

LISIANE LOPES DA CONCEIÇÃO

**COMPORTAMENTO DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 SOB  
CONDIÇÕES PREVALECENTES NO TRATO GASTROINTESTINAL  
HUMANO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

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

T

C744c  
2012

Conceição, Lisiane Lopes da, 1986-  
Comportamento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20  
sob condições prevalentes no trato gastrointestinal  
humano / Lisiane Lopes da Conceição. – Viçosa, MG, 2012.  
ix, 48f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 39-48

1. *Lactobacillus delbrueckii*. 2. Probióticos. 3. Nutrição.  
4. Genômica. 5. Stress (Fisiologia). I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

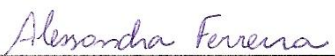
CDD 22. ed. 630.27937


LISIANE LOPES DA CONCEIÇÃO

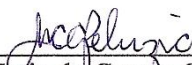
**COMPORTAMENTO DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 SOB  
CONDIÇÕES PREVALECENTES NO TRATO GASTROINTESTINAL  
HUMANO**

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

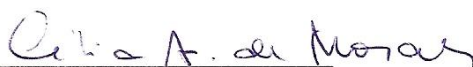
APROVADA: 03 de julho de 2012.

  
Dr<sup>a</sup> Alessandra Barbosa Ferreira  
(Coorientadora)

  
Prof. Arnaldo Chaer Borges  
(Coorientador)

  
Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo Gouveia Peluzio

  
Prof<sup>a</sup> Poliane Alfenas Zerbini

  
Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

Aos meus pais, Gilcemir e Maria do Carmo

Ao meu irmão, Gilcemir

Ao meu namorado, Weberson

Dedico

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação e, especialmente pela confiança em meu trabalho.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, meu coorientador, pelos conselhos e pelo incentivo constante.

À Dra. Alessandra Barbosa Ferreira, minha coorientadora, pela orientação durante os experimentos, pela ajuda constante, sugestões e participação na banca de defesa.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela participação na banca de defesa.

À professora Poliane Alfenas Zerbini, pela participação na banca de defesa. A Nilcéia e a Aline pela ajuda constante.

Aos funcionários Paulo, Danilo e Evandro pela colaboração diária.

Aos colegas dos laboratórios do departamento de Microbiologia.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Industrial, Eliana, Fernanda Souza, Fernanda Bruckner, Samira, Marcelo, pelo apoio nessa etapa importante da minha vida.

Aos colegas do laboratório de Virologia Renan e André, pelo suporte durante a execução deste projeto.

Ao meu namorado Weberson, pela paciência, companheirismo e incentivo no decorrer deste trabalho.

Aos meus familiares, principalmente aos meus pais e irmão, pela torcida para que eu atingisse esse objetivo importante.

Em especial, agradeço as minhas amigas, Sarah, Roberta, Tatiana, Samira, Juliana Lelis, Morghana, Ana Paula, Alejara, Naiara, Fernanda Drumond, Camila, Earline pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos, mesmo na distância.

## **BIOGRAFIA**

LISIANE LOPES DA CONCEIÇÃO, filha de Gilcemir Angelo da Conceição e Maria do Carmo Duarte Lopes da Conceição, nasceu no dia três de novembro de 1986 em Viçosa, estado de Minas Gerais.

Em março de 2005, ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Nutricionista em janeiro de 2010.

Em agosto de 2010, iniciou, na mesma instituição, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Micro-organismo e condições de cultivo.....	14
3.2 Produção de leite fermentado contendo células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	14
3.3 Simulação das condições prevalentes no trato gastrointestinal humano.....	15
3.3.1 Condição gástrica simulada.....	15
3.3.2 Condição intestinal simulada.....	15
3.4 Extração de DNA total de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	15
3.5 Seleção dos genes, construção e seleção de <i>primers</i> .....	16
3.6 Detecção dos genes de interesse em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 por PCR.....	16
3.7 Clonagem e sequenciamento dos genes detectados em <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20.....	17
3.8 PCR inversa.....	18
3.9 Análise comparativa de genes e Análise filogenética .....	19
3.10 Análise da expressão do gene <i>fbpA</i> por PCR em tempo real.....	19
3.10.1 Condição de cultivo de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 para extração de RNA.....	19
3.10.2 Extração de RNA.....	19
3.10.3 Obtenção de cDNA.....	20
3.10.4 PCR em tempo real.....	20
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Sobrevivência às condições prevalentes no trato gastrointestinal humano.....	22

4.2 Genes selecionados à adesão em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	33
5.CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## RESUMO

CONCEIÇÃO, Lisiane Lopes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Comportamento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 sob condições prevalentes no trato gastrointestinal humano.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Coorientadores: Arnaldo Chaer Borges e Alessandra Barbosa Ferreira.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* são habitam do trato gastrointestinal humano (TGH) e espécies como *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, isolado a partir de fezes de criança alimentada exclusivamente com leite materno, apresentam características fisiológicas, tecnológicas, imunológicas e genéticas desejáveis e necessárias à probiose. O objetivo deste trabalho foi estudar a tolerância de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao suco gástrico e intestinal simulado quando incorporado a uma matriz alimentar, leite fermentado, e também a expressão do gene *fbpA* que codifica a proteína de ligação a fibronectina, envolvida na adesão ao trato gastrointestinal humano. Os resultados mostraram que *L. delbrueckii* UFV H2b20 é capaz de manter sua viabilidade em níveis superiores  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> após 28 dias de estocagem refrigerada. Quando submetida às condições prevalentes no TGH detectou-se que a matriz alimentar avaliada, o leite fermentado, conferiu proteção.. Após o décimo quarto dia de experimento, não houve sobrevivência expressiva ao suco intestinal simulado. O gene *fbpA* foi identificado por PCR e sequenciamento. Este gene se agrupou com os ortólogos de bactérias probióticas. No entanto, a exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 incorporadas em leite fermentado, por 240 minutos às condições prevalentes no TGH provocou redução da expressão desse gene, detectado por RT-PCR. A confirmação do envolvimento desse gene sob condições de estresse, na adesão a compartimentos do TGH continua dependente de estudos com mutantes da bactéria.

## ABSTRACT

CONCEIÇÃO, Lisiane Lopes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Behavior of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 under conditions prevailing in the human gastrointestinal tract.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-advisers: Arnaldo Chaer Borges and Alessandra Barbosa Ferreira.

Bacteria of the genus *Lactobacillus* are inhabit the human gastrointestinal tract (GHT) and species such as *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20, isolated from feces of infant exclusively fed breast milk, have physiological characteristics, technology, immunological and genetic desirable and necessary to probiose. The objective of this work was to study the tolerance of *L. delbrueckii* UFV H2b20 to gastric juice and simulated intestinal when incorporated in a food matrix, fermented milk, and also the expression of the gene encoding the *fbpA*, binding protein fibronectin, involved in adhesion to the human gastrointestinal tract. The results showed that *L. delbrueckii* UFV H2b20 is able to maintain its viability at levels above  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> after 28 days of storage. When subjected to the conditions prevailing in TGH found that the food matrix evaluated, the fermented milk, confer protection. After the fourteenth day of the experiment, no significant survival in simulated intestinal juice. The *fbpA* gene was identified by PCR and sequencing. This gene is clustered with the orthologs of probiotic bacteria. However, exposure of cells of *L. delbrueckii* UFV H2B20 incorporated in fermented milk, for 240 minutes to the conditions prevailing in TGH caused reduced expression of this gene, detected by RT-PCR. Confirmation of the involvement of this gene under stress conditions, in adherence to the TGH compartments remains dependent on studies with mutant bacteria.



## 1.INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (REID et al., 2003). Bactérias do gênero *Lactobacillus* habitam o trato gastrointestinal humano (TGH) e espécies, como *L. delbrueckii* UFV H2b20 isolado a partir de fezes de criança recém-nascida alimentada exclusivamente com leite materno, apresentam características fisiológicas, tecnológicas, imunológicas e genéticas desejáveis e necessárias à probiose. A incorporação de tais micro-organismos a uma matriz alimentar demanda estudos sobre a sobrevivência às condições de processamento industrial, estocagem do produto e condições de estresse impostas durante o trânsito através dos compartimentos do trato gastrointestinal, até atingirem o seu sítio de ação (LEVERRIER, et al. 2005; BRON & KLEEREBEZEM, 2011). A adesão desempenha um papel importante na persistência de uma linhagem particular no trato digestivo, na modulação de respostas na célula hospedeira e na exclusão de patógenos (VÉLEZ et al., 2007).

Atualmente, duas abordagens adicionais têm sido adotadas na seleção de bactérias probióticas: avaliação *in vitro* da funcionalidade e a análise genômica. Dentro deste contexto, a análise da funcionalidade se refere ao tipo de resposta modulada pelo micro-organismo, ao passo que a análise genômica é uma ferramenta nova e promissora na seleção de linhagens probióticas, em razão do crescente número de sequências atualmente disponíveis e que auxiliam na predição das atividades funcionais dos probióticos (MORELLI, 2007). Os estudos da genômica contribuem fortemente para a compreensão do comportamento das bactérias do ácido láctico em seus diferentes habitats, bem como as suas capacidades de lidar com situações específicas de estresse (BRON & KLEEREBEZEM, 2011).

Para melhorar a aplicação de probióticos na promoção da saúde humana é importante compreender efetivamente seu modo de ação. O campo de pesquisa da interação entre o hospedeiro–probiótico tem avançado, mas ainda exige uma caracterização completa e detalhada das moléculas imunomoduladoras do probiótico em relação às respostas moleculares e fisiológicas que podem provocar no hospedeiro (BRON et al., 2012). Objetivou-se com este trabalho estudar a tolerância de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando incorporada a uma matriz alimentar, leite fermentado, ao suco gástrico e intestinal simulado, para reproduzir condições similares as prevalentes no TGH, e também sobre o gene *fbpA* que codifica a proteína de ligação a fibronectina, envolvida na adesão ao trato gastrointestinal humano.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os *Lactobacillus* pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico (LAB) que sintetizam ácido láctico como principal ou único produto de fermentação. O gênero compreende um grupo de bactérias heterogêneo, com baixo conteúdo G+C, o qual varia de 33 a 51 %, constituído por bacilos não esporulantes e cocos, ambos Gram-positivos, anaeróbios ou aerotolerantes e nutricionalmente fastidiosos. Taxonomicamente, o gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae (LUDWIG et al., 2009; KANT et al., 2010).

*Lactobacillus* é o gênero com maior número de espécies no grupo das LAB e apresentam uma ampla diversidade filogenética e funcional. Atualmente, inclui 154 espécies reconhecidas, sendo *Lactobacillus delbrueckii* uma espécie de relevância tecnológica na indústria de produtos fermentados do leite (SUÁREZ et al., 2009; KANT et al., 2010; KLEEREBEZEM et al., 2010).

Atualmente, a indústria utiliza essas bactérias na produção de alimentos fermentados, como ingrediente bioativo, pois estes micro-organismos contribuem na preservação da matéria-prima devido a acidificação, além de sua capacidade de contribuir com as características finais do produto como sabor e textura (KLEEREBEZEM et al., 2010).

Dentre os treze gêneros que compreendem as LAB dois se destacam em relação à atividade probiótica: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. A capacidade de crescer em produtos lácteos, sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal, como pH ácido do estômago e a presença de bile no duodeno, e aderir às células do epitélio intestinal constituem critérios utilizados na seleção de micro-organismos potencialmente probióticos (ALTERMANN et al., 2005;

PACHECO et al., 2010; ANDERSON et al. 2010). A espécie *Lactobacillus delbrueckii* apresenta três subespécies: *delbrueckii*, *bulgaricus* e *lactis* que apresentam diferentes padrões de fermentação e habitat, sendo que o primeiro coloniza fontes vegetais, enquanto que os outros fazem parte da microbiota do leite (GERMOND et al., 2003).

As bactérias lácticas probióticas conferem proteção contra patógenos, possivelmente dificultando a adesão destes e de toxinas às células epiteliais intestinais (BORCHERS et al., 2009); produzindo metabólitos com ação antimicrobiana (MISHRA & LAMBERT, 1996), estimulando o sistema imune (BORCHERS et al., 2009), e/ou prevenindo doenças ligadas ao trato gastrointestinal, como intolerância à lactose, diarreia e constipação (OUWEHAND & SALMINEN, 1998).

Existe uma grande discrepância na taxonomia dentro do gênero *Lactobacillus* devido a não correlação entre os resultados obtidos por testes fenotípicos tradicionais e os filogenéticos. A utilização de técnicas moleculares tem permitido nova classificação de vários micro-organismos (MAGALHÃES et al., 2008; KANT et al., 2010).

O *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi isolado a partir de fezes de criança alimentada exclusivamente com leite materno (SANTOS, 1984), sendo caracterizada como homofermentativa, catalase negativa, Gram-positiva, com temperatura de crescimento entre 15 °C e 37 °C, produtora de substâncias antimicrobianas, como o peróxido de hidrogênio, em quantidades suficientes para inibir o crescimento de patógenos e de deterioradores de alimentos (SANTOS, 1984; RIBEIRO, 1995; MONTEIRO, 1999).

Esta linhagem foi originalmente considerada *L. acidophilus* em virtude do seu perfil de fermentação de açúcares e da origem no trato digestivo humano, no entanto, após a análise da sequência do gene 16S rDNA e ensaios de hibridização DNA-DNA passou a ser classificada como *L. delbrueckii*, pois apresenta valores de reassociação de DNA acima de 75% para *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* que indicam que as linhagens pertencem a uma mesma espécie (MAGALHÃES et al., 2008).

Os estudos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Industrial da UFV demonstraram que *L. delbrueckii* UFV H2b20 possui características fisiológicas,

tecnológicas e genéticas desejáveis à probiose, pois apresenta capacidade de tolerar às condições gastrointestinais simuladas: ácido clorídrico, sais biliares, lisozima, e ao estresse oxidativo (SANTOS, 1984; AGOSTINHO 1988; SILVA, 2007; LEITE, 2008; FLORESTA, 2008; FERREIRA, 2011). Possui vários genes que codificam proteínas necessárias a um eficiente sistema proteolítico, o que pode favorecer seu crescimento em leite (DO CARMO et al., 2011). Esta bactéria mostrou-se capaz de colonizar o trato gastrointestinal e estimular a resposta imune não específica em camundongos suíços livres de germe (NEUMANN et al., 1998), além de proteger estes camundongos contra a infecção por *L. monocytogenes* (SANTOS et al., 2011). Apresentou, ainda, resistência a vários antimicrobianos (FERREIRA, 2006) e quando suas células são submetidas a tratamento térmico e ácido, preliminar, há aumento na sobrevivência delas ao processo de congelamento, bem como ao de desidratação, por liofilização ou *spray-drying* (FURTADO, 2001; DO CARMO, 2006; LEANDRO, 2009).

Probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (REID et al., 2003). Estes micro-organismos devem ser seguros e capazes de sobreviver às condições de processamento industrial e estocagem, que incluem os estresses oxidativos, osmótico, temperatura e/ou uso de solventes, bem como ao processo de liofilização; além das várias condições de estresse impostas durante o trânsito através das diferentes partes do trato gastrointestinal do consumidor até atingirem o seu sítio de ação, aos quais podemos destacar pH gástrico baixo, exposição no duodeno às enzimas digestivas e à bile, elevada competição microbiana e osmolaridade no cólon (LEVERRIER, et al. 2005, ANDERSON et al. 2010; BRON & KLEEREBEZEM, 2011).

Atualmente, duas abordagens adicionais têm sido adotadas na seleção de bactérias probióticas: avaliação *in vitro* da funcionalidade e a análise genômica. Dentro deste contexto, a análise da funcionalidade se refere ao tipo de resposta modulada pelo micro-organismo, ao passo que a análise genômica é uma ferramenta nova e promissora na seleção de linhagens probióticas, devido ao crescente número de sequências atualmente disponíveis e que auxiliam na predição das atividades funcionais dos probióticos (MORELLI, 2007).

Para a funcionalidade dos probióticos sugere-se que, pelo menos,  $10^8$ - $10^9$  bactérias vivas devem chegar ao intestino delgado diariamente, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo  $10^6$  a  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> (SANDERS & in't VELD, 1999). Dessa forma, a recomendação é a de que na data de validade a concentração mínima corresponda a  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> do produto, ou  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> no ponto de distribuição ou, ainda, de ingestão diária superior a  $10^8$  UFC (LEE & SALMINEN, 1995).

As secreções ácidas, biliares e pancreáticas dificultam a colonização da maioria das bactérias tanto no estômago quanto no intestino delgado proximal, com população de  $10^1$ - $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A densidade bacteriana aumenta no intestino delgado distal ( $10^4$  a  $10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>) para alcançar seu máximo no cólon ( $10^{11}$ - $10^{12}$  UFC.mL<sup>-1</sup>) (O'HARA & SHANAHAN, 2006).

A legislação brasileira recomenda que a quantidade do probiótico, expressa em UFC, contida na porção diária do produto pronto para o consumo deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação de probiose. Valores menores que  $10^8$  a  $10^9$  UFC na porção diária podem ser aceitos desde que a fabricante comprove sua eficácia (BRASIL, 2002). Além disso, requer laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o prazo final de validade e teste de resistência da cultura à acidez gástrica e aos sais biliares, ou seja, uma avaliação *in vitro* preliminar (BRASIL, 2008).

Para melhorar a aplicação de probióticos na promoção da saúde humana, é importante compreender efetivamente o seu modo de ação. O campo de pesquisa da interação entre o hospedeiro-probiótico tem avançado, mas ainda exige uma caracterização completa e detalhada das moléculas imunomoduladoras do probiótico em relação às respostas moleculares e fisiológicas que podem provocar no hospedeiro (BRON et al., 2012).

O consumo de bebidas e alimentos que contenham micro-organismos probióticos é uma tendência mundial crescente. Os produtos lácteos fermentados são os mais usados como matriz no desenvolvimento de probióticos para humanos, entretanto para atender essa demanda, vários produtos não lácteos têm sido desenvolvidos. Outros carreadores contendo probióticos recentemente desenvolvidos são: cápsulas, queijos, sorvetes, leite em pó, iogurtes, leite de soja, sucos de frutas e

vegetais, produtos cárneos e a base de cereais (LEITE, 2005; CHÁVARRI et al., 2010; GRANATO et al., 2010).

Linhagens probióticas do futuro serão provavelmente selecionadas por meio de uma combinação preliminar baseada na genômica seguida por ensaios *in vitro*, mas a avaliação *in vivo* permanece obrigatória na etapa de seleção final (MORELLI, 2007). Essa nova geração de probióticos irá surgir em pouco tempo, onde os produtos serão desenvolvidos para o apoio de pacientes que sofrem de doenças específicas, para as quais os mecanismos de eficácia serão comprovados (TANNOCK, 2009).

A principal função do estômago é o armazenamento temporário dos alimentos que se misturam à água e ao suco gástrico, formando o quimo. Absorve também substâncias solúveis em água e em lipídeos como o álcool e alguns medicamentos e atua regulando a liberação do quimo para o intestino delgado (REED & WICKHAM, 2009).

Os componentes importantes do suco gástrico humano são ácido clorídrico, eletrólitos, fator intrínseco, muco, bicarbonato e o pepsinogênio, precursor da pepsina, sendo que a secreção destes aumenta após a refeição. O pH é baixo, cerca de 0,7 a 3,8, e a proteção do epitélio gástrico depende da secreção do muco e dos íons bicarbonato. O muco forma uma camada gelatinosa que cobre a superfície da mucosa gástrica, já o bicarbonato fica retido nesta camada gelatinosa neutralizando o ácido, prevenindo, dessa forma, os danos (BARRET & RAYBOULD, 2009).

A secreção pancreática, rica em bicarbonato, tem a função de neutralizar a acidez do quimo quando entra no duodeno a partir do estômago. As enzimas presentes no lúmen intestinal apresentam atividade ótima em pH próximo ao neutro e, portanto, é crucial aumentar o pH do quimo. O suco pancreático contém várias enzimas, tais como amilase, tripsina, lipase, ribonuclease e protease, que estão envolvidas na digestão de carboidratos, gordura e proteína de origem alimentar. A secreção biliar também é lançada no duodeno, onde os sais biliares têm papel na absorção intestinal dos lipídeos. O intestino delgado secreta um fluido alcalino isotônico, que auxilia na manutenção da fluidez do quimo, além de proteger a mucosa intestinal da presença de qualquer  $H^+$  presente no lúmen, principalmente do duodeno e íleo, onde bactérias fermentam as fibras dietéticas e produzem gás e ácidos graxos de cadeia curta (TSO, 2003).

A matriz alimentar em que o probiótico é veiculado pode protegê-lo das condições adversas encontradas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, como o suco gástrico e o pancreático, a exemplo de *L. delbrueckii* que pode sobreviver em alto número e chegar ao cólon, quando as células são consumidas junto com alimentos (PACHECO et al., 2010).

O desenvolvimento da microbiota em humanos é um processo temporal, dessa forma, o intestino dos recém-nascidos se assemelha a de animais *germ free*, sendo este um estado curto, uma vez que poucos minutos após o nascimento, os bebês são expostos às bactérias residentes no canal vaginal materno e na área perinatal. Após o nascimento, os bebês entram em contato com outros tipos de micro-organismos, como aqueles associados aos cuidadores do recém-nascido e ao ambiente. As primeiras bactérias detectadas nesta fase são as *Enterobacteriaceae*, cuja abundância flutua nos primeiros seis meses de vida. Os colonizadores secundários são *Bacterioides*, *Clostridia* e *Bifidobacteria*, que são detectados quando os bebês começam a se alimentar, seja com leite materno ou por fórmula infantil. Na próxima fase do desenvolvimento, as crianças são gradualmente desmamadas da dieta limitada em leite, e nesse momento, a microbiota se apresenta mais diversa e estruturalmente complexa e começa a se assemelhar à microbiota do adulto, que é dominada por membros de apenas duas divisões de bactérias, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, mas *Fungi* e *Archea* também podem ser residentes, compreendendo menos que 0,05 e 1% dos habitantes totais, respectivamente. (TANNOCK, 2009; YU & MORRISON, 2009).

A microbiota intestinal fornece ao seu hospedeiro uma barreira física à entrada de patógenos por exclusão competitiva, consumo das fontes de nutrientes e produção de substâncias antimicrobianas. Estes micro-organismos são importantes na manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal por meio das junções célula-célula, no reparo epitelial após lesão, metabolização de compostos xenobióticos e ao maximizarem a disponibilidade calórica dos nutrientes, seja por extração adicional das calorias derivadas dos oligossacarídeos não digeríveis da dieta ou pela promoção da absorção de nutrientes, pela modulação da capacidade de absorção do epitélio intestinal e do metabolismo final. A importância da microbiota intestinal saudável e balanceada não se restringe apenas ao trato gastrointestinal, pois esta estimula a imunomodulação e regula os níveis e tipos de auto-anticorpos, cujo

alvo são os hormônios reguladores do apetite, ajudando dessa forma no controle do mesmo (SEKIROV et al. , 2010).

Mudança da dieta baixa em gordura, rica em polissacarídeos vegetais para outra rica em gordura e açúcares, provoca mudança na estrutura da comunidade intestinal, alterando vias metabólicas e a expressão gênica no microbioma. Em um estudo onde camundongos *germ-free* foram transplantados com microbiota fecal humana de adultos e aqueles alimentados com a dieta ocidental, rica em gordura e açúcares, apresentaram adiposidade aumentada com representação significativamente maior dos membros do *Firmicutes* acompanhada por uma redução dos *Bacteroidetes*. Os resultados deste trabalho também indicaram que a microbiota intestinal humana pode ser transferida com sucesso sem uma queda significativa na diversidade, pois todos os filos bacterianos, 11/12 classes de bactérias, e 88% (58/66) dos gêneros detectados na amostra humana doadora foram também detectados entre os camundongos receptores (TURNBAUGH et al., 2009).

O microbioma humano, definido como genomas coletivos que compõem a microbiota intestinal, fornecem traços de que os seres humanos não evoluíram por conta própria, pois o processo co-evolucionário entre o hospedeiro e sua microbiota levou a relações mutualistas, nas quais a microbiota intestinal recebe nutriente a partir do hospedeiro e esta fornece ao hospedeiro uma carga adicional de atributos metabólicos e genéticos, incluindo a capacidade de aproveitar nutrientes que são de outra maneira inacessíveis. A análise da diversidade bacteriana baseada no rRNA 16S revela a composição da comunidade microbiana. No entanto, a associação entre a diversidade microbiana e a fisiologia humana depende da compreensão do conteúdo genômico, sendo crucial considerar o papel dos genes codificados no microbioma e não apenas detectar as espécies isoladamente e, então, relacioná-los ao metabolismo do hospedeiro (LEBEER et al., 2010; RAJENDHRAN & GUNASEKARAN, 2010).

Análise metagenômica comparativa do microbioma do intestino humano demonstra uma diferença na composição global e no repertório de genes entre adultos e crianças. A microbiota do intestino de lactentes era simples e mostrou uma variação interindividual elevada em taxonomia e composição genética, já os de adultos e bebês desmamados foram mais complexos, porém mostraram alta uniformidade funcional independentemente da idade ou sexo. Foram identificadas

237 famílias de genes comumente encontradas em microbioma de adultos e 136 no microbioma infantil, com uma pequena sobreposição (KUROKAWA et al., 2007).

Recente achado sugere que os indivíduos com predisposição para a obesidade possuem uma microbiota intestinal mais eficiente na extração e/ou armazenamento de energia a partir da dieta fornecida, em comparação com as comunidades microbianas dos indivíduos magros. Em uma comparação entre camundongos magros e obesos, observou-se nos obesos uma redução de 50% na abundância de *Bacteroidetes* e um aumento proporcional em *Firmicutes*. Estas alterações indicam que, a obesidade afeta a diversidade da microbiota intestinal. Os pesquisadores sugeriram que a manipulação intencional da estrutura da comunidade pode ser útil para regular o balanço energético em indivíduos obesos (LEY et al., 2005).

As sequências dos genomas de diferentes espécies de *Lactobacillus* isoladas tanto do trato gastrointestinal humano quanto de produtos cárneos e lácteos fermentados foram publicados recentemente, incluindo *L. johnsonii* (PRIDMORE et al., 2004), *L. acidophilus* (ALTERMANN et al., 2005), *L. sakei* (CHAILLOU et al., 2005), *L. delbrueckii* (van de GUCHTE et al., 2006), *L. brevis* (MAKAROVA et al., 2006), *L. gasseri* (AZCARATE-PERIL et al., 2008), *L. helveticus* (CALLANAN et al., 2008), *L. fermentum* (MORITA et al., 2008), *L. plantarum* (ZHANG et al., 2009), *L. rhamnosus* (KANKAINEN et al., 2009); *L. salivarius* (JIMÉNEZ, et al., 2010), *L. crispatus* (OJALA et al., 2010); *L. casei* (MAZÉ et al., 2010) e *L. kefiranofaciens* ZW3 (WANG et al., 2011). A tendência é que essa base de dados aumente consideravelmente nos próximos anos como consequência do aumento da obtenção das sequências, além da redução dos custos destas tecnologias de sequenciamento de nova geração (BRON & KLEEREBEZEM, 2011). Esses genomas irão fornecer uma plataforma sólida para análise comparativa dos genomas de organismos que sobrevivem à passagem pelo trato gastrointestinal e o habitam; além de prever algumas das atividades probióticas (ALTERMANN et al., 2005).

JENSEN et al. (2012) avaliaram dezoito bactérias do ácido láctico, incluindo aquelas utilizadas como culturas  *starters*, as comercialmente disponíveis como probióticos e as com características potenciais de probiose, isoladas tanto de seres humanos quanto de alimentos. Quando estas bactérias foram expostas ao suco gástrico simulado de pH 3, três linhagens *L. reuteri* avaliadas, DSM 20016, mm4-1a e fj1, mantiveram o mesmo nível de viabilidade até 180 minutos; *L. reuteri* DSM

17938 mostrou uma pequena redução na viabilidade após 180 minutos (inferior 0,5 ciclo log); *L. plantarum* WCFS1, NC8, MF1298 e ad2, *L. rhamnosus* GG, e *L. gasseri* ATCC 33.323 revelaram uma redução moderada (1-2 ciclos log) na viabilidade depois de 180 minutos; já *L. plantarum* 299v apresentou redução de viabilidade maior (4 ciclos log), enquanto que *L. pentosus*, *L. farciminis* e todas as linhagens de *L. sakei* tiveram perda total de viabilidade após 180 minutos, em suco gástrico simulado. Todas as cepas testadas toleraram bem o suco intestinal simulado, com pancreatina e bile, pois nenhuma das linhagens apresentou redução na viabilidade superior a um ciclo logarítmico. Os autores ressaltaram que o método utilizado neste estudo não fornece qualquer informação sobre o resultado da exposição à bile após a exposição ao ácido gástrico.

Análise genômica de vinte espécies de *Lactobacillus* caracterizou o pangenoma, definido como o complemento total de genes, que apresenta cerca de 14.000 genes que codificam proteínas e 383 conjuntos de genes ortólogos, sendo que o número de genes de cada bactéria variou de 1.700 a 3.200 e tamanho 1,8 a 3,3 Mb. Esta diferença revela ocorrência de perda, aquisição e/ou duplicação dos genes durante a evolução (KANT et al., 2010).

As células do hospedeiro que possuem maior interação com os probióticos são as células epiteliais intestinais, que proporcionam o acesso das bactérias à camada de muco. Estas células interagem e respondem aos micro-organismos intestinais por meio dos seus receptores (LEBEER et al. 2010).

Muitas bactérias possuem adesinas, como a proteína de ligação a fibronectina (FnBP) cujo alvo de ligação é a fibronectina, uma molécula específica do hospedeiro. A fibronectina é uma grande glicoproteína, composta por duas cadeias protéicas variantes de 230 e 270 kDa ligadas por ponte de dissulfeto C-terminal, e é encontrada nos fluidos corporais, sobre as superfícies de células e na matriz extracelular, sendo esta última uma estrutura complexa que envolve as células epiteliais. A fibronectina funciona como um elo fundamental entre as células e suas matrizes extracelulares, e atualmente é reconhecida como alvo para um grande número de proteínas bacterianas, que são geralmente consideradas por funcionar como adesinas bacterianas. Vale ressaltar que as FnBPs podem se ligar a um número crescente de sítios na fibronectina (HENDERSON et al., 2011).

A adesão desempenha um papel importante na persistência de uma estirpe particular no trato digestivo, e também na modulação de respostas na célula hospedeira e na exclusão de patógenos, onde este último ocorre devido ao fato dos *Lactobacillus* competirem pelos mesmos receptores e ocuparem os sítios de ligação potenciais no intestino (VÉLEZ et al., 2007).

As análises nutrigenômicas associadas às ferramentas genômicas têm identificado vários fatores bacterianos envolvidos na modulação do sistema imune e na barreira mucosa, logo estas abordagens representam um fator determinante na elucidação da resposta fisiológica ao probiótico em cada indivíduo. Estas ferramentas podem levar a uma melhor estratificação dos consumidores, visando uma suplementação de probióticos a nível subpopulacional, com o intuito de melhorar ou manter a saúde, ou ainda reduzir o risco de doença (BRON et al., 2012).

Proteínas extracelulares produzidas por bactérias probióticas regulam algumas vias de sinalização e respostas celulares, como citado anteriormente, incluindo a secreção de diferentes moléculas efetoras, tais como as quimiocinas, citocinas ou peptídeos antibacterianos, secreção de muco, indução de alterações na propriedades de superfície, rearranjo e melhora das junções celulares, prevenção de apoptose, modulação da função imune e da resposta associada às células do tecido linfóide intestinal (LEBEER et al. 2010; SÁNCHEZ et al., 2010).

A abundância dessas proteínas nos lactobacilos probióticos sugere um papel importante na adesão e/ou colonização de superfícies da mucosa intestinal (PRIDMORE et al., 2004; ALTERMANN et al., 2005). Logo, o estudo FnBP em *Lactobacillus* pode gerar uma melhor compreensão das relações estabelecidas entre estas bactérias e o epitélio intestinal (MUÑOZ-PROVENCIO et al., 2009).

Mais recentemente, novos avanços científicos resultaram nas tecnologias "ÔMICAS", que explodiram nas áreas da genômica, transcriptômica, proteômica, e revelam muitos processos fundamentais relacionados aos micro-organismos, sejam eles patogênicos ou não, acelerando dessa forma, nosso conhecimento e entendimento (O'FLAHERTY & KLAENHAMMER, 2011).

Com o avanço da genômica funcional, proteínas extracelulares que contêm domínios envolvidos na adesão tornaram-se um alvo atraente para a investigação. Esse desenvolvimento abre caminhos para desvendar os mecanismos associados à atividade de promoção à saúde dos *Lactobacillus* em nível molecular. Dentro deste

contexto, destaca-se a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR), que utiliza moléculas fluorescentes para monitorizar a produção de produtos de amplificação durante cada ciclo da reação de PCR, e é atualmente uma das ferramentas utilizadas para avaliar a expressão de genes de bactérias, inclusive a de linhagens probióticas sob condições de estresse (BUSTIN, et al., 2005).

A genômica contribui fortemente na compreensão do comportamento das LAB em seus diferentes habitats, bem como as suas capacidades de lidar com situações específicas de estresse (BRON & KLEEREBEZEM, 2011).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais.

#### 3.1 Micro-organismo e condições de cultivo

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi isolado a partir de material fecal de criança recém-nascida (SANTOS, 1984). Células estoque foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a – 80 °C em caldo MRS (De MAN ROGOSA e SHARPE, 1960), contendo 20 % de glicerol.

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 congeladas foram reativadas em leite em pó desnatado (Mollico, Nestlé®) reconstituído a 10% (p/v). Após a coagulação, as células foram transferidas para meio ágar MRS, contendo 2% de glicose. Colônias puras foram transferidas para MRS líquido, incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, inóculo de 1% foi preparado em MRS, incubado a 37°C por 18 horas. A suspensão de células foi padronizada para uma densidade óptica (D.O.) de 0,6 equivalente a 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> em espectrofotômetro (Smart Spec<sup>TM</sup> 3000, Bio-Rad) em comprimento de onda de 600 nm.

#### 3.2 Produção de leite fermentado contendo células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A alíquota de 1 mL da cultura, previamente ativada em MRS, foi inoculada em 50 mL de leite em pó desnatado (Mollico, Nestlé®) reconstituído a 10 % (p/v), adicionado de 10% de sacarose. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 18 horas, conforme descrito por LEITE, (2005). Em seguida, o leite fermentado foi estocado a 7°C e a viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi avaliada antes e

após 7,14, 21 e 28 dias de estocagem. A viabilidade foi determinada pelo método de plaqueamento de microgotas em ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e o resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL<sup>1</sup>).

### **3.3 Simulação das condições prevalentes no trato gastrointestinal humano**

#### **3.3.1 Condição gástrica simulada**

Durante 90 minutos as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram submetidas às condições gástricas simuladas *in vitro* PACHECO et al., (2010), com modificações, em meio contendo pepsina 3% (Sigma Aldrich® P7000), mucina 4 % (Sigma Aldrich® M2378), e 0,5 % NaCl, com pH 2,0, ajustado pela adição de HCl 5M. A cada 30 minutos, as células foram coletadas por centrifugação (MIKRO 200R, Hettich Zentrifugen), a 7.000g a 4°C, por 5 minutos. O sedimento formado foi lavado com solução de tampão fosfato de sódio-PBS (pH 7,4), por duas vezes, e em seguida ressuspendido em 400 µL de PBS. Essa suspensão celular foi avaliada quanto a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 pelo método de plaqueamento em microgotas em ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e os resultados foram expressos em (UFC.mL<sup>-1</sup>).

#### **3.3.2 Condição intestinal simulada**

Após as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 serem expostas às condições gástricas simuladas *in vitro*, foram submetidas durante 150 minutos às condições intestinais simuladas *in vitro*, em meio constituído por pancreatina 1 % (Sigma Aldrich® P1625), mucina 4 % (Sigma Aldrich® M2378), sais biliares 0,3 % (Himedia®) e 0,5 % NaCl, com pH 6,8 ajustado com 1,5 M NaOH (PACHECO et al., 2010). A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi determinada conforme descrito acima.

#### **3.4 Extração do DNA total de *L. delbrueckii* UFV H2b20**

O DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi extraído utilizando o kit *Wizard Genomic DNA purification kit* (Promega®, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações: as células foram rompidas

com 10  $\mu\text{L}$  de lisozima 50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e foram reidratadas com 40  $\mu\text{L}$  da solução de reidratação do Kit. O DNA extraído foi analisado pela comparação das bandas obtidas com concentrações conhecidas de DNA de fago lambda, por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e, quantificado em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

### 3.5 Seleção dos genes e Construção e seleção de *primers*

As sequências dos genes possivelmente envolvidos na adesão, como os que codificam as proteínas de ligação à mucina (*mub*), à fibronectina (*fbpA*) e proteína da camada superficial – camada S (*slpA*), foram capturadas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os *primers* foram selecionados com o auxílio do programa *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) tendo como base as sequências de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (NC:008054.1) e *L. acidophilus* NCFM (NC:006814.3). A qualidade dos *primers* foi verificada pelo programa *Oligo Analyzer 3.1* (<http://www.idtdna.com>). Os *primers* listados na tabela 1 foram sintetizados pela *Invitrogen*<sup>TM</sup> (São Paulo, SP, Brasil)

### 3.6 Detecção dos genes de interesse em *L. delbrueckii* UFV H2b20 por PCR

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 5  $\mu\text{L}$  tampão incolor Gotaq (Promega<sup>®</sup>), 2,25  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25mM, 0,5  $\mu\text{L}$  mix de dNTPs 10mM (Promega<sup>®</sup>), 0,5  $\mu\text{L}$  dos *primers* específicos (Tabela 1), 0,2  $\mu\text{L}$  Go<sup>®</sup>Taq DNA polimerase (Promega<sup>®</sup>), 3  $\mu\text{L}$  de DNA na concentração de 26,7  $\text{ng}/\mu\text{L}$  e água desionizada estéril (MilliQ; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para completar volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As condições específicas dos ciclos envolvidos nas reações de PCR estão listadas na tabela 1. Todas as reações foram conduzidas no termociclador Techne TC-512 (Barloworld Scientific, Staffordshire, UK) e a temperatura de anelamento a ser utilizada com cada par de *primer* foi determinada com o uso do gradiente programável deste equipamento.

**Tabela 1:** Genes, *primers* e condições do PCR utilizados na amplificação dos genes possivelmente relacionados à adesão em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

Gene	Primer (5'-3')	Condições do PCR
<i>slpA</i> <sup>a</sup>	<i>slpAf</i> - TGCTAACAACTCCAGCTATTGCC <i>slpAr</i> - GCGTCCTTGTCGTAGTAGTATGCGT	1 ciclo 94°C/5 min; 35 ciclos 94°C/1 min, 40,9°C/30 seg, 72°C/1 min; 1 ciclo 72°C/5 min
<i>fbpA</i> <sup>b</sup>	<i>fbpAf</i> - AGGAAGGACCGCAAAAACAAGCA <i>fbpAr</i> - GGATGTCGCTGTCACTGGCTGG	1 ciclo 94°C/5 min; 35 ciclos 94°C/1 min, 65,8 °C/30 seg, 72°C/1 min; 1 ciclo 72°C/5 min
<i>mub</i> <sup>c</sup>	<i>mubf</i> -CATGCCATGGTAAGGTCACAGGTGTAACAA <i>mubr</i> -GATCTCTAGAAGCCTACTTCACTAGGAGTC	1 ciclo 94°C/5 min; 35 ciclos 94°C/1 min, 43,2 °C –66,6°C/30 seg, 72°C/1 min; 1 ciclo 72°C/5 min
<i>Inv</i> <sup>d</sup>	<i>invf</i> - TCAAGCAGCGGTCCCAACAGG <i>invr</i> - CGCAGGACCATGACGAAGAGAGGA	1 ciclo 94°C/3 min; 35 ciclos 94°C/1 min, 66°C/30 seg, 72°C/1 min; 1 ciclo 72°C/5 min
RT <i>fbpA</i> <sup>e</sup>	<i>fbpAf</i> - CCCGCCTCTACCTGAGCAAG <i>fbpAr</i> - ACGCAGGACCATGACGAAGAGA	1 ciclo 50°C/2 min; 1 ciclo 95°C/2 min; 40 ciclos 95°C/15 seg, 60°C/30 seg

<sup>a</sup>*Primers* selecionado com base nas sequências de *Lactobacillus acidophilus* NCFM

<sup>b</sup>*Primers* selecionado com base nas sequências de *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* ATCC 11842

<sup>c</sup>BUCK et al, 2005.

<sup>d</sup>*Primers* selecionado com base na sequência parcial do gene *fbpA* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtida por sequenciamento, para PCR inversa.

<sup>e</sup>*Primers* selecionado com base na sequência parcial do gene *fbpA* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtida por sequenciamento, para qRT-PCR.

### 3.7 Clonagem e sequenciamento dos genes detectados em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

Os DNAs amplificados foram clonados em pGEM-T Easy Vector (Promega<sup>®</sup>), conforme instruções do fabricante, e transformados em *Escherichia coli* JM109 ultracompetente por choque térmico. Os clones obtidos foram selecionados aleatoriamente e usados na PCR de colônia, cuja condição de reação foi a mesma descrita na tabela 1, visando verificar a presença do inserto. Tais amostras foram transferidas para meio líquido seletivo (LB+Ampicilina) e incubadas a 37°C por 18 horas. Os plasmídeos foram extraídos utilizando o método de centrifugação descrito no kit *GenElute™ HP Plasmid Miniprep* (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante. Os insertos foram sequenciados na MacroGen Inc. (Korea).

### 3.8 PCR inversa

A técnica de PCR inversa, descrita por Ochman et al., 1988, foi utilizada visando amplificar e identificar as sequências de DNA que flanqueiam a região interna conhecida do gene *fbpA* obtido pela técnica de PCR padrão.

O DNA genômico de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi clivado com a enzima EcoRI a 37°C por 3 horas. Esta enzima não cliva na região interna do gene em estudo já sequenciado. Após o tempo de incubação, a enzima foi inativada em banho-maria a 65°C por 15 minutos. A reação de ligação foi conduzida em volume final de 10 µL, dos quais: 2 µL de DNA na concentração de 500 ng/µL, 1 µL T4 DNA ligase (Promega<sup>®</sup>), 1 µL tampão 10X (Promega<sup>®</sup>), água desionizada estéril para completar o volume. A reação foi incubada a 15°C por 18 horas, conforme recomendações do fabricante. Uma alíquota da mesma foi utilizada na reação de PCR inversa.

A reação de amplificação foi conduzida, em volume final 25 µL, contendo: 5 µL tampão incolor Gotaq (Promega<sup>®</sup>), 2 µL MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0,5 µL mix de dNTPs 10mM (Promega<sup>®</sup>), 0,5 µL dos *primers* inversos 10 mM, 0,2 µL Go<sup>®</sup>Taq DNA polimerase (Promega<sup>®</sup>), 0,5 µL de DNA obtido na reação de ligação e água desionizada estéril para completar volume. As condições específicas dos ciclos envolvidos na reação de PCR inversa estão listadas na tabela 1. A posição de anelamento dos *primers* foi a seguinte: R(87-64) e F (693-713). Os produtos da PCR inversa foram verificados em gel de agarose 1,2% contendo gel:red (1:500). As bandas formadas foram extraídas do gel, purificadas com o auxílio do *Kit PureLink™*

*Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen<sup>®</sup>) e enviadas para sequenciamento no Laboratório de Genômica, UFV.

### **3.9 Análise comparativa de genes e Análise filogenética**

Todas as sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do NCBI, e realizou-se também uma busca de identidade para tais sequências com o auxílio do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* para nucleotídeos (BLASTn).

As múltiplas sequências obtidas incluindo as utilizadas como grupos externos foram alinhadas pelo programa Clustal W e utilizadas para a reconstrução de árvores filogenéticas pelo método da Inferência Bayesiana no programa MrBayes 3.1.

### **3.10. Análise da expressão do gene *fbpA* por PCR em tempo real**

#### **3.10.1 Condição de cultivo de *L. delbrueckii* UFV H2b20 para extração de RNA**

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 congeladas foram reativadas em leite em pó desnatado (Mollico, Nestlé<sup>®</sup>) reconstituído em água para concentração final de 10% (p/v). Após a coagulação, as células foram transferidas para meio ágar MRS contendo 2% de glicose. Colônias puras foram transferidas para MRS líquido, incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, o leite fermentado foi preparado conforme item 3.2. Alíquotas de 700 µL desta suspensão celular incorporada ao leite adicionado de mesmo volume de PBS foram transferidas para microtubos de 1,5 mL. Células de 3 microtubos foram consideradas controles e imediatamente ressuspensas em 1,4 mL de PBS e as células dos outros 3 microtubos foram submetidas ao estresse gástrico e intestinal, e incubadas a 37 °C em banho-maria por 240 minutos e centrifugadas. Os sedimentos foram congelados nos mesmos microtubos utilizando-se nitrogênio líquido e estocados a - 80 °C para posterior extração de RNA.

#### **3.10.2 Extração de RNA**

O sedimento das células tratadas e armazenadas a -80 °C foi descongelado e ressuspensado em 300 µL de Tampão de Eluição -TE (pH 8,0) acrescido de 50 µL de lisozima 50 mg.mL<sup>-1</sup>, incubado por 35 minutos a 37°C em banho-maria. A extração

do RNA foi feita de acordo com as instruções do fabricante para a utilização do Trizol (Invitrogen<sup>®</sup>).

A qualidade e quantidade do RNA obtido foram avaliadas em gel de agarose 1% e em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), respectivamente.

### 3.10.3 Obtenção de cDNA

Uma alíquota de 8 µL do RNA extraído foi tratada com 1 µL DNase (Promega<sup>®</sup>), conforme instruções do fabricante e 4 µL do RNA tratado foram utilizados para síntese do cDNA, utilizando o kit *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System* (Promega<sup>®</sup>), segundo instruções do fabricante. O c-DNA sintetizado foi quantificado em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

### 3.10.4 PCR em tempo real

O kit *Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen<sup>®</sup>) foi utilizado na amplificação e detecção de DNA fita dupla sintetizada no PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR), conforme recomendações do fabricante para reações em 2 passos (*two-step reactions*).

O gene homólogo a *sigA* detectado *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi utilizado como gene de referência após a verificação de que a expressão do mesmo não foi significativamente afetada sob condições experimentais previamente testadas (LEITE, 2008). O *primer* específico para qRT-PCR foi desenhado com base nas informações obtidas por sequenciamento parcial do gene *fbpA* (Tabela 1). Tais *primers* foram inicialmente testados quanto à formação de um único amplicon por PCR convencional, utilizando o cDNA do tratamento controle como molde. Os resultados desta PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (30 Volt por 3 horas).

O procedimento foi realizado no termociclador CFX96<sup>TM</sup> Real-Time PCR detection systems – C100<sup>TM</sup> ThermalCycler (Bio-Rad). As reações foram montadas em volume final de 12 µL. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As condições utilizadas foram: 1 ciclo 50°C/2 min; 1 ciclo 94°C/2 min; 40 ciclos 94°C/15 seg, 60°C/30 seg. Terminada a reação de amplificação, todas as amostras

foram submetidas a análise pela Curva de Dissociação, objetivando verificar a ausência de produtos inespecíficos e dímeros de *primers*. As eficiências de reação foram determinadas como descrito por PFAFF, (2001) e a quantificação da expressão gênica foi realizada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

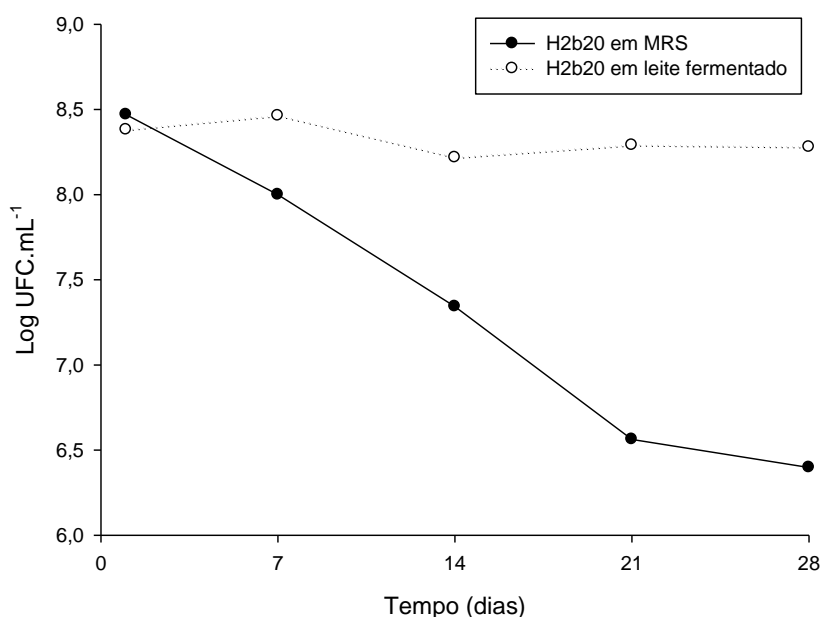
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Sobrevivência às condições prevalentes no trato gastrointestinal humano

A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante o período de estocagem a 7°C foi verificada no presente estudo. As células cultivadas em MRS, e estocadas a 7°C por 28 dias, apresentaram uma redução de aproximadamente dois ciclos logarítmicos, enquanto nas células cultivadas em leite não foi observado declínio evidente na sobrevivência, cuja contagem de viáveis foi superior a 10<sup>8</sup> UFC/mL (Figura 1). Este resultado está de acordo com os obtidos por LEITE (2005) que avaliou a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em leite fermentado, sorvete e leite em pó e detectou que no período de 45 dias o número de células reduziu de 10<sup>8</sup> para 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>; 3,1 x 10<sup>8</sup> para 1,1 x10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>8</sup> para 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. ARAÚJO et al. (2009) detectaram que não houve diferença na contagem de células viáveis *L. delbrueckii* UFV H2b20 em queijo tipo *Cottage* simbiótico durante os 20 dias de estocagem a 5°C. No entanto, quando as células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foram submetidas ao tratamento térmico e ácido preliminar houve aumento na sobrevivência ao processo de congelamento, bem como ao de desidratação, liofilização ou *spray-drying* (FURTADO, 2001; DO CARMO, 2006; LEANDRO, 2009). Além do aspecto tecnológico, nossa estirpe de trabalho possui características fisiológicas, imunológicas e genéticas desejáveis e necessárias à probiose. A viabilidade de *L. casei* Zhang em leite fermentado também foi mantida elevada (> 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup>) durante o armazenamento a 4 °C durante 28 dias (WANG, 2009).

Para a funcionalidade dos probióticos sugere-se que, pelo menos, 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> bactérias vivas devem chegar ao intestino delgado diariamente, o que corresponde ao

consumo de 100 g de produto contendo  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (SANDERS & in't VELD, 1999). Logo, a recomendação é que na data de validade a concentração mínima corresponda a  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> do produto (LEE & SALMINEN, 1995; BRASIL, 2007), e nestas condições o produto estava adequado para consumo após os 28 dias de estocagem sob refrigeração, pois a contagem de viáveis foi superior a  $10^8$  UFC/mL (Figura 1).



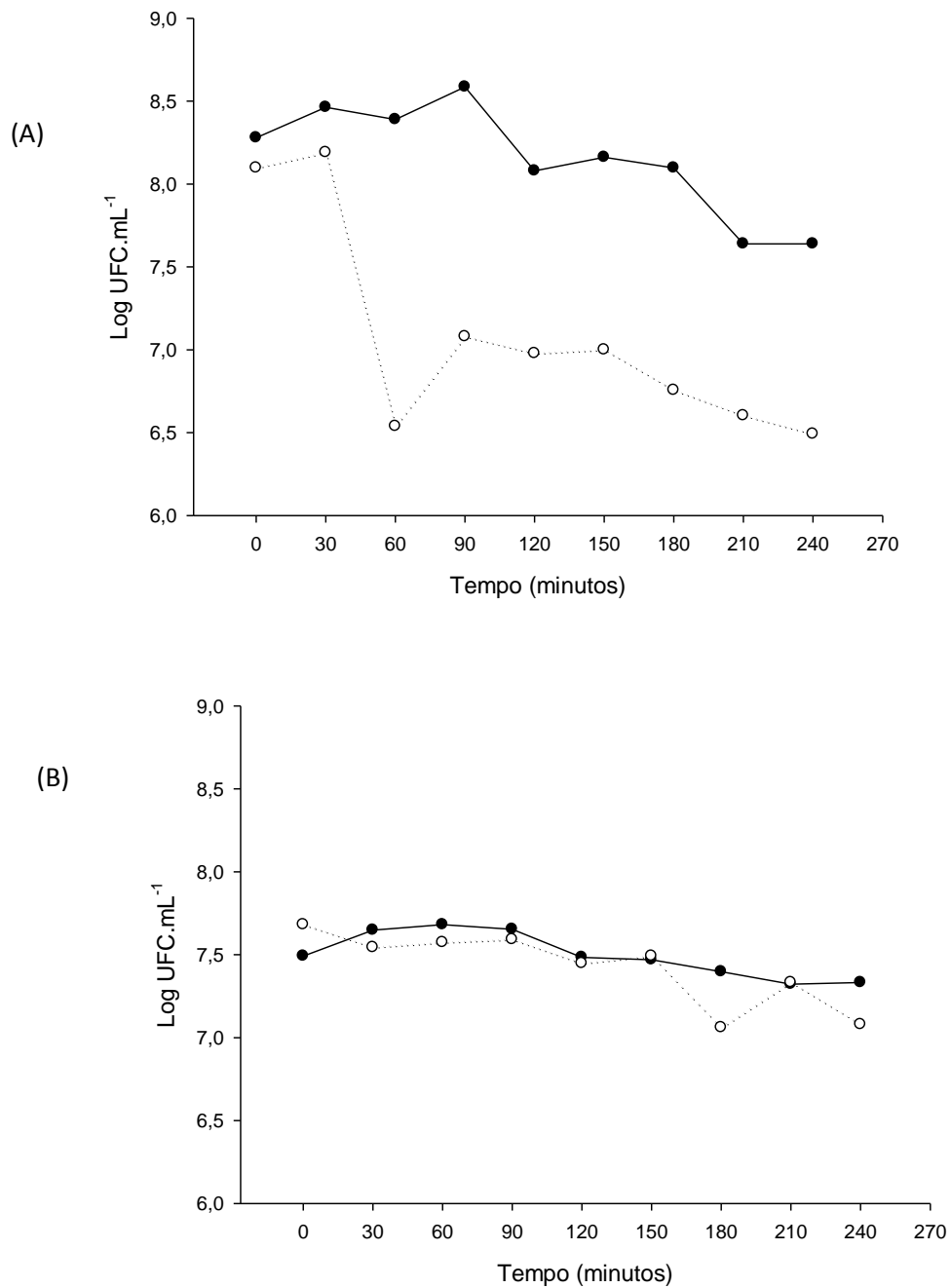
**Figura 1:** Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFW H2b20 cultivado em LDR 10 % (○) e em meio MRS (●) durante 28 dias de estocagem sob refrigeração a 7 °C.

Além da sobrevivência ao trato gastrointestinal humano (TGH), os microorganismos específicos utilizados na fabricação do leite fermentado devem permanecer viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade, sendo que estes produtos devem ser conservados e comercializados em refrigeradores mantidos à temperatura não superior a 10°C (BRASIL, 2007). Vale ressaltar que os leites fermentados disponíveis atualmente no mercado apresentam composição variada, sem um padrão de prazo de validade, alguns declaram 31 dias

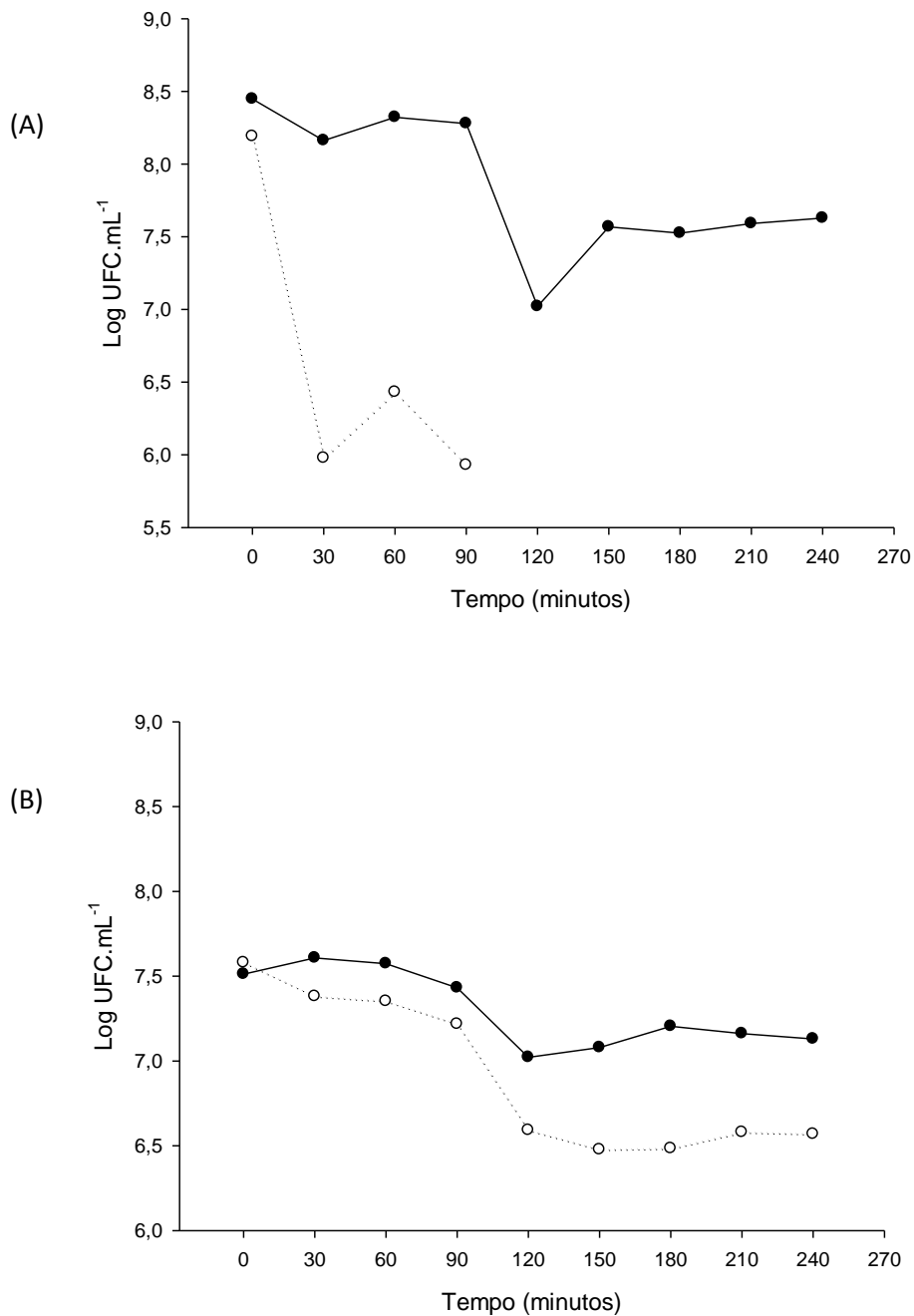
enquanto outros 71 dias de validade, variação de mais de 100% (Observação de produtos disponíveis no mercado em maio de 2012).

Após um dia de estocagem de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em leite fermentado sob refrigeração e quatro horas de exposição às condições gástricas e intestinais simuladas simultaneamente, ocorreu redução correspondente a aproximadamente um ciclo logarítmico (Figura 2), em comparação às células não submetidas ao estresse, ou seja, a população foi reduzida a 10 % de seu valor inicial. No entanto, nas células cultivadas em MRS não foi observada variação na contagem de células viáveis entre as que foram submetidas às condições de estresse em estudo em relação àquelas que não foram submetidas ao referido estresse.

No sétimo dia de estocagem sob refrigeração, as células foram coletadas e submetidas às condições prevalecentes no TGH (Figura 3). Aquelas submetidas ao estresse e em leite fermentado apresentaram contagem apenas até o tempo 90 minutos, considerando as placas que continham entre 20 e 80 colônias por gota, que se refere ao tempo de exposição ao suco gástrico simulado, o que demonstra que estas células não sobreviveram ao estresse subsequente, o do suco intestinal simulado. No tempo 90 minutos houve uma redução de aproximadamente um ciclo logarítmico. Já as células em MRS mantiveram um padrão de sobrevivência similar no decorrer do tempo, tanto nas células que foram submetidas ao estresse quanto nas que não foram, sendo que foram detectadas células viáveis até o final do ensaio, ou seja, após 240 minutos (Figura 3).



**Figura 2:** Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em LDR 10 % (A) e em meio MRS (B) após a exposição às condições prevalentes do trato gastrointestinal (○) e na ausência dessas condições (●). A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em LDR 10 % e em meio MRS foi avaliada sob essas condições com 1 dia de estocagem a 7 °C.



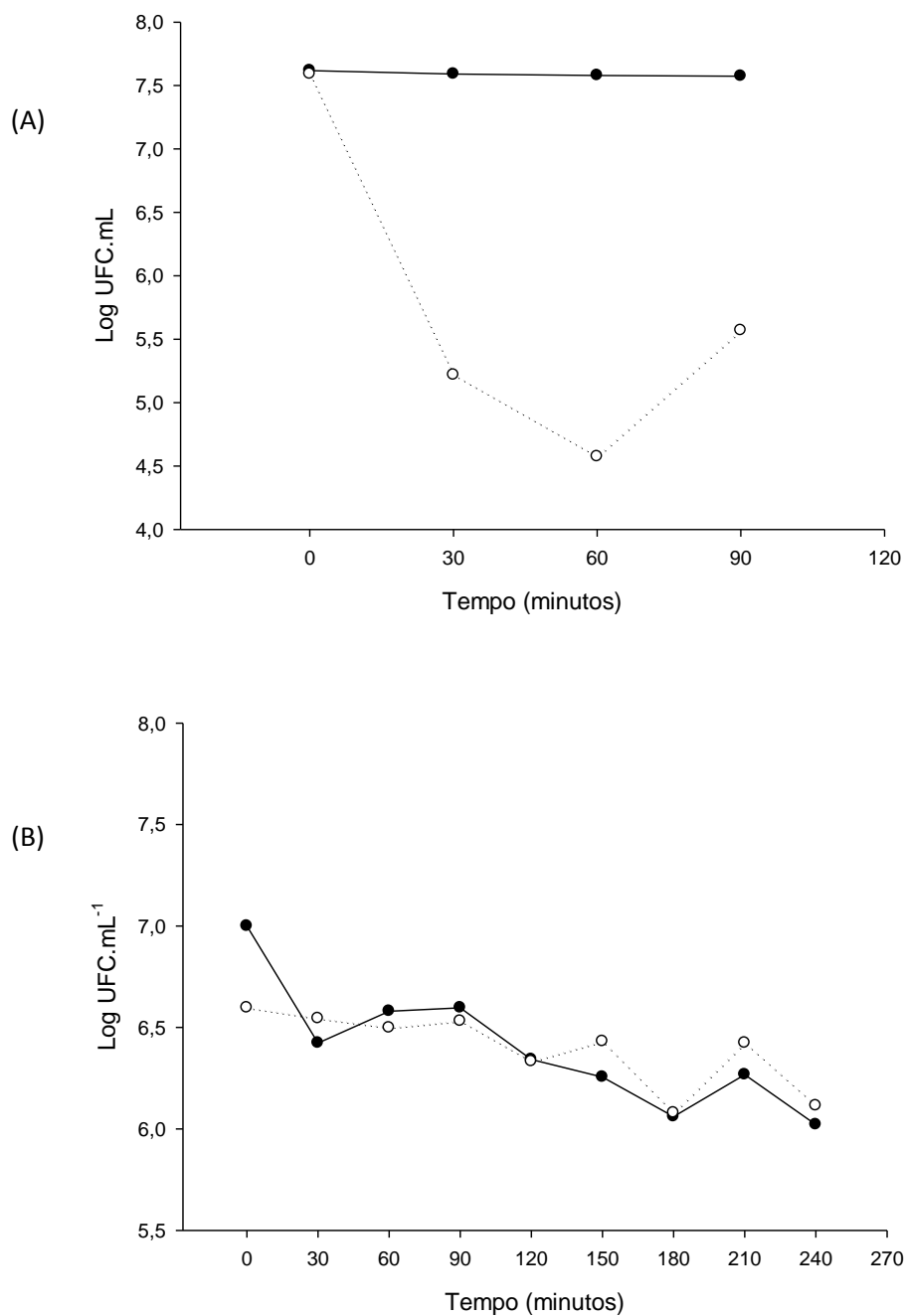
**Figura 3:** Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em LDR 10 % (A) e em meio MRS (B) após a exposição às condições prevalentes do trato gastrointestinal (○) e na ausência dessas condições (●). A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em LDR 10 % e em meio MRS foi avaliada sob essas condições com 7 dias de estocagem a 7 °C.

PACHECO et al. (2010) verificaram que durante os primeiros 30 minutos da fase da condição intestinal simulada *in vitro*, entre o tempo 90 e 120 minutos, as células de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* rapidamente perderam sua viabilidade em presença da amostra de solução de amido e leite de vaca com o amido, caindo de 29% para 6% e de 40% a 10%, respectivamente. No tratamento controle, sem matriz alimentar, a viabilidade caiu de 28% a 2%. Esse achado pode ser explicado, pois as células foram primeiramente tratadas em meio ácido (pH 2,0), e quando estas atingiram uma possível fase de adaptação, foram novamente expostas a mais uma condição agressiva (presença de bile hepática e pancreatina, pH 6,8), e este possivelmente é um dos motivos pelo qual a partir do sétimo dia de experimento, após 120 minutos, as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em leite fermentado não sobreviveram ao estresse imposto pelo suco intestinal simulado (Figura 3).

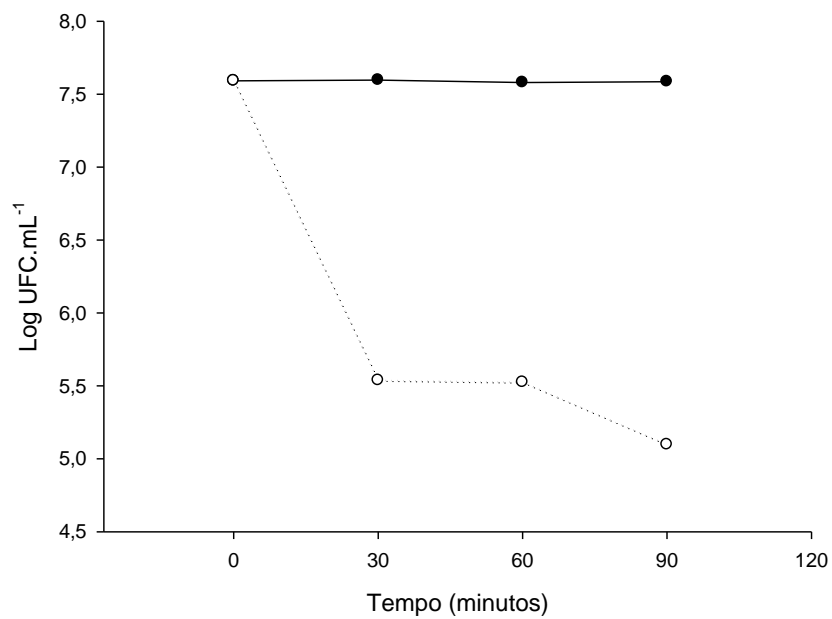
O MRS é um meio de cultura nutricionalmente complexo, composto de várias fontes de nutrientes. A proteose peptona e o extrato de carne bovina suprem os compostos nitrogenados e carbônicos. O extrato de levedura fornece o complexo de vitamina B e a dextrose é o carboidrato fermentável e fonte de energia. O Polisorbato 80 supre os ácidos graxos requeridos para o metabolismo dos lactobacilos. O acetato de sódio e o citrato de amônio inibem os *Streptococcus*, fungos e muitos outros micro-organismos. Dessa forma, no MRS os nutrientes estão prontamente disponíveis para os micro-organismos. Por outro lado, no leite fermentado, os mesmos necessitam ativar suas vias metabólicas para degradar os constituintes do leite e converte-los em moléculas necessárias a manutenção da viabilidade das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

As células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS sobreviveram até o décimo quarto dia de experimento, com perfil similar ao descrito para o sétimo dia. Este resultado indica que o leite fermentado conferiu proteção às bactérias, uma vez que houve contagem de células viáveis até o último dia de experimento, ou seja, no décimo quarto dia (Figura 4), vigésimo primeiro (Figura 5) e vigésimo oitavo (Figura 6) quando as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 estavam em leite fermentado. Nestes ensaios, no início da fase da condição gástrica simulada *in vitro*, entre 0 e 30 minutos, foi observado maior perda de viabilidade, sendo que as reduções, com 90

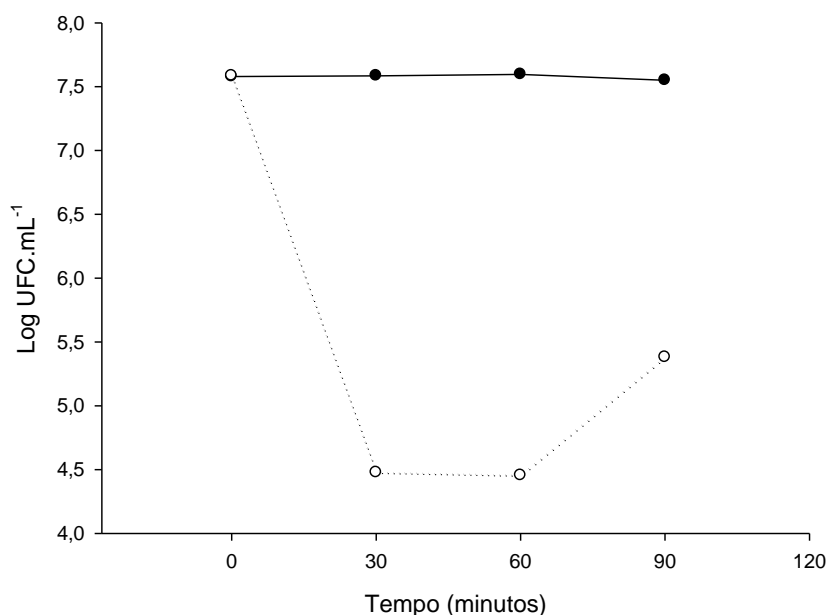
minutos, foram de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos no tratamento em relação ao controle.



**Figura 4:** Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em LDR 10 % (A) e em meio MRS (B) após a exposição às condições prevalentes do trato gastrointestinal (○) e na ausência dessas condições (●). A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em LDR 10 % e em meio MRS foi avaliada sob essas condições com 14 dias de estocagem a 7 °C.



**Figura 5:** Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em LDR 10 % após a exposição às condições prevalentes do trato gastrointestinal (○) e na ausência dessas condições (●). A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em LDR 10 % foi avaliada sob essas condições com 21 dias de estocagem a 7 °C.



**Figura 6:** Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em LDR 10 % após a exposição às condições prevalentes do trato gastrointestinal (○) e na ausência dessas condições (●). A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em LDR 10 % foi avaliada sob essas condições com 28 dias de estocagem a 7 °C.

Existem na literatura alguns trabalhos que avaliaram a tolerância de *Lactobacillus* sp. ao ambiente ácido e à presença de sais biliares (AGOSTINHO, 1998; CHARTERIS et al., 1998; ARAÚJO et al., 2009; FERREIRA, 2011; JENSEN et al., 2012). No entanto, poucos estudos sobre a tolerância ao trânsito gastrointestinal sequencial têm sido relatados (WANG et al., 2009; ZHOU et al., 2009; PACHECO et al., 2010; MADUREIRA et al. 2011; WANG et al., 2012).

A sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal é dependente tanto da estirpe quanto da matriz alimentar envolvida no produto probiótico (SAXELIN et al., 1993). A matriz alimentar em que o probiótico é veiculado pode protegê-lo das condições adversas encontradas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, a exemplo de *L. delbrueckii* que pode sobreviver em alto número e chegar viáveis ao cólon, quando as células são consumidas junto com alimentos (PACHECO et al., 2010).

Os dados do presente trabalho confirmam os obtidos por ARAÚJO et al., (2009) que avaliaram a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 incorporado em queijo Cottage simbiótico e observaram que essa bactéria exibiu resistência

satisfatória a baixos valores de pH e a altas concentrações de sais biliares. Este micro-organismo apresentou resistência ao baixo pH e altas concentrações de sais biliares, sobreviveu e foi capaz de se multiplicar em ambientes com antibióticos e quimioterápicos, mostrando potencial para se instalar em condições de desequilíbrio da microbiota intestinal (AGOSTINHO, 1988).

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não cresce em meio MRS pH 3,5, entretanto, após quatro horas de exposição a essa condição ocorreu redução de aproximadamente um ciclo logarítmico na curva de sobrevivência, indicando a tolerância relativa ao estresse ácido. Esta bactéria apresentou maior tolerância aos sais biliares mistos e menor, nas condições testadas, ao ácido glicodeoxicólico. Em concentrações de 0,05 % e 0,1 % de sais biliares mistos no meio de cultivo não ocorreu alteração do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no período experimental, quando comparado ao controle. Entretanto, nas mesmas concentrações de ácido glicodeoxicólico, *L. delbrueckii* UFV H2b20 não apresentou crescimento, mas após quatro horas de exposição a 0,05 % deste ácido conjugado, ocorreu redução correspondente a aproximadamente um ciclo logarítmico em relação ao tratamento controle (FERREIRA, 2011).

ZHOU et al., (2009) demonstraram que bactéria do ácido láctico do grão de kefir exibiu excelente tolerância às condições do trato gastrointestinal simuladas e sequenciais. Outros pesquisadores testaram a viabilidade das células de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* tratadas em condições gástricas e intestinais sequenciais *in vitro* e em presença de três amostras de alimentos (solução de amido, leite de vaca com amido, comida típica mexicana) e duas amostras de bebidas (café e cerveja). No final do tratamento 73% das células adicionadas à comida mexicana permaneceram viáveis. Isto significou viabilidade 76 e 36,5 vezes maior em relação ao controle e às células tratadas sob as mesmas condições em presença da amostra de leite com 8% amido, respectivamente. No final deste mesmo tratamento, a viabilidade das células sem amostra de alimento ou bebida foi de 1% (PACHECO et al., 2010).

Queijo adicionado de estirpes probióticas foi exposto às condições *in vitro* sequenciais dos quatro principais passos de digestão: boca (saliva artificial), esôfago-estômago (suco gástrico artificial), duodeno (suco intestinal artificial) e íleo. As condições da boca apresentaram um efeito desprezível sobre as bactérias avaliadas, enquanto as condições esôfago-estômago, duodeno e íleo diminuíram o número de *L.*

*casei* e *L. acidophilus* viáveis, tanto naquelas em MRS quanto as incorporadas ao queijo. A matriz alimentar avaliada, o queijo, protegeu essas linhagens durante o trânsito pelo sistema gastrointestinal simulado (MADUREIRA et al., 2011).

Recente trabalho demonstrou que a contagem de *L. casei* Zhang viáveis em suspensão diminuiu significativamente durante o trânsito no suco gástrico simulado, mas que a contagem de bactérias viáveis em leite fermentado não teve significativa mudança durante o trânsito no suco gastrointestinal simulado (WANG et al., 2012). No presente trabalho, as células em MRS apresentaram contagem de células viáveis até o décimo quarto dia de experimento, enquanto as em leite fermentado sobreviveram até o final do experimento, ou seja, por 28 dias.

A maioria das espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* avaliadas por CHARTERIS et al., (1998) perdeu 90% da viabilidade durante o trânsito pelo suco gástrico simulado, fato este também detectado em nosso experimento (Figura 2). Apenas um isolado, *L. fermentum* KLD, foi considerado intrinsecamente resistente. Considerando a viabilidade durante o trânsito pelo suco intestinal simulado, quase todas as linhagens de *Bifidobacterium* mantiveram-se viáveis, sendo que apenas *Bifidobacterium adolescentis* 15703T mostrou uma redução progressiva da viabilidade. Já *L. casei* 212.3 e *L. rhamnosus* GC mativeram viabilidade durante o trânsito intestinal após quatro horas de ensaio. Em contraste, *L. casei* F19 e *L. fermentum* KLD apresentaram redução na viabilidade (CHARTERIS et al., 1998).

O pré-tratamento das células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em pH 3,5 por 30 minutos as torna mais tolerantes ao estresse ácido em meio MRS pH 2,5 por 2,5 horas, pois não foi observada redução significativa da população inicial (MONTEIRO, 1999). Contudo, como demonstrado por FERREIRA (2011), *L. delbrueckii* UFV H2b20 após 90 minutos de exposição a pH 3,5 apresentou contagem de células viáveis  $> 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Podemos propor que ao ingerir a linhagem probiótica em uma matriz alimentar ocorrerá aumento do pH gástrico, o que favorecerá a sobrevivência do micro-organismo em questão. Além disso, podemos destacar o fato que a secreção dos componentes do suco gástrico aumenta após a refeição (BARRET & RAYBOULD, 2009). Dentre estes podemos citar o muco e os íons bicarbonato que são responsáveis pela proteção do epitélio gástrico, e que possivelmente atuam na proteção da linhagem probiótica. No presente trabalho

foi verificada além do pH baixo (pH 2,0), a presença de mucina na sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

As células *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram avaliadas quanto à aplicação de tratamentos preliminares, térmico e ácido, e sua resposta a vários processos tecnológicos, como desidratação, liofilização ou *spray-drying*. Observou-se aumento na sobrevivência nas condições supracitadas (FURTADO, 2001; DO CARMO, 2006; LEANDRO, 2009). Dessa forma, se um estresse preliminar numa dose subletal for aplicado ao lactobacilo antes da produção do leite fermentado, provavelmente a sua viabilidade será maior durante o período de estocagem refrigerada e conseqüentemente tolerará melhor as condições prevalecentes no TGH, sendo esta uma estratégia que deve ser futuramente avaliada, pois o *L. delbrueckii* UFV H2b20, apresenta várias características fisiológicas, tecnológicas, imunológicas e genéticas desejáveis à probiose já comprovadas cientificamente (SANTOS, 1984; AGOSTINHO 1988; NEUMANN et al., 1998; LEITE, 2005; SILVA, 2007; LEITE, 2008; FLORESTA, 2008; FERREIRA, 2011, SANTOS et al. 2011; DO CARMO et al, 2011) .

As condições *in vitro* em que *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi exposto no presente estudo são bastante diferentes daquela situação *in vivo*. No entanto, o ensaio de tolerância *in vitro* forneceu importantes informações sobre o comportamento desta bactéria frente aos estresses avaliados.

#### **4.2 Genes relacionados à adesão em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

Genes possivelmente relacionados à adesão como os que codificam as proteínas de ligação à mucina (*mub*) e proteína da camada superficial – camada S (*slpA*) não foram detectados no presente estudo pela técnica de PCR e sequenciamento.

O gene *fbpA* que codifica a proteína de ligação a fibronectina foi identificado por PCR. Esse achado sugere que *L. delbrueckii* UFV H2b20 tem a capacidade de se ligar à fibronectina, uma glicoproteína dimérica da superfície celular do hospedeiro, o que pode justificar a conclusão de que a adesão dos *Lactobacillus* em tecidos da mucosa intestinal humana é supostamente mediada por proteínas da superfície celular e polissacárideos (LEBEER et al., 2008). Esta proteína de ligação a

fibronectina parece atuar como uma ponte proteica entre a superfície bacteriana e as proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, embora o mecanismo exato pelo qual esta interação ocorra não é compreendido (BUCK et al., 2005).

O genoma de *L. gasseri* ATCC 33323 tem o maior número de proteínas de ligação à mucina (Mub), possivelmente 14, entre os lactobacilos sequenciados. *Lactobacillus acidophilus* NCFM possui, várias proteínas de ligação à Mub (ALTERMANN et al., 2005) assim como o *L. plantarum* WCFS1 (KLEEREBEZEM et al., 2003). Já *L. johnsonii* NCC 533 possui vários homólogos Mub (PRIDMORE et al., 2004).

Análise do genoma *L. delbrueckii* ATCC 11842 (van de GUCHTE et al., 2006), *L. delbrueckii* BAA-365 (MAKAROVA et al., 2006), revelou ausência de genes que codificam proteínas da camada superficial – camada S, envolvidas na ligação à mucosa intestinal, importantes para a adaptação no intestino.

Em *L. rhamnosus* GG foram identificados vários tipos de proteínas com domínios relacionados à adesão e colonização do hospedeiro, sendo que várias destas proteínas continham domínios de ligação à fibronectina (KANKAINEN et al., 2009). *L. gasseri* ATCC 33323 (AZCARATE-PERIL et al., 2008), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (ALTERMANN et al., 2005), *L. plantarum* WCFS1 (KLEEREBEZEM et al., 2003) também possuem proteínas de ligação à Fbp.

Os genes que codificam FbpA, Mub e SlpA contribuem para a capacidade de *L. acidophilus* NCFM de se aderir às células Caco-2 *in vitro*. Mutação em *fbpA* resultou em redução de 76 % na aderência, em *mub* de 65 % e de 85 % quando em *slpA*, confirmando que a adesão é determinada por múltiplos fatores (BUCK et al., 2005).

Análise do genoma *L. delbrueckii* ATCC 11842 (van de GUCHTE et al., 2006), *L. delbrueckii* BAA-365 (MAKAROVA et al., 2006), revelou ausência de genes que codificam proteínas de superfície, proteína S, envolvidas na ligação à mucosa intestinal, importantes para a adaptação no intestino.

A análise comparativa da sequência parcial obtida do gene *fbpA* revelou alta identidade (98%) com os de *L. delbrueckii* ATCC 11842 (Tabela 2). A presença de *fbpA* em *L. delbrueckii* UFV H2b20 pode significar vantagem na sua capacidade de colonizar o intestino.

Tabela 2. Tamanho da sequência parcial obtida do gene *fbpA* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e seu respectivo valor de identidade em relação ao gene de *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842.

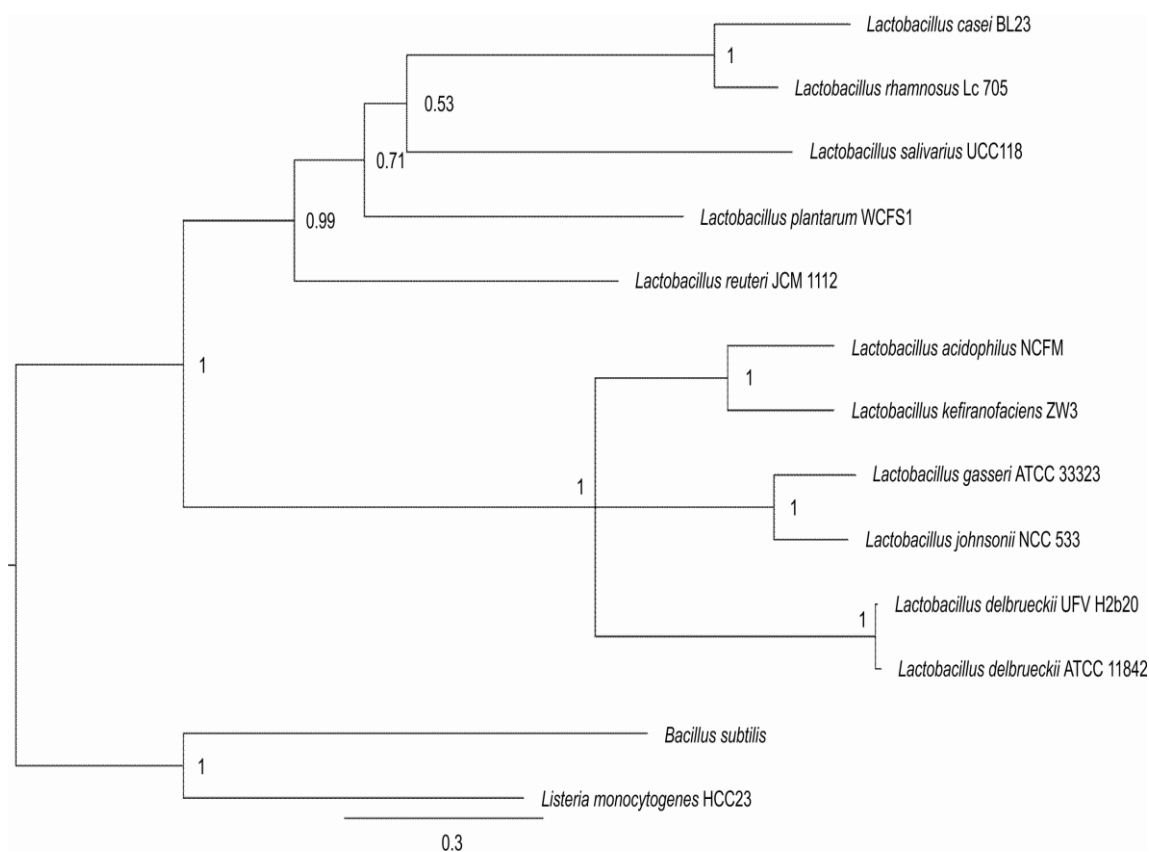
Gene	Sequência obtida <sup>a</sup>	Tamanho da sequência <sup>b</sup>	Identidade (BlastN)
<i>fbpA</i>	1099	1384	98 %

<sup>a</sup>Sequências parciais em pares de bases (pb) obtidas do sequenciamento dos genes de *L. delbrueckii* UFV H2b20

<sup>b</sup>Sequências dos genes em pares de bases (pb) de *L. delbrueckii* ATCC 11842, disponíveis no banco de dados NCBI

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Inferência Bayesiana com as sequências dos ortólogos do gene *fbpA*, apresentou altos valores de *bootstrap* na maioria dos ramos (Figura 7). A reconstrução da história evolutiva deste gene demonstrou que o mesmo se agrupou com os ortólogos de bactérias probióticas, o que indica que *L. delbrueckii* UFV H2b20 compartilha mecanismos de adesão com as linhagens probióticas analisadas. A sequência correspondente a *L. delbrueckii* UFV H2b20 agrupou com a de *L. delbrueckii* ATCC 11842, sugerindo uma proximidade filogenética entre os dois micro-organismos. Trabalhos anteriores revelaram resultados que confirmam esta maior proximidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a *L. delbrueckii* e suas subespécies, por experimentos de hibridização de DNA-DNA e em análises filogenéticas (SILVA, 2007; LEITE, 2008; MAGALHÃES et al., 2008; DO CARMO et al., 2011; FERREIRA, 2011).

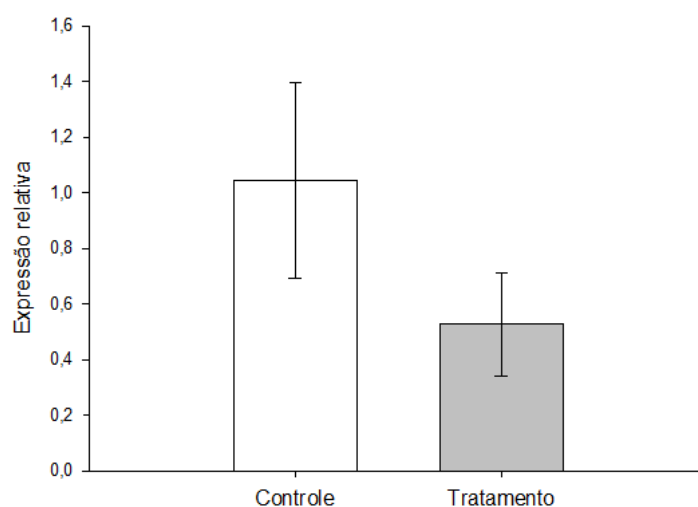
A partir da análise da sequência obtida pela técnica de PCR inversa foi possível determinar a presença de 155 pares de bases da região inicial do gene *fbpA* de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Logo, a sobreposição do produto de PCR inversa com o obtido pela PCR convencional resultou em uma nova sequência de nucleotídeos de 1099 pares de base. A sequência está disponível no GenBank com número de acesso NC:114846 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



**Figura 7.** Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayseiana com ortólogos do gene *fbpA*. *Listeria monocytogenes* HCC23 e *Bacillus subtilis* foram utilizados como grupo externo.

A exposição de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 incorporadas em uma matriz alimentar, o leite fermentado, por 240 minutos às condições prevalentes no TGH provocou redução da expressão do gene *fbpA* (Figura 8). Tal achado pode ser explicado pelo fato de a análise ter sido feita no final do tratamento, ou seja, após 4 horas, que era nosso objetivo neste trabalho. Este resultado não descarta o envolvimento deste gene na resposta ao estresse imposto pela simulação do trato gastrointestinal humano. Vale ressaltar que esta análise foi proposta dentro do contexto atual usado na seleção de bactérias probióticas: avaliação *in vitro* da funcionalidade e a análise genômica (MORELLI, 2007), dessa forma foi detectada a presença do gene *fbpA* com sucesso por PCR e sequenciamento, no entanto o tipo de resposta modulada pelo *L. delbrueckii* UFV H2b20 ainda permanece sem total compreensão, sendo que novas análises em intervalos de tempo menores são necessárias para compreender melhor o comportamento deste gene em relação às condições de estresse. Não há relatos na literatura sobre a expressão do gene em

estudo, apenas do papel de polissacarídeos extracelulares na resistência ao ácido e à bile em *L. acidophilus* e *L. Reuteri* (SCHAWAB et al., 2007). A produção destes polissacarídeos parece ser reduzida na presença de bile nestes micro-organismos. No entanto, a resistência ao pH de um mutante deficiente na produção de polissacarídeos extracelulares não foi afetada (SCHAWAB et al., 2007). O perfil de expressão dos genes de *L. casei* Zhang foi significativamente diferente durante o trânsito no suco gastrointestinal simulado quando as bactérias estavam em suspensão ou em leite fermentado (WANG et al., 2012).



**Figura 8.** Expressão relativa do gene *fbpA* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto às condições prevalentes no trato gastrointestinal humano, por 240 minutos. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

## 5. CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados mostraram que *L. delbrueckii* UFV H2b20 é capaz de tolerar as condições da estocagem refrigerada após 28 dias mantendo sua viabilidade em níveis superiores  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Quando submetida às condições prevalentes no TGH detectamos que a matriz alimentar avaliada, o leite fermentado, conferiu proteção.

O gene *fbpA* que codifica a proteína de ligação a fibronectina foi identificado por PCR e sequenciamento, sugerindo que *L. delbrueckii* UFV H2b20 tem a capacidade de se ligar a fibronectina. Este gene se agrupou com os ortólogos de bactérias probióticas. No entanto, a exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 incorporadas em leite fermentado, por 240 minutos às condições prevalentes no TGH provocou redução da expressão deste gene, detectado por RT-PCR. Estudos com mutantes são necessários para confirmar o envolvimento deste gene na adesão em *L. delbrueckii* UFV H2b20 sob condições de estresse.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, M. M. S. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo “In Vitro” e efeito de métodos de preservação de sua atividade.** 1988. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

ALTERMANN, E.; RUSSELL, W. M.; AZCARATE-PERIL, M. A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B. L.; McAULIFFE, O.; DOBSON, A.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 102: 3906-3912, 2005.

ARAÚJO, E. A.; CARVALHO, A. F.; LEANDRO, E. S.; FURTADO, M. M.; MORAES, C. A. Produção de queijo tipo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 39:111-118, 2009.

ANDERSON, R. C.; COOKSON, A. L.; MCNABB W. C.; KELLY, W. J.; ROY, N. C. *Lactobacillus plantarum* DSM2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. **FEMS Microbiology Letters**, 309:184–192, 2010.

AZCARATE-PERIL, M. A.; ALTERMAN, E.; GOH, Y. J.; TALLON, R.; SANOZKY-DAWES, R. B.; PFEILER, E. A.; O’FLAHERTY, S.; BUCK, B. L.; DOBSON, A.; DUONG, T.; MILLER, M. J.; BARRANGOU, R.; KLAENHAMMER, T. R. Analysis of the Genome Sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 Reveals the Molecular Basis of an Autochthonous Intestinal Organism. **Applied and Environmental Microbiology**, 74:4610-4625, 2008.

BARRET K.E & RAYBOULD H.E. The Gastric Phase of the Integrated Response to a Meal. In: KOEPPEN, B. M. & STANTON, B. A. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Elsevier; 2009. cap. 28, p.1-12.

BORCHERS, A.T.; SELMI, C.; MEYERS, F. J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Probiotics and immunity. **Journal of Gastroenterology**, 44:26–46, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE . Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 02 de 07 de janeiro de 2002: Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm)>. Acesso em 26 out. 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N° 46 de 23 de outubro de 2007: Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <[http://www.cidasc.sc.gov.br/html/servico\\_animal/Inspecao%20Animal/ORIENTA%C7%D5ES%20SOBRE%20ROTULAGEM/LEITE%20E%20DERIVADOS/IN%20046\\_07\\_RTIQ%20leites%20fermentados.pdf](http://www.cidasc.sc.gov.br/html/servico_animal/Inspecao%20Animal/ORIENTA%C7%D5ES%20SOBRE%20ROTULAGEM/LEITE%20E%20DERIVADOS/IN%20046_07_RTIQ%20leites%20fermentados.pdf)>. Acesso em 26 out. 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, atualizado em julho de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em 26 out. 2011.

BRON, P. A.; VAN BAARLEN, P.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature reviews-Microbiology**, 10: 66-78, 2012.

BRON, P. A.; KLEEREBEZEM, M. Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. **Bioengineered Bugs**, 2:80-87, 2011.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, 34: 597–60, 2005.

BUCK, B. L.; ALTERMANN, E.; SVINGERUD, T.; KLAENHAMMER, T.R. Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and Environmental Microbiology**, 71: 8344–8351, 2005.

CALLANAN, M.; KALETA, P.; O'CALLAGHAN, J.; O'SULLIVAN, O.; JORDAN, K.; MCAULIFFE, O. et al. Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. **Journal of Bacteriology**, 2:727–735, 2008.

CHAILLOU, S.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M. C.; CORNET, M.; CRUTZ-LECOQ, A. M.; DUDEZ, A. M.; MARTIN, V.; BEAUFILS, S.; DARBON-RONGE`RE, E.; BOSSY, R.; LOUX, V.; ZAGOREC, M. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nature Biotechnology**, 12:1527–1533, 2005.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, 142: 185-189, 2010.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELL, L.; COLLINS, J. K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, 84:759–768, 1998.

DE MAN, J.D.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E.. "A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*". **Journal Applied Bacteriology**, 23: 130–135,1960.

DO CARMO, A. P. **Produção de cultura DVS (Direct Vat Set) para *L. delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo minas frescal**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

DO CARMO, A. P; DA SILVA, D. F.; DE OLIVEIRA, M. N. V; Borges, A.C.; De CARVALHO, A. F. e De MORAES, C. A. Genes involved in protein metabolism of probiotic lactic acid bacterium *L. delbrueckii* UFV H2b20. **Beneficial Microbes**, 2: 27-38, 2011.

DOMMELS, Y. E. M.; KEMPERMAN, R. A.; ZEBREGS, Y. E. M. P.; DRAAISMA, R. B.; JOL, A.; WOLVERS, D. A. W.; VAUGHAN, E. E.; ALBERS. R. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the Human Gastrointestinal Tract with Daily Consumption of a Low-Fat Probiotic Spread. **Applied and Environmental Microbiology**, 75:6198–6204, 2009.

FERREIRA, A. B. **Estudo da resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20 submetido a condições de estresse**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

FERREIRA, A. B. **Respostas fisiológicas e moleculares de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 aos estresses ácido e por sais biliares**. 2011. 114f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

FURTADO, W. C. A. **Efeito de choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 em leite em pó.** 2011. 34f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

FLORESTA, A. F. **Características de superfície de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 probiótico.** 2008. 107f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 2008.

GRANATO, D., BRANCO, G. F., NAZZARO, F., CRUZ, A. G., FARIA, J. A. F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9:292-302, 2010.

GERMOND, J. E.; LAPIERRE, L.; DELLEY, M. ; MOLLET, B.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Evolution of the Bacterial Species *Lactobacillus delbrueckii*: A Partial Genomic Study with Reflections on Prokaryotic Species Concept. **Molecular Biology and Evolution**, 20:93–104, 2003.

HENDERSON, B.; NAIR, S.; PALLAS, J.; WILLIAMS, M. A. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. **FEMS Microbiology Reviews**, 35: 147–200, 2011.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 153:216–222, 2012.

JIMÉNEZ, E.; MARTÍN, R.; MALDONADO, A.; MARTÍN, V.; SEGURA, A. G.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a Probiotic Strain Isolated from Human Milk and Infant Feces. **Journal of Bacteriology**, 192:5266-5267, 2010.

KANKAINEN, M.; PAULIN, L.; TYNKKYNNEN, S.; VON OSSOWSKI, I.; REUNANEN, J.; PARTANEN, P. et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 40:17193–17198, 2009.

KANT, R.; BLOM, J.; PALVA, A.; SIEZEN, R. J.; VOS, W. M. Comparative genomics of *Lactobacillus*. **Microbial Biotechnology**, 1-10, 2010.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; van KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O. P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S. A.; SANDBRINK, H. M.; FIERS, M. W. E. J.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R. M. K.; BRON, P.

A.; HOFFER, S. M.; GROOT, M. N. N.; KERKHOVEN, R.; VRIES, M.; URSING, B.; DE VOS, W. M.; SIEZEN, R. J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 4: 1990–1995, 2003.

KLEEREBEZEM, M.; HOLS P.; BERNARD E.; ROLAIN T.; ZHOU M.; SIEZEN R. J.; BRON P. A. The extracellular biology of the *lactobacilli*. **FEMS Microbiology Reviews**, 34:199–230, 2010.

KUROKAWA, K.; ITOH, T.; KUWAHARA, T.; OSHIMA, K.; TOH, H.; TOYODA, A.; TAKAMI, H.; MORITA, H.; SHARMA, V. K.; SRIVASTAVA, T. P.; TAYLOR, T. D.; NOGUCHI, H.; MORI, H.; OGURA, Y.; EHRLICH, D. S.; ITOH, K.; TAKAGI, T.; SAKAKI, Y.; HAYASHI, T.; HATTORI, M. Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes. **Dna research**, 14:169–181, 2007.

LEE, Y.K ; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology** 6: 241-245, 1995.

LEANDRO, E. S. **Tolerância ao congelamento em mutantes de *L. delbrueckii* UFV H2b20**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

LEITE, M. O. **Processos para desenvolvimento de produtos lácteos probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

LEITE, M. C. T. **Identificação, caracterização e análise da expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. 2008. 141f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

LEEBER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72:728-764, 2008.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; De KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews –Microbiology**, 8: 171-184, 2010.

LEVERRIER, P.; FREMONT, Y.; ROUAULT, A.; BOYAVAL, P.; JAN, G. In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices. **Food Microbiology** 22:11–18, 2005.

LEY, R. E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 102: 11070–11075, 2005.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, 25:402-408, 2001.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W.B. Taxonomic outline of the phylum Firmicutes. In: VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W.B. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: In press, 2009.v.3:, p. 393-394.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, 44:465–470, 2011.

MAGALHÃES, J. T., UETANABARO, A. P. T., MORAES, C.A. Identification of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 (Probiotic strain) using DNA-DNA hybridization. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:524-546, 2008.

MAKAROVA, K.; SLESAREV, A.; WOLF, Y.; SOROKIN, A.; MIRKIN, B.; KOONIN, E. et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 103:15611–15616, 2006.

MAZÉ, A.; BOËL, G.; ZÚÑIGA, M.; BOURAND, A.; LOUX, V.; YEBRA, M.J. et al. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. **Journal of Bacteriology**, 10: 2647–2648, 2010.

MISHRA, C.; LAMBERT, J. Production of anti-microbial substances by probiotics. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. 5: 20-24,1996.

MONTEIRO, R. C. B. **Resposta ao estresse térmico em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1999. 59f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,1999.

MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**, 17:1278–1283, 2007.

MORITA, H.; TOH, H.; FUKUDA, S.; HORIKAWA, H.; OSHIMA, K.; SUZUKI, T. et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus*

*fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. **DNA Research**. 3: 151–161, 2008.

MUÑOZ-PROVENCIO D.; PÉREZ-MARTÍNEZ G.; MONEDERO V. Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. **Journal of Applied Microbiology**. 108:1050–1059, 2010.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M. A.; CABRAL, C. M.; MOURA, L. N.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; CARA, D. C.; PODOPRIGORA, G. I.; VIEIRA, L. Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 31: 1565-1573, 1998.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T. R. The Impact of Omic Technologies on the Study of Food Microbes. **Annual Reviews Food Science Technology**, 2:353–71, 2011.

O'HARA, A.M. & SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO Reports**, 7: 688–693, 2006.

OJALA, T.; KUPARINEN, V.; KOSKINEN, J. P.; ALATALO, E.; HOLM, L.; AUVINEN, P. et al. Genome sequence of *Lactobacillus crispatus* ST1. **Journal Bacteriology**, 13:3547–3548, 2010.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J. The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-viable Bacteria. **International Dairy Journal**, 8:749-758,1998.

van de GUCHTE, M.; PENAUD, S.; GRIMALDI, C.; BARBE, V.; BRYSON, K.; NICOLAS, P. et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 24: 9274–9279, 2006.

PACHECO, K. C.; TORO, G. V.; MARTÍNEZ, F. R.; DURÁN-PÁRAMO, E. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* Under Human Gastrointestinal Conditions Simulated *In Vitro*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences** 1: 37-42, 2010.

PFALL, M. W. A new mathematic model for relative quantification in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 29: 45-53, 2001.

PRIDMORE, R. D.; BERGER, B.; DESIERE, F.; VILANOVA, D.; BARRETO, C.; PITTET, A. C.; ZWAHLEN, M.; ROUVET, M.; ALTERMAN, E.; BARRANGOU, R.; MOLLET, B.; MERCENIER, A.; KLAENHAMMER, T.; ARIGONI, F.;

SCHELL, M. A. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 101:2512-2517, 2004.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Human Microbiomics. **Indian Journal of Microbiology**, 50:109–112, 2010.

REED, K. K.; WICKHAM R. Review of the Gastrointestinal tract: from macro to micro. **Seminars in Oncology Nursing**, 25:3-14, 2009.

REID, G.; SANDERS, M. E.; GASKINS, H. R.; GIBSON, G. R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T. R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **J. Clinical Gastroenterology**, 37:105-118, 2003.

RIBEIRO, M. A. **Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1995. 60f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

SÁNCHEZ, B.; URDACI, M. C.; MARGOLLES, A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa–bacteria interactions. **Microbiology**, 156: 3232–3242, 2010.

SANDERS, M. E.; in't VELT, J. H. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. **Antonie van Leeuwenhoek**, 76: 293–315, 1999.

SANTOS, L. M.; SANTOS, M. M.; SILVA, H. P. S.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. **Medical Microbiology Immunology**, 200:29–38, 2011.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético**. 1984. 69f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1984.

SAXELIN, M.; AHOKAS, M.; SALMINEN, S.. Dose response on the faecal colonisation of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 6: 119–122, 1993.

SCHWAB, C.; WALTER, J.; TANNOCK, G. W.; VOGEL, R. F.; GANZLE, M. F. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. **Systematic and Applied Microbiology**, 30:433-443, 2007.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, 90: 859–904, 2010.

SILVA, D.F. **Filogenia molecular e genômica comparativa de bactérias gram-positivas do trato gastrointestinal**. 2007. 107f.Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SUÁREZ, V.; ZAGO, M.; GIRAFFA, G.; REINHEIMER, J.; QUIBERONI, A. Evidence for the presence of restriction/modification systems in *Lactobacillus delbrueckii*. **Journal of Dairy Research**, 76:433–440, 2009.

TANNOCK, G. W. Microbial succession and gut health: probiotics. In: JAYKUS, L.A.; WANG, H. H.; SCHLESINGER, L. S. (Eds). **Food-Borne Microbes : Shaping the host ecosystem**. ASM Press:Washington, D.C., 2009., cap 4, p.63-79.

TSO P. Gastrointestinal secretion, digestion, and absorption . In: Rhoades R.A. & Tanner G.A. **Medical Physiology**, 2<sup>a</sup>. ed., 2003. cap. 27, p. 481-512.

TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. **Science Translational Medicine**, 6: 1-19, 2009.

VÉLEZ, M. P.; De KEERSMAECKER, S. C.J.; Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, 276: 140–148, 2007.

YU, Z.; MORRISON, M. The gut microbiome: current understanding and future perspectives. In: JAYKUS, L.A.; WANG, H. H.; SCHLESINGER, L. S. (Eds). **Food-Borne Microbes : Shaping the host ecosystem**. ASM Press:Washington, D.C., 2009., cap 2, p.19-39.

WANG, J., GUO, Z., ZHANG, Q., YAN, L., CHEN,W., LIU, X.M., ZHANG, H.P., Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, 92: 2468-2476, 2009.

WANG, Y.; WANG, J.; AHMED, Z.; BAI, X.; WANG , J. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3. **Journal of Bacteriology**, 193:4280–4281, 2011.

WANG, J., et al., Comparative analysis of the gene expression profile of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang with and without fermented milk as a vehicle during

transit in a simulated gastrointestinal tract, **Research in Microbiology** (2012), doi:10.1016/j.resmic.2012.04.002

ZHANG, Z. Y.; LIU, C.; ZHU, Y. Z.; ZHONG, Y.; ZHU, Y. Q.; ZHENG, H. J.; ZHAO, G. P.; WANG, S. Y.; GUO, X. K. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. **Journal of Bacteriology**, 191:5020-5021, 2009.

ZHOU, T.; LI, B.; PENG, C.; JI, B; CHEN, G.; REN Y. Assessment of the Sequential Simulated Gastrointestinal Tolerance of Lactic Acid Bacteria from Kefir Grains by Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**,74: 328-334, 2009.