anaeróbico, aeróbico estático e aeróbico com agitação foram consistente em cada condição. Apesar de GSH não ter conferido uma proteção aparente a *L. lactis* LVA. 2 após o processo de liofilização, observou-se que a adição de NaCl ao meio suplementado com GSH favoreceu o acúmulo de GSH e aumentou a sobrevivência após o processo de liofilização. O fato de esta estirpe acumular GSH e apresentar o gene *gshR* já a torna uma estirpe promissora para enfrentar outras situações de estresse.

Palavras chaves: *Lactococcus lactis*, glutathiona reduzida, liofilização, sobrevivência.

1. INTRODUÇÃO

O processo de liofilização é o método mais utilizado na conservação de bactérias lácticas destinadas a produção de queijos, iogurtes e leites fermentados (Morgan et al., 2006). Apesar do processo de liofilização ser empregado para manter a viabilidade das bactérias por um longo período de estocagem, grande parte da viabilidade das células é comprometida. A liofilização expõe as células a condições de estresse devido ao congelamento, e também ao estresse osmótico ocasionado pela perda de água (Santivarangkna et al., 2008). Vários tratamentos são aplicados à suspensão de células com a finalidade de proteger dos danos ocasionados pela liofilização. A adição de substâncias crioprotetoras e a aplicação de tratamentos de estresse subletais tem sido os mais utilizados (Meng et al., 2008).

A glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine[GSH]) é um tripeptídeo encontrado em eucariotos, bactérias gram-negativas e em menor proporção em bactérias gram-positivas (Copley & Dhillon, 2002). A GSH é encontrada na célula na forma reduzida (GSH) e na forma oxidada (GSSG). Quando a célula é exposta a uma situação de estresse oxidativo uma maior proporção de GSSG é observada. Uma das principais funções de GSH na célula é a manutenção da homeostase intracelular. Além do acúmulo de GSH, é importante a presença da enzima glutathione reductase (gshR) que tem o papel de converter a GSSG em GSH para manter a homeostase intracelular (Jones, 2002).

Em algumas estirpes de *Lactococcus lactis* já foi constatado a capacidade de transportar GSH para o meio intracelular, e presença da enzima glutathione reductase (Li et al., 2003). A funcionalidade de GSH em *L. lactis* foi observada na proteção a condições de estresse oxidativo (Li et al., 2003), estresse ácido (Zhang et al., 2007) e em condições de estresse osmótico (Zhang et al., 2010a). Entretanto, a funcionalidade de GSH ainda não foi avaliada em *L. lactis* na proteção ao processo de liofilização.

Assim, diante do exposto o objetivo desse estudo foi avaliar se em *L. lactis* LVA. 2 GSH exerce efeito protetor ao processo de liofilização. Além disso, será avaliado o efeito de várias condições de cultivo no acúmulo de GSH, expressão do gene *gshR*, que codifica a enzima glutathione reductase, e a influência dessas condições de cultivo na resistência ao processo de liofilização.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Detecção de síntese e/ou transporte de GSH

L. lactis LVA. 2 é uma estirpe isolada de leite de vaca, pertencente a coleção de culturas do laboratório de Microbiologia Industrial da Universidade Federal de Viçosa. A cultura foi transferida do estoque a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para caldo M17 contendo 5 g / litro de glicose e incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 14 horas para obter a pré-cultura. A pré-cultura foi inoculada (1 %, v/v) em meio quimicamente definido (MQD) suplementado e não suplementado com GSH reduzida (Sigma-Aldrich Co., St Louis). A concentração final de GSH em MQD foi 2 mM, 4 mM e 6 mM. Os meios inoculados foram incubados estaticamente a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 horas. A composição detalhada do MQD é descrita por Li et al, 2003.

2.2. Condições de cultivo para caracterização fisiológica

Meio M17: M17 suplementado com GSH (concentração final de GSH 4mM) e sem suplementação com GSH foram incubados estaticamente e em agitador rotatório a 200 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 horas. Além dessas condições, foi preparado o meio M17 (suplementado e não suplementado com GSH) anaeróbio obtido pelo aquecimento e injeção de gás nitrogênio por 30 minutos. Os meios inoculados foram incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 horas.

Meio M17 suplementado com NaCl: o NaCl (concentração final no meio foi de 0,6 M) foi adicionado em meio M17 contendo GSH (concentração final de 4 mM) e sem GSH. A amostra suplementada com GSH e sem adição de NaCl foi utilizada como controle. Os meios inoculados foram incubados estaticamente a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 horas para os tratamentos sem NaCl, e para o tratamento com adição de NaCl o tempo de incubação foi de 10 horas para alcançar o início da fase estacionária. Vale ressaltar, que em todas as condições de cultivo as amostras foram coletadas no início da fase estacionária de crescimento.

2.3. Preparação do extrato livre de células

As células provenientes das diferentes condições de cultivo foram recuperadas por centrifugação ($8.000 \times g$, 10 minutos, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). O sedimento de células foi lavado duas vezes com tampão fosfato de potássio 0,1 M adicionado de EDTA (5mM), pH 7,5 (KPE) e resuspendido em 4 mL de KPE. Na suspensão de células foi adicionado esferas

de vidro (Sigma-Aldrich Co., St Louis) para as células serem rompidas em Precellys 24 (Bertin Technologies®, Bioamerica Inc.) a 4000 rpm por 15 segundos. Os extratos de células foram sedimentados por centrifugação por 10 minutos ($10.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), e o sobrenadante foi utilizado para avaliação de GSH. A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada utilizando o método de Lowry e a soro albumina bovina foi utilizada como padrão.

2.4. Avaliação de GSH

A quantificação de GSH total (forma reduzida, GSH, mais a forma oxidada, glutathiona dissulfido, [GSSG]) e GSSG foram determinadas pelo procedimento de reciclagem enzimática (Tietze, 1969), e a determinação da absorbância a 412 nm foi realizada em placa de microdiluição de 96 poços em leitor de Elisa (Biotek) (Rahman et al., 2006). A quantidade de GSH é calculada como a diferença entre a glutathiona total e GSSG (glutathiona total-GSSG = GSH). O conteúdo de glutathiona é expresso como nmol/mg de proteína de amostra.

2.5. Detecção do gene *gshR*

Para amplificação do gene *gshR* que codifica a proteína glutathiona redutase, foi desenhado o par de primers GSHRf/GSHRr com base na sequência de nucleotídeos de *L. lactis* subsp. *lactis* II1403 (NC_002662.2) que encontra-se disponível no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a seleção do *primer* foi utilizada a ferramenta *Primer-Blast*, disponível no NCBI e a qualidade dos mesmos foi verificada pelo programa *OligoAnalyzer* 3.1 (<http://www.idtdna.com>). O produto PCR obtido foi sequenciado. A sequência do primer encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizadas.

Gene	<i>Primer</i> (5'-3')	Tamanho do amplicon	Uso
<i>gshR</i>	GSHRf - TGATGGCAGTTGTCGAAGCC GSHRr - ATGAATCCCCTCACCTGCCA	917	PCR
<i>gshR</i>	GS912f - CGCTTGAATTTCCCGCTCA GS912r - TCGCTTCCAACCGCTTTAGCA	91	qRT-PCR
<i>gyrB</i>	GYRB4f - GGGATGATGTCCGCGAAGGA GYRB4r - TGTTGTCAAAGCTTCCGCAAAGA	143	qRT-PCR

2.6. Análise da expressão do gene *gshR*

As células de *L. lactis* LVA. 2 provenientes das condições de cultivo em meio M17 (cultivo estático, em agitador rotatório, em meio anaeróbio e com suplementação com NaCl) foram recuperadas por centrifugação a $8.000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. A extração de RNA total foi realizada com Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA foi determinada pelas determinações dos valores de absorvância a 260 e absorvância a 280 (em torno de, 1,8 a 2,0) em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), e a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese. O DNA genômico, contaminante presente no RNA total foi removido com o tratamento com RNase-free DNase (Promega, Madison, WI) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos, e o RNA resultante foi usado para sintetizar cDNA com a utilização do kit *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI), seguindo as instruções do fabricante.

A sequência parcial do gene *gshR*, previamente obtida por sequenciamento, foi utilizada para o desenho do par de primers GS912f/GS912r para avaliar a expressão do gene *gshR*. O par de primers GYRB4f/GYRB4r foi utilizado para avaliar a expressão do gene *gyrB*, que codifica a proteína DNA girase, utilizado como controle interno. Para a seleção do primer foi utilizado ferramentas do *GenScript Real-time PCR*, e a qualidade dos mesmos foi verificada pelo programa *OligoAnalyzer 3.1* (<http://www.idtdna.com>). As sequências dos primers encontram-se na Tabela 1.

Para avaliar a expressão do gene *gshR* a nível transcricional as análises quantitativas foram realizadas em termociclador CFX96TM Real-Time PCR detection systems – C100TM Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR supermix-UDG (Invitrogen) para monitorar a síntese de DNA fita dupla. A curva de melting foi analisada para verificar a ausência de amplificações não específicas do produto PCR. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, e os valores médios foram usados em outros cálculos. As eficiências de reação foram determinadas (Pfall, 2001; Bustin et al., 2005) e a especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação. A expressão do gene *gshR* foi normalizada usando a expressão do gene de controle interno (*gyrB*). A determinação da expressão relativa foi realizada método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

2.7. Liofilização

Alíquotas de 1 mL da cultura de *L. lactis* LVA.2 cultivadas em meio MQD e M17, sob diferentes condições de cultivo, foram centrifugadas a $10.000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. O sedimento formado foi lavado duas vezes com água peptonada 0,1 %, e o sedimento foi resuspendido em 1 mL de água peptonada e estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em liofilizador (Enterprise II, Terroni) por 7 horas. Após o processo de liofilização, as células desidratadas foram reconstituídas em 1 mL de água peptonada 0,1 % por 15 minutos a temperatura ambiente. Logo após a reconstituição, a viabilidade foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo.

2.8. Análise de células viáveis

A integridade das células após o processo de liofilização foi analisada com o uso de dois corantes que coram ácidos nucleicos em combinação com as análises de citometria de fluxo. Os corantes fluorescentes syto9 e iodeto de propídeo (PI) do kit de viabilidade de bactéria LIVE/DEAD[®] BacLight[™] (Molecular probes, Invitrogen) foram utilizados para essa finalidade. O syto9 cora o DNA de células vivas e lesadas. O PI cora somente o DNA de células com membrana comprometida. O protocolo de coloração das células fornecido pelo fabricante foi alterado em algumas etapas. Alíquotas das soluções estoque dos corantes Syto (3,34 mM) e PI (20 mM) foram diluídas em salina 0,85 %, de modo a obter uma concentração do Syto9 e do PI de 0,83 mM e 5 mM, respectivamente. As células desidratadas reconstituídas em água peptonada 0,1 % foram diluídas em salina 0,85 % de modo a alcançar 10^4 a 10^5 UFC mL^{-1} . Alíquotas de 100 μL dessa suspensão de células diluídas foram adicionadas em 900 μL de salina 0,85 %, e 1,5 μL de cada corante foram adicionados. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente em local protegido da luz, e em seguida foram centrifugadas ($13.000 \times g$, 3 minutos, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o sedimento formado foi resuspendido em 300 μL de salina 0,85 % antes da análise em citômetro de fluxo. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo Guava Easycyte Plus[®]. A fluorescência vermelha das células coradas com PI e a fluorescência verde das células coradas com syto9 foram detectadas pelos filtros 583/26 nm e 525/30 nm, respectivamente. Os gates nos gráficos de FSC/SSC foram usados para discriminar as bactérias. As análises foram realizadas utilizando fluxo baixo ($0,24\text{ }\mu\text{l seg.}^{-1}$), e os dados dos eventos (10.000

eventos por amostra, contados no gate definidor de bactérias em FSCxSSC) foram coletados e analisados usando Cytosoft 5.3 Guava[®]. Os resultados obtidos são provenientes de três repetições.

3. RESULTADOS

3.1. Presença de GSH em *L. lactis* LVA. 2

O conteúdo de GSH intracelular de *L. lactis* LVA. 2 cultivado em MQD sem suplementação e suplementado com GSH foi avaliado (Figura 1).

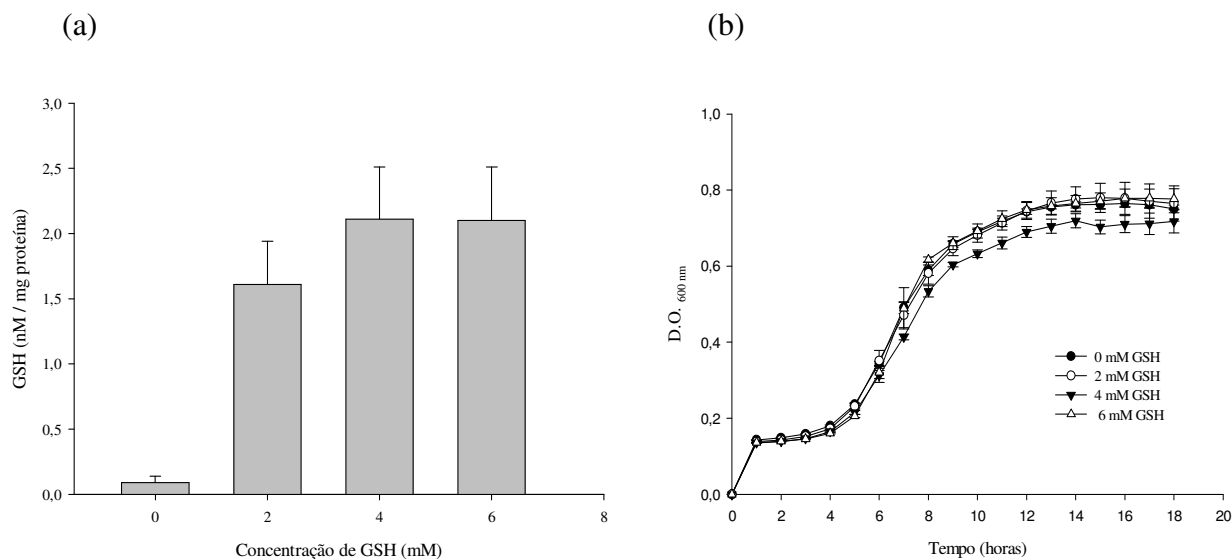


Figura 1 – Efeito da adição de diferentes concentrações de GSH em meio MQD sobre a concentração intracelular de GSH (a) e crescimento de *L. lactis* LVA. 2 (b) cultivado a 30 °C por 7 horas. A concentração de GSH intracelular e o crescimento celular foram determinados em espectrofotômetro pela medida da absorbância a 412 nm e 600 nm, respectivamente. Os valores médios são determinações de amostras provenientes de três repetições. As barras de erro indicam os desvios padrões.

A ausência de GSH intracelular em *L. lactis* LVA. 2 em MQD sem suplementação de GSH indica que esta estirpe não tem capacidade de sintetizar GSH, e somente tem capacidade de transportar quando MQD é suplementado com GSH (Figura 1 a). Observou-se também que quando a concentração final de GSH em MQD é 6 mM a célula acumula praticamente a mesma quantidade de GSH que foi observada no MQD a 4 mM de GSH. Além disso, essa estirpe não utiliza GSH do meio de cultivo como fonte de nutriente para seu crescimento (Figura 1 b).

3.2. Aumento da concentração de GSH intracelular

Diferentes condições de cultivo foram avaliadas para verificar o seu efeito na concentração de GSH intracelular em *L. lactis* LVA. 2 (Figura 2).

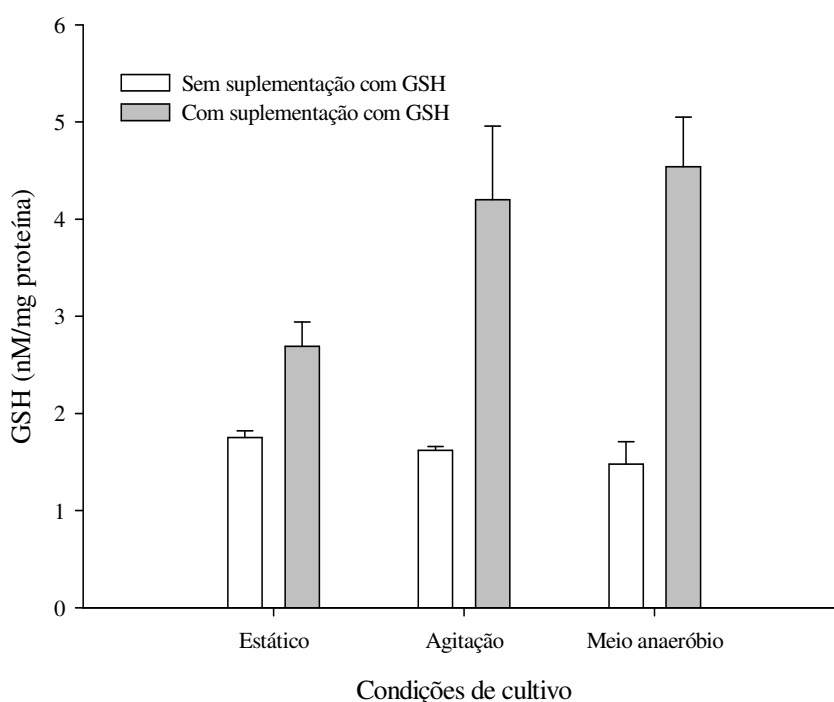


Figura 2 – Concentração intracelular de GSH em *L. lactis* LVA. 2 em meio M 17 sem suplementação e com suplementação com GSH. As células foram incubadas estaticamente e em agitador rotatório (200 rpm) a 30 °C por 7 horas. As células também foram inoculadas em meio M 17 anaeróbio incubado estaticamente a 30 °C por 7 horas. A concentração de GSH intracelular foi determinada em espectrofotômetro pela medida da absorbância a 412 nm. Os valores médios são determinações de amostras provenientes de três repetições. As barras de erro indicam os desvios padrões.

Baixa concentração de GSH intracelular foi obtida quando as células foram cultivadas em meio M17 sem suplementação de GSH, independente da condição de cultivo, não sendo observada uma diferença aparente. A suplementação do meio M17 com GSH proporcionou aumento nas três condições de cultivo, sendo que em meio anaeróbico e cultivo aeróbico em agitador rotatório a concentração de GSH intracelular foi mais acentuada. Como a condição de cultivo em M17 suplementado com GSH em condição aeróbia estática, que é a condição de cultivo normalmente empregada para *L. lactis*, não permitiu acúmulo acentuado de GSH intracelular, a adição de NaCl foi avaliada nessa condição. A adição de NaCl no meio M17 suplementado com GSH permitiu aumento na concentração de GSH intracelular, mas o mesmo não foi observado com o meio que não foi suplementado com GSH (Figura 3).

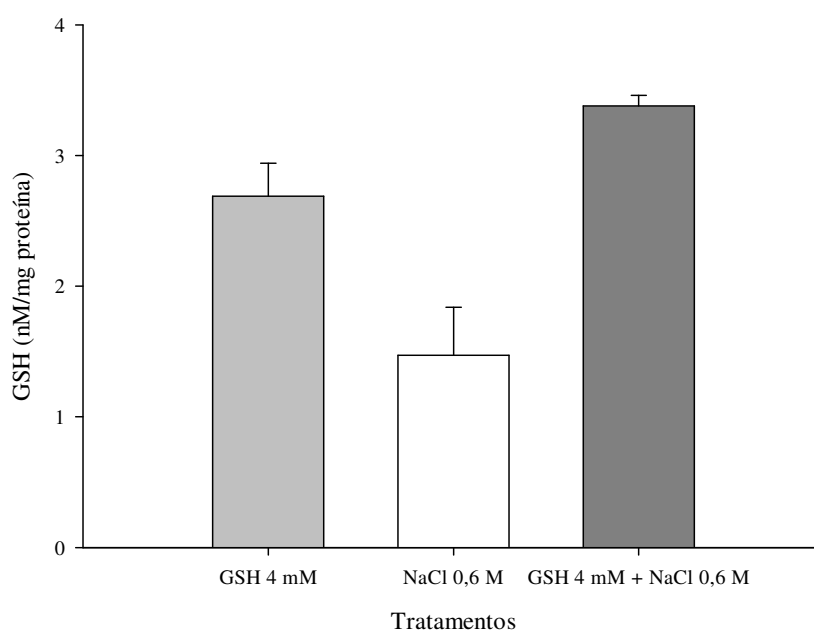


Figura 3 – Concentração intracelular de GSH em *L. lactis* LVA. 2 em meio M 17 sob condições de estresse osmótico ocasionado pela adição de NaCl. Os meios inoculados foram incubados estaticamente a 30 °C por 7 e por 10 horas quando o NaCl é adicionado. A concentração de GSH intracelular foi determinada em espectrofotômetro pela medida da absorbância a 412 nm. Os valores médios são determinações de amostras provenientes de três repetições. As barras de erro indicam os desvios padrões.

3.3. Expressão do gene *gshR* em diferentes condições de cultivo

A análise da expressão relativa por RT-qPCR do gene *gshR* foi avaliada para verificar se nas diferentes condições de cultivo em M17 suplementado com GSH a sua expressão é alterada. O cultivo de *L. lactis* LVA. 2 em diferentes condições de cultivo provocou alterações distintas na expressão relativa do gene *gshR* (Figura 4).

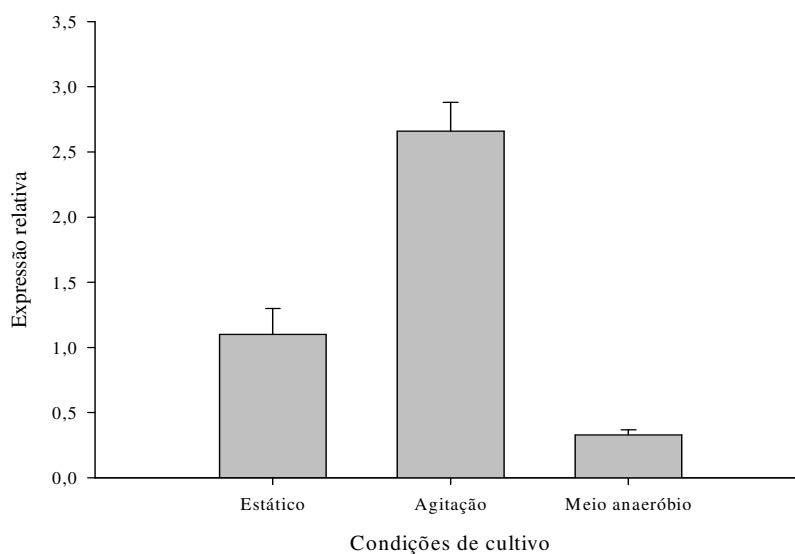


Figura 4 – Expressão relativa normalizada do gene *gshR* de *L. lactis* LVA. 2 em diferentes condições de cultivo em meio M 17 suplementado com GSH. O meio inoculado foi incubado a 30 °C por 7 horas. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

A expressão do gene em cultivo aeróbio sob agitação teve a sua expressão aumentada de 2 vezes em relação ao cultivo em condição aeróbia estática (controle), e teve a sua expressão aumentada 8 vezes em relação ao cultivo em meio anaeróbio. Além disso, a expressão do gene *gshR* foi afetada quando NaCl foi adicionado ao meio M17 suplementado com GSH (Figura 5).

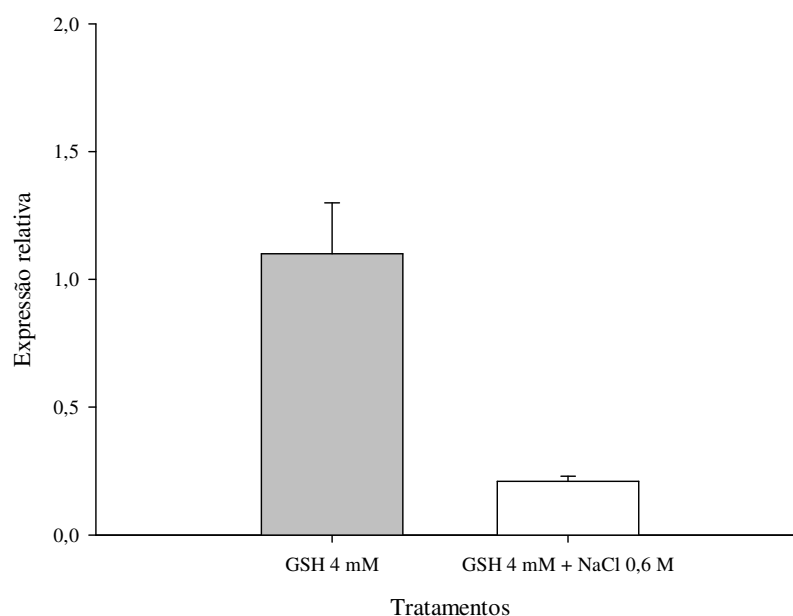


Figura 5 – Expressão relativa normalizada do gene *gshR* de *L. lactis* LVA. 2 em meio M 17 sob condições de estresse osmótico ocasionado pela adição de NaCl. O meio inoculado foi incubado a 30 °C por 7 horas, e por 10 horas quando NaCl foi adicionado. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

3.4. Avaliação da viabilidade

O PI e o syto9 foram usados simultaneamente para avaliar a viabilidade de *L. lactis* LVA. 2 antes e após a liofilização (Figura 6).

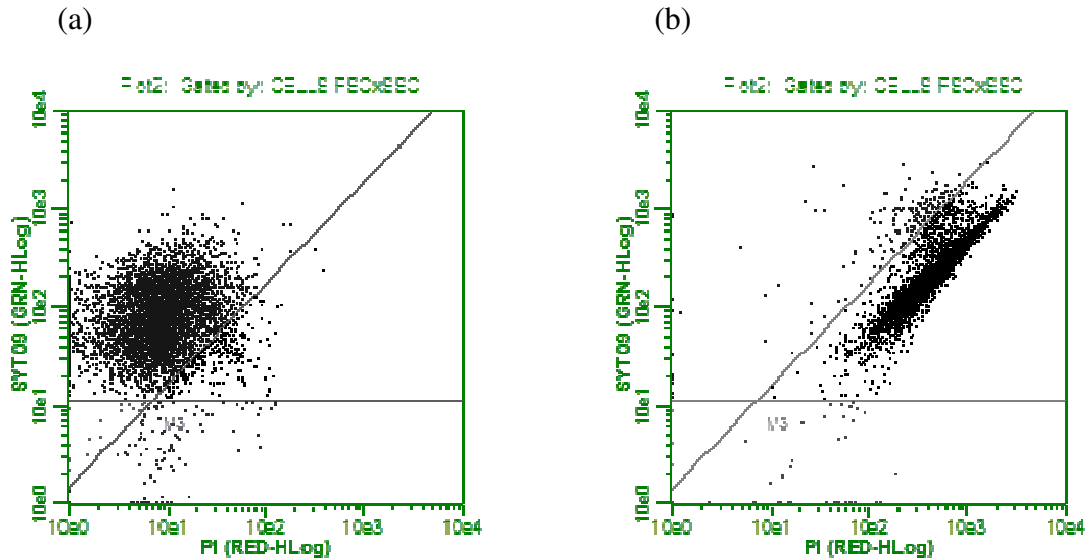


Figura 6 – Gráfico de pontos multiparamétrico obtido após a coloração dupla com syto9/PI na marcação de células de *L. lactis* LVA. 2 coletadas antes da liofilização (a) e após a liofilização.

Diferenças na distribuição da população de células foram observadas entre as populações de células antes da liofilização (Figura 6 a) e após a liofilização (Figura 6 b). Após o processo de liofilização, a maior parte da população de células é representada pela população de células lesadas.

Para investigar se o acúmulo de GSH por *L. lactis* LVA. 2 exerce efeito de proteção nas células submetidas ao processo de liofilização, o cultivo em MQD sem GSH e com GSH foi realizado. O acúmulo de GSH por *L. lactis* não proporcionou proteção aparente quando as células foram expostas ao processo de liofilização (Figura 7 a).

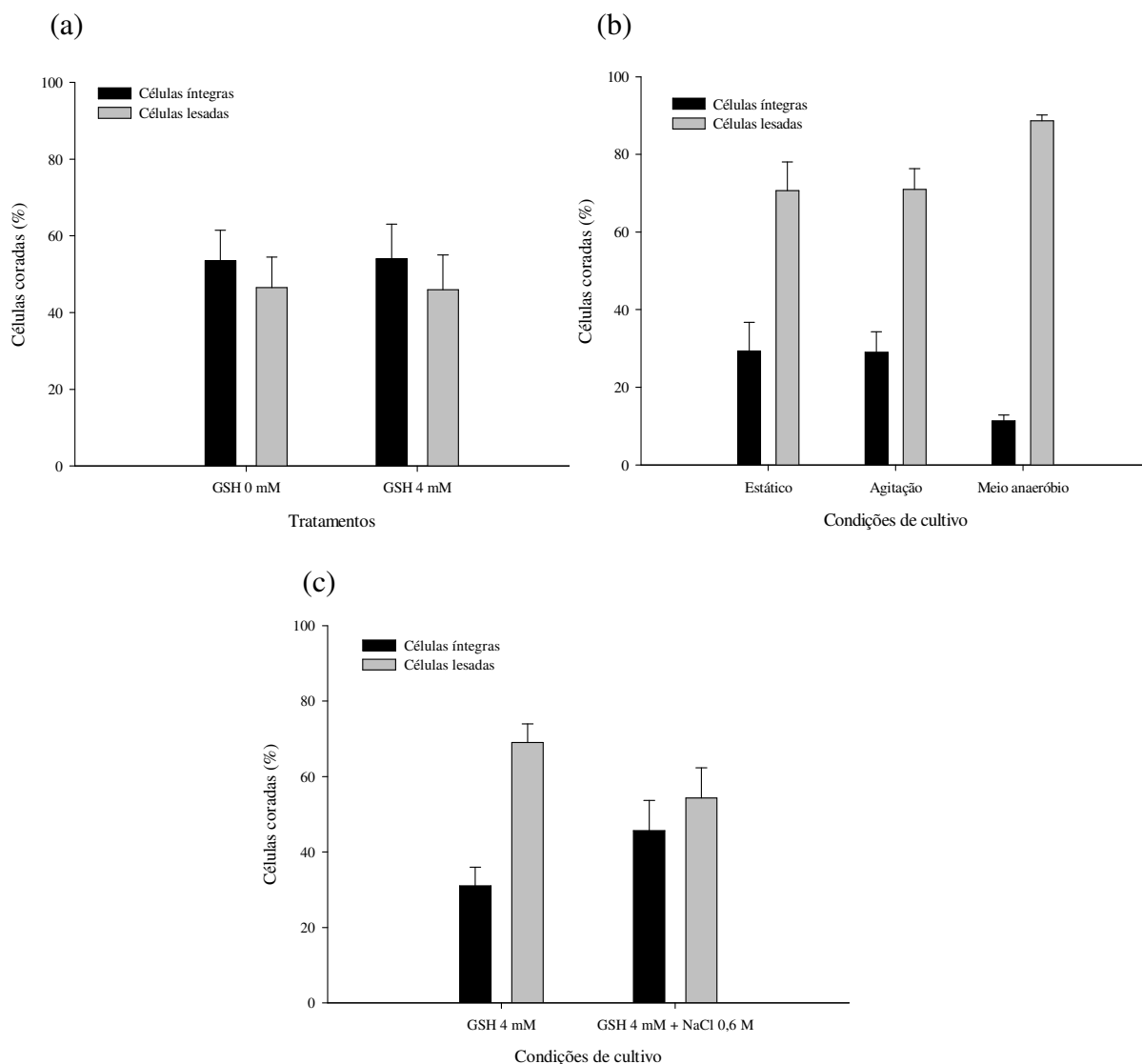


Figura 7 – Porcentagem de células íntegras e lesadas de *L. lactis* LVA. 2 após o processo de liofilização, analisadas pelo método de citometria de fluxo. As células foram cultivadas em meio MQD (sem suplementação e suplementação com GSH) (a), em M 17 suplementado com GSH (estático, agitação e em meio anaeróbio) (b) e em M 17 suplementado com GSH sem adição e com a adição de NaCl. Os dados são valores médios de três repetições.

Quando *L. lactis* foi cultivado em meio M17 suplementado com GSH em diferentes condições de cultivo, as células cultivadas em meio anaeróbio foram aparentemente mais sensíveis ao processo de liofilização, quando comparadas às células cultivadas em condição aeróbia estática e aeróbia sob agitação (Figura 7 b). Mas quando as células de *L. lactis* foram cultivadas em meio M17 suplementado com GSH e com adição de NaCl foi observado uma maior porcentagem de células íntegras é observada (Figura 7 c).

4. DISCUSSÃO

A seleção de estirpes de *L. lactis* que apresentam capacidade de transportar GSH do meio de cultivo para o meio intracelular tem sido visto como alternativa para obtenção de culturas *starter* com maior estabilidade da viabilidade quando exposta a condição de estresse (Pophaly et al., 2012). Na literatura não é mencionado a existência de estirpes de *L. lactis* com capacidade de biossíntese de GSH, mas somente com capacidade de transportar GSH para seu meio intracelular (Li et al., 2003). Pelo papel funcional que GSH exerce nas células, é interessante que GSH acumule na célula em grande quantidade para exercer o seu papel protetor. Assim, não é desejável o uso de estirpes que utilizam GSH como fonte de nutriente. Nas estirpes de *Streptococcus mutans* (Sherrill et al., 1998), *Lactococcus lactis* (Li et al., 2003) e de *Leuconostoc mesenteroides* (Kim et al., 2012) foi observado que GSH é consumido como fonte de cistéina durante o crescimento.

Para a obtenção de uma cultura desidratada (*freeze drying* ou *spray drying*) ou congelada que apresente maior proporção de células viáveis é importante otimizar as condições de cultivo do micro-organismo, de modo a proporcionar alterações fisiológicas favoráveis à célula, tornando-as mais resistentes a essas condições. O aumento observado no acúmulo de GSH em *L. lactis* LVA. 2 em condições de cultivo aeróbio sob agitação e aeróbio com adição de NaCl, parece atuar nas células como mecanismo regulatório de defesa quando as células estão expostas a condições de estresse. Em *Escherichia coli* já foi observado que o acúmulo de GSH é acentuado quando as células são expostas a condições hipertônica ocasionada pela presença de NaCl (McLaggan et al., 1990). O mesmo resultado não foi observado quando *L. lactis* LVA. 2 foi cultivado em condição aeróbia estática, que provavelmente devido a menor incorporação de oxigênio o mecanismo regulatório não necessita ser muito atuante. Entretanto, no caso do meio anaeróbio acreditamos que o grande acúmulo de GSH observado, seja devido o baixo consumo de GSH pelas células para manter a homeostase intracelular. Vale ressaltar, que já foi observado que algumas estirpes de *L. lactis* acumulam GSH em maior quantidade em meio anaeróbio do que em aeróbio estático, e vice-versa (Li et al., 2003).

O estado fisiológico das células de *L. lactis* LVA. 2 pode ser monitorado pela avaliação da expressão do gene *gshR*. Já foi demonstrado que a presença ou ausência de GSH não influencia a atividade da enzima *gshR* (Li et al, 2003). Assim, neste estudo o

fator que provavelmente levou a alteração na expressão do gene *gshR* foi a concentração de oxigênio presente no meio de cultivo. Logo, em cultivo aeróbio sob agitação é esperado que o gene tivesse a sua expressão aumentada, e em meio anaeróbio a sua expressão reduzida. Já as células de *L. lactis* LVA. 2 cultivadas em condições de estresse osmótico possivelmente o gene *gshR* possa ter sido reprimido pela adição de NaCl ao meio.

A GSH parece não exercer nenhum mecanismo de proteção na membrana plasmática de *L. lactis* LVA. 2 durante a liofilização. Na literatura não há referência de nenhum trabalho em que foi avaliado o efeito protetor de GSH em *L. lactis* após a liofilização, sendo somente avaliado e comprovado o efeito protetor de GSH na estirpe *Lactobacillus sanfranciscensis* (Zhang et al., 2010b). Como a estirpe de *L. sanfranciscensis* é muito sensível ao processo de liofilização, talvez isso possa ter favorecido a visualização do efeito protetor conferido por GSH. Entretanto, acreditamos que GSH possa ter conferido um tipo de proteção por regulação fisiológica, como foi observado em *L. sanfranciscensis* (Zhang et al., 2010c), não sendo possível observar em *L. lactis* LVA. 2 essa proteção imediatamente após a liofilização. Pelo fato de ter sido utilizado a citometria de fluxo, uma técnica muito sensível, que em combinação com corantes avalia a integridade da membrana das células, pode-se inferir que GSH não exerce nenhum efeito de proteção a membrana em relação aos danos ocasionados pela formação de cristais de gelo e do estresse osmótico. O mesmo resultado também foi observado pela técnica de contagem em placa (dados não mostrados).

Apesar do meio anaeróbio ter proporcionado melhor condição de cultivo para *L. lactis* LVA. 2, a ausência de oxigênio durante o cultivo pode ter inativado alguns mecanismos envolvidos na proteção ao processo de liofilização. No caso das células expostas ao estresse osmótico ocasionado pela presença de NaCl, já é conhecido que nessa condição as células apresentem modificações no perfil de ácido graxo da membrana (Guillot et al., 2000), o que possivelmente foi o fator que contribuiu com o aumento da resistência ao processo de liofilização.

5. CONCLUSÃO

Embora GSH não tenha conferido uma proteção aparente a *L. lactis* LVA. 2 após o processo de liofilização, conclui-se que a adição de NaCl ao meio suplementado com GSH além de favorecer o acúmulo de GSH também aumentou a sobrevivência após o processo de liofilização. O fato de esta estirpe acumular GSH e apresentar o gene *gshR* a torna uma estirpe promissora para enfrentar outras situações de estresse, onde a funcionalidade de GSH já foi confirmada em outras estirpes de *L. lactis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W.(2005). Quantitative real-time RT-PCR –a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34,597-601.
- Copley, S. D. & Dhillon, J. K. (2002). Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biology* 3, 1–16.
- Guillot, A., Obis, D., Mistou, M. (2000). Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Food Microbiology* 55, 47-51.
- Jones, D. P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods in Enzymology* 348, 93–112.
- Kim, J. E., Eom, H., Kim, Y., Ahn, J. E., Kim, J. H., Han, N. S. (2012). Enhancing acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* with glutathione. *Biotechnology Letter* 34, 683-687.
- Lin, Y., Hugenholtz, J., Abee, T., Molenaar, D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5739 – 5745.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Mclaggan, D., Logan, T. M., Lynn, D. G., Epstein, W. (1990). Involvement of gamma-glutamylpeptides in osmoadaptation of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology* 172, 3631-3636.
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106, 1406 – 1416.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiology Methods*, 66, 183-193.
- Pfaffl, M. W. A. (2001). A new mathematic model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 45-53.
- Pophaly, S. D., Singh, R., Pophaly, S. D., Kaushik, J. K., Tomar, K. (2012). Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 11, 1 – 14.
- Rahman, I., Kodel, A., Biswas (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature* 1, 3159-3165.

- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1 -13.
- Sherrill, C & Fahey, R. C. (1998) Import and metabolism of glutathione by *Streptococcus mutans*. *Journal Bacteriology* 180, 1454–1459.
- Tietze, F. (1969). Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Annual Biochemical* 27, 502-522.
- Zhang, J., Fu, R., Hugenholtz, J., Li, Y., Chen, J. (2007). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5268 – 5275.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Zhu, Y., Mao, S., Li, Y. (2010 a). Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3177 – 3186.
- Zhang, J., Du, G., Zhang, Y., Liao, X., Wang, M., Chen, J. (2010 b). Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2989 -2996.
- Zhang, J., Li, Y., Chen, W., Du, G., Chen, J. (2010 c). Glutathione improves the cold resistance of *Lactobacillus sanfranciscensis* by physiological regulation. *Food Microbiology* 31, 285-292.

CONCLUSÃO GERAL

Lactococcus lactis, amplamente usado em produtos fermentados lácteos, é também distribuído em ecossistemas aparentemente diversos. Essa diversidade de ecossistemas influi na diversidade de estirpes, inclusive afetando suas exigências de condições de cultivo e sua resistência a processos de conservação. Demonstra-se aqui, a necessidade de diversificar meios e métodos de isolamento uma vez que resultados de métodos independentes de cultivo demonstram aparentemente presença de mais estirpes que as isoladas em meio M17. A temperatura de incubação também afetou o isolamento, pelo menos no caso do leite de búfala. A exploração eficaz de novos ecossistemas na busca de estirpes diversas dependerá da otimização de métodos de cultivo. Os métodos moleculares, a exemplo do DGGE, poderão servir de baliza para essa busca.

A citometria de fluxo apresenta-se como alternativa ao método de contagem em placa, podendo-se supor que possa ser calibrado e padronizado para o controle de qualidade na produção de culturas *starter*.

Os resultados do efeito da glutatona sobre a resistência à liofilização indica que esse não é o mecanismo óbvio na única linhagem que acumula glutatona entre todos os isolados. Outro papel para esse composto deve ser procurado, uma vez que a glutatona foi assimilada e não foi utilizada como fonte de nutriente.

No geral, a diversidade desejada de características com impacto tecnológico em novas estirpes de *Lactococcus lactis*, justifica a execução autorizada da continuidade deste projeto.