

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

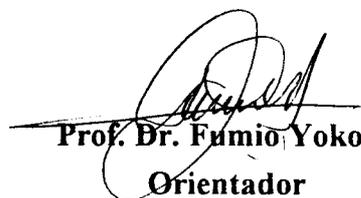
ESTUDO GENÉTICO, FISIOLÓGICO E MOLECULAR DE *Lactobacillus*
fermentum ENVOLVIDOS NA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Marianne Karin Biben Frederick e aprovada pela Comissão Julgadora em 25.08.94.

Marianne Karin Biben Frederick

Orientada


Prof. Dr. Fumio Yokoya
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos

Campinas
1994

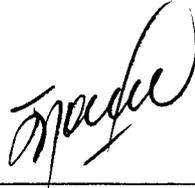
BANCA EXAMINADORA



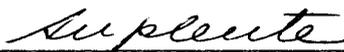
Prof. Dr. Fumio Yokoya
(orientador)



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(membro)



Prof. Dr. Tomomasa Yano
(membro)



Prof.ª Dr.ª Lucia Regina Durrant
(membro)

Campinas, 25 de agosto de 1994.

Para
minha mãe, meu pai
e família,

dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente às pessoas e instituições que muito colaboraram para a realização de minha tese:

Prof. Dr. Fumio Yokoya, pelos ensinamentos, paciência e exemplo de pesquisador.

Dra. Alda Luisa Lerayer (ITAL) pelas técnicas de genética de lactobacilos e apoio no desenvolvimento da tese.

Prof. Dr. Renato Bonatelli (póstumo) pelos aconselhamentos, amizade e incentivo em todos os momentos cruciais da tese.

Giuliana Ferris pela técnica de cromatografia dos ácidos graxos.

Prof. Dr. Tomomasa Yano (IB-UNICAMP) pela amizade e acolhida em seu laboratório nos ensaios de remoção de proteínas superficiais bacterianas, além das correções e sugestões na tese.

Prof. Dr. Vanderlei Canhos e Prof. Dra. Lucia Durrant pela atenta leitura da tese e sugestões valiosas.

CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e FAEP-UNICAMP pelo auxílio ponte.

Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", pela doação das culturas, liofilização e empréstimo de equipamentos de eletroforese entre outros.

Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pelo estágio e pela gentil acolhida na Seção de Leite e Derivados e na de Fermentações, durante o desenvolvimento da parte de genética meu trabalho de tese.

Minhas *Amigas*: Nadja, Sílvia, Marcella, Cristiana, Carol, Stella, Lú Benzinho, Lú Sertão, Rosa, Vanira, Grasiela, pelo amor incondicional.

Amigos do Depto. de Ciência: Rosinha, Daniela, Renata, Raquel, Mari, Oliver, Lara, D. Olivia, Flávio, Zizi, Profa. Pilar, Jaqueline, Cícera, Jardete, Franceli, Marquinhos, que muito me ajudaram em todo o tipo de dificuldade.

Amigos do Depto de Tecnologia: Prof. Ramón, Prof. Contreras, Prof. Horácio, Prof. Salvador, Ana Lourdes, Marcão, pelo apoio e carinho.

Amigos da FEA: Fátima, Miro, Toninho, Creuza, Cláudia, Geraldo, Jonas, Cícero, Cris, Telma, Zezé, pela valiosa ajuda especializada.

Amigos do Instituto de Biologia: Profa. Lucila Ricci, Profa. Sílvia Gatti, Prof. Domingos, Dra. Marlene, Prof. Wanderley, Fabiana, Paula, Izildinha, Fabrícia, Mara, Valéria, Estela, pelos ensinamentos, amizade e apoio que tanto contribuíram para minha formação como para o meu desenvolvimento acadêmico.

Tony (Univ. of New Castle) e Martin (Natural History Museum, London) pela ajuda e carinho via *e-mail*.

Miriam T. dos Santos, por ter sido e ser meu braço direito nas dificuldades cotidianas, além de companheira constante nas comemorações de minhas vitórias.

Beatriz H. M. de Castro pela fiel amizade e carinho em todos estes anos agitados e sem dúvida melhores pela sua presença.

Rodrigo Herrera pelo apoio nos primeiros passos desta longa caminhada e pela sincera amizade dedicada atualmente.

Wilson Fusco pela constante presença, paciência e amor neste momento decisivo e muito feliz de minha vida.

Amigos especiais: Rudi, Pira, Gordo, Caio, Mônica, Mauro, Marquinhos, Maristela, Sérgio, Bello, Lisandro, Zé Paulo, Atropelo, Zuim, Axé, E.T., Xá, Vichi, Zezé, Cré, Nelsinho, Marcão, Sis, Pezim, Paula, Cobaia, Roberta, Errol, Gaucho, Alê, Luiz Fernando, Dagoma, Perê, Leite, João, Vicente, Luciana, Artur, Alexandre, Ivan, Lau-Carlinha, Porcê, Christiaan, Thiago, Toninho,

Rodrigão, Mário, Pablo, Priscila, Gorda, Zé, Paulinho, Guida, Jacaré, Brian, Purga, Jebolino, Galba, Melissa, Dinha e Ed, Tia Regina e Tio Roberto, Gidete, Simone, Gisele, Thiago, Caco, Biel, Helô, Guilherme Canguçu, Mestre Cícero, entre muitos outros, pelas "cervejas" de todas as horas e lugares, indispensáveis para o decorrer sadio da tese.

*Tudo o que é verdadeiro deve se transformar e
somente o que se transforma permanece
verdadeiro.*

C. G. Jung

ÍNDICE

Índice	i
Índice de Tabelas	iii
Índice de Figuras	iv
Resumo	v
Summary	vi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1. Contaminação da fermentação alcoólica e Flocculação	02
2.1.1. Leveduras flocculentas	03
2.1.2. Flocculação por bactérias contaminantes	05
2.2. Fenômenos de adesão em <i>Lactobacillus</i>	06
2.3. Genética de <i>Lactobacillus</i>	07
2.4. Caracterização Fisiológica de <i>Lactobacillus</i>	10
2.5. Caracterização Molecular de <i>Lactobacillus</i>	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Microrganismos	13
3.2. Isolamento e Teste de flocculação de leveduras	13
3.3. Tratamentos para a lise de <i>Lactobacillus fermentum</i>	15
3.3.1. Ultrassom	15
3.3.2. Ultrassom e elevada concentração de lisozima	15
3.3.3. Lisozima	15
3.4. Tratamentos para a remoção de proteínas superficiais	16
3.4.1. Blender	16
3.4.2. Ultrassom de banho	16
3.4.3. Temperatura	16

3.5. Análise Genética	16
3.5.1. Determinação do perfil de DNA plasmidial	16
3.6. Análise Fisiológica	18
3.6.1. Assimilação de açúcares	18
3.6.2. Catalase	18
3.6.3. Benzidina	18
3.6.4. Morfologia	19
3.6.5. Crescimento à 15°C e 45°C	19
3.6.6. Produção de gás	19
3.7. Análises Moleculares	19
3.7.1. Determinação do perfil cromatográfico de ácidos graxos de membrana plasmática	19
3.7.2. Determinação do perfil eletroforético de proteínas totais	21
3.7.3. Determinação do perfil eletroforético de proteínas de parede	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Teste de floculação de leveduras por colônias isoladas de <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i> FTPT 1405 e 1407	23
4.2. Lise de <i>Lactobacillus fermentum</i>	25
4.3. Remoção de proteínas superficiais	27
4.4. Extração de plasmídios de <i>Lactobacillus fermentum</i> FTPT 1405	29
4.5. Caracterização fisiológica	31
4.6. Caracterização molecular	32
4.6.1. Perfil cromatográfico dos ácidos graxos de membrana plasmática ..	32
4.6.2. Perfil eletroforético de proteínas totais	42
4.6.3. Perfil eletroforético de proteínas de parede	42
4.7. Considerações finais	45
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Capacidade de floculação de leveduras das colônias de <i>Lactobacillus fermentum</i> isoladas a partir das linhagens FTPT 1405 e FTPT 1407....	23
TABELA 2. Efeito do tratamento na lise e capacidade floculadora nas culturas de <i>Lactobacillus fermentum</i> após tratamento com 5 mg/ml de lisozima por uma noite.....	26
TABELA 3. Efeito do tratamento com blender na capacidade floculadora de <i>Lactobacillus fermentum</i>	28
TABELA 4. Efeito do tratamento com ultrassom de banho na capacidade floculadora de <i>Lactobacillus fermentum</i>	28
TABELA 5. Testes de assimilação de açúcares em linhagens e isolados de <i>Lactobacillus fermentum</i>	31
TABELA 6. Testes bioquímicos em linhagens e isolados de <i>Lactobacillus fermentum</i>	31
TABELA 7. Composição de ácidos graxos (%) de membrana celular de <i>Lactobacillus fermentum</i> utilizando cromatografia gasosa nas condições do experimento 1.....	38
TABELA 8. Composição de ácidos graxos (%) de membrana celular de <i>Lactobacillus fermentum</i> utilizando cromatografia gasosa nas condições do experimento 2.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Visualização do teste de floculação, onde (A) cultura não-floculadora, (B) fracamente floculadora, (C) floculadora e (D) fortemente floculadora.... 14
- FIGURA 2. Esquema do perfil eletroforético de DNA plasmidial de *Lactobacillus* (A) padrão de peso molecular, (B) plasmídios de de *L. plantarum* e (C) banda correspondente ao DNA cromossômico de *L. fermentum* 30
- FIGURA 3. Cromatografia qualitativa de camada delgada dos ácidos graxos de membrana das culturas de *Lactobacillus fermentum* (1) FTPT 1405, (2) 1405 NF1, (3) 1405 NF1M, (4) FTPT 1407, (5) 1407 P2 e (6) 1407 F3 33
- FIGURA 4. Cromatografia gasosa dos ácidos graxos de membrana de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 nas condições do experimento 2 36
- FIGURA 5. Cromatografia gasosa dos ácidos graxos de membrana de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1407 nas condições do experimento 2 37
- FIGURA 6. Composição dos principais ácidos graxos de membrana celular de *Lactobacillus fermentum* por cromatografia gasosa - experimento 1 40
- FIGURA 7. Composição dos principais ácidos graxos de membrana celular de *Lactobacillus fermentum* por cromatografia gasosa - experimento 2 41
- FIGURA 8. Perfil eletroforético de proteínas totais (A) padrão de peso molecular, (B) FTPT 1405, (C) 1405 NF1, (D) 1405 NF2, (E) 1405 NF1M, (F) FTPT 1407 e (G) FTPT 2571 43
- FIGURA 9. Perfil eletroforético de proteínas de parede (A) padrão de peso molecular, (B) FTPT 1405, (C) 1405 NF1, (D) 1405 NF2, (E) 1405 NF1M, (F) FTPT 1407 e (G) FTPT 2571 44

RESUMO

Os microrganismos contaminantes das dornas de fermentação alcoólica causam grandes prejuízos econômicos à indústria do álcool. Entre estes contaminantes, sabe-se que o *Lactobacillus fermentum* provoca a floculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, diminuindo o contato destas com o substrato e reduzindo o rendimento, além do aumentar o tempo de fermentação. A capacidade de flocular leveduras não é encontrada em todas as linhagens de *L. fermentum*, e quando presente pode ser perdida após seguidos subcultivos. Este trabalho procurou estudar o fator responsável pela capacidade de floculação através da caracterização genética, fisiológica e molecular de linhagens e isolados de *L. fermentum* FTPT 1405, 1405 NF1, 1405 NF1M, FTPT 1407, 1407 P2 e 1407 F3, floculadoras e não-floculadoras de leveduras. Foi observada grande instabilidade do fator na população de *L. fermentum* FTPT 1405, na proporção 598:1 colônias floculadoras:colônias não-floculadoras. Utilizando os métodos de extração de DNA plasmidial descritos por ANDERSON & McKAY (1983) e PORTNOY (1981) não foi possível a detecção de plasmídios. As culturas floculadoras e não-floculadoras assimilaram os mesmos açúcares (galactose, trealose, frutose, rafinose, maltose, manose e ribose), foram catalase e benzidina negativas, produtoras de gás com crescimento positivo à 45°C e negativo à 15°C. A caracterização molecular realizada através de perfis de ácidos graxos e proteínas não apresentou diferenças marcantes entre as culturas floculadoras e não-floculadoras. A dificuldade de lise dos lactobacilos foi superada utilizando-se 10 mg/ml de lisozima à 37°C por 1h para posterior extração de DNA plasmidial e 5 mg/ml de lisozima à 37°C por uma noite para extração de proteínas. Não se observou remoção de proteínas superficiais em tratamentos com intensa agitação ou temperatura, indicando que tais proteínas devem estar intrinsecamente ligadas à parede bacteriana.

SUMMARY

The microbial contaminants of fermentation vats are responsible for considerable economical loss in fuel alcohol industry. Among these contaminants, *Lactobacillus fermentum* is known to cause flocculation of yeasts cells with reduction on yield and productivity of fermentation process. The flocculation ability is found only in some strains of *L. fermentum*, and it may be lost by consecutive subculture.

This work is carried out to investigate the factor responsible of flocculation ability by genetical, molecular and physiological characterization of flocculating and non-flocculating strains of *L. fermentum*. It was observed that flocculating ability was quite instable but the plasmids were not detected by methods of Anderson and Mckay (1983) or Portnoy (1981). No difference in biochemical and physiological properties was found between flocculant and non-flocculant strains of *L. fermentum*. Also there was no detectable difference in fatty acids and protein composition between these strains. Surface protein could not be removed by vigorous shaking or temperature treatment indicating that it is firmly bound to cell envelope.

1. INTRODUÇÃO

A indústria do álcool tem sofrido perdas econômicas significativas devido à contaminação bacteriana das dornas de fermentação. Estes microrganismos causam prejuízos por vários motivos, sendo os mais importantes: 1. a degradação da sacarose com formação de ácidos orgânicos como os ácidos láctico e acético; 2. a floculação, onde as células de levedura aglomeram-se formando flocos que dificultam o contato com o substrato, reduzindo o rendimento e aumentando o tempo de fermentação; e 3. a inibição da atividade da levedura pelo efeito dos contaminantes.

A indústria brasileira de álcool utiliza principalmente o processo de Melle-Boinot, no qual se reutilizam as mesmas leveduras em seguidos ciclos fermentativos. Podemos constatar que o problema da floculação de leveduras por contaminantes microbianos é intensificado, já que este processo provoca o acúmulo dos agentes de floculação e conseqüente dificuldade de separação da levedura na etapa de centrifugação.

Dentre os contaminantes das dornas de fermentação, as bactérias lácticas são de grande importância, sendo que o gênero *Lactobacillus* representa 60 % das espécies bacterianas encontradas neste meio, com o predomínio de *Lactobacillus fermentum* (GALLO, 1990).

Algumas linhagens de *Lactobacillus fermentum* tem a característica de provocar floculação numa suspensão de células de levedura, sendo que a proporção em que ocorre a floculação máxima é de 5 células da bactéria para 1 de levedura (YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991). Esta característica não está presente em todas as linhagens de *L. fermentum*, e quando presente pode ser perdida após sucessivas gerações (SANTOS, 1991).

Este trabalho tem por objetivo a avaliação da estabilidade do fator responsável pela capacidade de flocular leveduras *Saccharomyces cerevisiae*; em linhagens de *Lactobacillus fermentum*, através de estudos genéticos visando a localização do gene que codifica este fator ; a caracterização fisiológica procurando comparar o perfil bioquímico de colônias floculadoras e não-floculadoras de leveduras *S. cerevisiae* e a caracterização molecular dos ácidos graxos e proteínas das mesmas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminação da fermentação alcoólica e Floculação

Entre as primeiras informações a respeito de contaminantes da fermentação alcoólica temos o trabalho de DEJONGUE (1989), citado por SERRA (1977), onde descreve como fermentações acidentais a acética, láctica e butírica.

A primeira publicação sobre este assunto feita no Brasil parece ser de NEVES (1938), citando a contaminação do caldo de cana e do melaço por outras fermentações, entre elas a láctica. Nela é dada ênfase a várias espécies de *Bacillus sp* (bastonetes isolados, reunidos 2 a 2 ou em cadeias), e *Streptococcus sp* (coco em cadeia). Como principais características desta fermentação citou acidez crescente do mosto e a diminuição da liberação de gás carbônico.

GALLI (1961) afirmou que a fermentação láctica é produzida por um grande número de bactérias, sendo a maioria pertencente à família Lactobacillaceae. A fermentação láctica se desenvolve em mosto ligeiramente ácido, próximo à neutralidade, sendo a acidez excessiva desfavorável ao seu desenvolvimento. Geralmente ocorre a temperaturas relativamente elevadas, por exemplo, o *Streptococcus lactis* e o *Lactobacillus casei* a 30 - 35°C; o *L. delbruckii* e o *L. bulgaricus* a 40 - 45°C ou mais.

As condições de pH e temperatura de cada etapa da fermentação alcoólica irão selecionar o desenvolvimento particular de cada espécie de microrganismo. Nos caldos das moendas, devido ao pH baixo, há crescimento de microrganismos acidófilos como *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (TILBURY, 1975). Com esta contaminação temos como maior prejuízo a degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético, pois há perda do açúcar disponível e "intoxicação" das leveduras pelos metabólitos formados.

No trabalho de SERRA *et alii* (1976), conduzido numa usina do Estado de São Paulo, destacou-se que a principal característica da contaminação da fermentação alcoólica é a formação de pequenos flocos compostos por células de levedura e bactéria, cuja formação ocorre no mosto em fermentação. No fermento separado pelas centrífugas, é mais acentuado e visível este fenômeno. A adição de ácido sulfúrico (durante o tratamento do fermento) provoca a separação das células aglomeradas, desfazendo os flocos e liberando a bactéria infectante, a qual não é destruída, mesmo a pH 1,9 - 2,0. Antes da adição de ácido detectou-se várias espécies de *Bacillus sp* no fermento, mas

apenas uma, relatada como *Sporolactobacillus sp* resistiu ao tratamento, sendo apontada como agente causal. Sugere-se que a floculação de leveduras ocorra devido à presença de uma capa protéica nas bactérias, de natureza gelatinosa, fixando mecanicamente as células de leveduras. Com isto se observa um aumento no tempo de fermentação pela diminuição da superfície útil da levedura, acarretando uma queda de aproximadamente 15% no rendimento.

AMORIM e OLIVEIRA (1982) citaram também o efeito deste tipo de contaminação e ressaltam a necessidade de controle microbiológico para aumentar o rendimento final da produção de álcool e ALBERTUM *et alii* (1984) constaram que o rendimento alcoólico de uma fermentação pode ter uma redução de 20 a 98% do rendimento teórico, quando em presença de concentrações maiores que 10^8 células de bactéria/ml.

GALLO (1990) fez um levantamento dos microrganismos na indústria alcooleira de São Paulo, indicando que cerca de 65% das espécies bacterianas isoladas das dornas de fermentação eram do gênero *Lactobacillus*, enquanto KAJI (1989) cita que a presença de *Lactobacillus* deve ser de maior significado nas dornas, uma vez que os *Leuconostoc* não sobreviveram por um período muito longo nas condições normais da fermentação alcoólica.

O fenômeno da floculação de leveduras pode ser devido (1) à presença de linhagens floculentas de leveduras, as quais no término da fase exponencial ou estacionária de seu crescimento (MILL, 1964) se agregam para formar flocos que sedimentam (BEAVAN *et alii*, 1979; STRATFORD & KEENAN, 1988; STRATFORD *et alii*, 1988) ou pela (2) presença de bactérias contaminantes (SERRA *et alii*, 1976; YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991).

2.1.1. Leveduras floculentas

Em alguns tipos de fermentações, como nas cervejarias e vinícolas, a floculação é desejável pois facilita a separação das leveduras do mosto num estágio desejado (CALLEJA, 1987), enquanto é indesejável na produção de destilados, onde as células de leveduras devem estar em suspensão até o esgotamento total dos açúcares do mosto (ROSE, 1980). No primeiro caso, a floculação também é vantajosa pois evita perda de células durante as lavagens nos processos em batelada e aumenta a produtividade (ESSER & KUES, 1983).

Existem diversos modelos que procuram explicar como ocorre a floculação. CALLEJA (1987) descreve a agregação sexual das leveduras por componentes complementares nas superfícies celulares, podendo ocorrer como mecanismo de sobrevivência a condições adversas. O modelo

sugerido por JOHNSON *et alii* (1988) de interação proteína-proteína dos agregados sexuais, difere do modelo proteína-carboidrato sugerido como não sexual, onde haveria a participação de lectinas e açúcares, com interferência de íons, agentes quelantes e açúcares dispersos (STRATFORD & ASSINDER, 1991).

O fenômeno da floculação é determinado por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais.

O modelo de floculação descrito por MILL (1964), baseia-se em princípios físico-químicos, onde íons cálcio formariam pontes entre sítios receptores da superfície de duas células. Estas ligações seriam estabilizadas por pontes de hidrogênio entre carboidratos da parede das células envolvidas.

A influência ambiental na floculação tem sido amplamente estudada. As leveduras são capazes de flocular somente na presença de íons metálicos, particularmente cátions bivalentes, apresentando uma especificidade por cálcio (CALLEJA, 1987; STRATFORD, 1989b). Estes íons atuam como cofatores na capacidade ligante da proteína e estabilizam a sua ligação com os carboidratos (mananas) das células adjacentes (MIKI *et alii*, 1982). A proteína apresenta características de lectina, pois ambas possuem especificidade por íons metálicos que possibilitam a ligação com o açúcar, como no caso da concanavalina A (LIS & SHARON, 1986).

Na revisão de LEWIS *et al.* (1976) são citados três genes poliméricos responsáveis pela floculação em *Saccharomyces cerevisiae*, o FLO 1, FLO 2 e flo 3, não observando diferença na característica quando FLO 1 e FLO 2 estavam presentes em homozigose ou heterozigose. A instabilidade destes três genes parece extremamente alta, sendo a taxa de mutação bem maior que a taxa de mutação reversa. Contudo, a maioria das leveduras industriais apresenta uma taxa de mutação de ambos os três alelos dominantes de no máximo 10^{-8} cels/ geração e o acúmulo de células não-floculentas seria evitado pela contínua seleção a favor das células floculentas.

Atualmente sabe-se que a floculação é determinada por genes dominantes FLO 1, FLO 2, FLO 4, alelos formando o locus FLO 1 (RUSSELL *et alii*, 1980), FLO 5 (VEZINHET *et alii*, 1991), FLO 8 (YAMASHITA & FUKUI, 1983) e tup 1 (LIPKE & HULL-PILLSBURY, 1984).

O efeito inibitório de alguns açúcares na floculação de *Saccharomyces cerevisiae* levou STRATFORD (1989b) a dividir a espécie em dois grupos fenotípicos: (1) Flo 1, as quais possuem os genes FLO 1, FLO 2, FLO 5, FLO 8 e tup 1, sendo parcialmente inibidas por manose e (2) Newflo, completamente inibidas por manose, maltose, glicose e sacarose.

A agitação é imprescindível para a floculação, pois esta depende do contato celular que ocorre durante os choques, vencendo a repulsão eletrostática entre as mesmas (STRATFORD, 1989a).

A participação de proteínas na floculação tem sido verificada através do tratamento com agentes desnaturantes e proteases, como papaína, tripsina, quimotripsina e pepsina, causando perda total ou parcial da floculação (NISHIHARA *et alii*, 1982). Outras enzimas como lipases e lisozima não apresentaram tal efeito. Outras verificações foram feitas por tratamentos com modificadores químicos (NISHIHARA *et alii*, 1977), assim como a avaliação de diferenças no perfil eletroforético de proteínas do extrato de células floculentas e não-floculentas (BEAVAN *et alii*, 1979).

2.1.2. Floculação por bactérias contaminantes

No trabalho de YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) foi investigada a floculação de células de leveduras por linhagens de *Lactobacillus fermentum* isoladas de destilaria de álcool do Estado de São Paulo. Os autores descreveram uma relação ótima para floculação entre o número de células desta bactéria e de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, através de contagens em microscópio. Para avaliar a intensidade da floculação, em diversos tratamentos, utilizaram uma adaptação do método descrito por STRATFORD & KEENAN (1988) para operar com suspensão mista de levedura e bactéria. Também observaram que o sobrenadante da cultura, após a retirada das células por centrifugação não apresentou nenhum efeito floculante. Isto significa que o fator floculante está intimamente ligado à célula bacteriana e não é constituído por metabólitos liberados no meio de cultivo durante o crescimento. Os íons cálcio são estimulantes da floculação, entretanto sua ausência não causou inibição completa da mesma. Temperaturas acima de 55°C, pHs extremos e tratamento das bactérias com protease inibiram a capacidade floculante, o que os levou a concluir que o fator responsável pela floculação varia com o pH, é termolábil e sensível à protease, indicando sua natureza protéica.

A inibição da floculação pela adição de manose, não foi observada com outros açúcares como glicose, frutose, galactose, maltose, sacarose e lactose. O tratamento da bactéria com Pronase E de *Streptomyces griseus* também inibiu o fenômeno. Propôs-se então um mecanismo no qual algumas linhagens de *Lactobacillus fermentum* possuiriam em sua parede componentes proteicos semelhantes às lectinas que se ligariam com os resíduos de manose das leveduras adjacentes (SANTOS & YOKOYA, 1993).

SANTOS (1991) observou que algumas linhagens de *Lactobacillus fermentum* apresentam variação na força floculadora, podendo estar relacionada com o número de sítios de ligação. Também

observou que a capacidade floculadora pode ser perdida durante o estoque e subcultivo da cultura, uma vez que 2% das colônias isoladas a partir de uma linhagem bacteriana fortemente floculenta perderam esta capacidade. Para investigar esta instabilidade, sugeriu-se estudos genéticos, avaliando a possibilidade de herança plasmidial.

2.2. Fenômenos de Adesão em *Lactobacillus*

Uma substância de natureza proteica responsável pela adesão da linhagem 737 de *Lactobacillus fermentum* ao epitélio gástrico de camundongos foi detectada por CONWAY & KJELLEBERG (1989). Foi especulado por YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) que a floculação possa ser causada por um fator semelhante a este de adesão.

Os lactobacilos são capazes de colonizar diversos epitélios gastro-intestinais, porém seu mecanismo não foi elucidado (SAVAGE, 1983).

Há semelhanças ainda com o determinante adesivo proteico descrito por HENRICKSON *et alii* (1991) que está fortemente ligado à parede celular de *L. fermentum* capaz de aderir à superfície epitelial gástrica de suínos. Em estudo posterior, HENRIKSSON & CONWAY (1992) indicaram que ambos sacarídeos e proteínas tem papel na adesão de *Lactobacillus fermentum* 104-S. A adesão à tecidos epiteliais deve envolver ambas porções proteicas e sacarídicas de seu determinante, por ser mais específica. Já a adesão à superfícies, incluindo o poliestireno, seria mediada somente por proteínas.

Contudo, BROMBERG (1994) relatou a participação da porção proteica no fenômeno de floculação de leveduras, causado por *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 isolado de dornas de fermentação alcoólica, após o tratamento com vários modificadores químicos. Ainda assim, a autora não descarta a possibilidade do fator de floculação ser constituído por uma glicoproteína, já que elevadas concentrações de periodato de sódio (0,02 M) causaram inibição da floculação.

Estudando a linhagem *Lactobacillus fermentum* 104-S citada anteriormente, BLOMBERG *et alii* (1993) observaram a liberação de componentes proteínicos no meio, os quais seriam encontrados no sobrenadante, afetando o muco do epitélio gástrico suíno de tal maneira que a adesão através de fimbrias de *Escherichia coli* K88 é amplamente reduzida. A purificação destes componentes, pelos mesmos autores, se encontra em andamento, de maneira a ser efetiva na proteção contra infecções por esta linhagem de *E. coli*.

MUKAI *et alii* (1992) relataram atividade semelhante a lectina em *Lactobacillus acidophilus* através de ensaios de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação, onde observaram tratar-se de um componente proteínico firmemente associado à parede bacteriana. Não foi possível extrair-lo nem detectá-lo em eletroforese com gel de poliacrilamida-SDS.

HARTY *et alii* (1993) relataram pela primeira vez a capacidade de lactobacilos em agregar plaquetas humanas. Isolado da cavidade oral humana, *Lactobacillus fermentum* NCIB6991 é capaz de agregar tais plaquetas. Esta agregação contribui para o progresso de uma doença chamada endocarditis infecciosa, a qual é resultado da colonização do coágulo de plaqueta-fibrina da superfície endotelial do coração por bactérias (HERZBERG *et alii*, 1983). Estudos preliminares confirmaram a verdadeira agregação de plaquetas através da ação de inibidores que também removem íons (EDTA e dipiridamol), entre outros. O componente responsável pela agregação parece envolver uma proteína termo-sensível da superfície do lactobacilo, contudo em eletroforese com gel de poliacrilamida-SDS não foi possível indicar diferenças entre linhagens agregantes e não agregantes (HARTY *et alii*, 1993).

2.3. Genética de *Lactobacillus*

A primeira evidência da presença de plasmídios em *Lactobacillus* foi de CHASSY *et alii* (1976). Anteriormente a este trabalho, havia se constatado a dificuldade em se lisar tais bactérias, constatando que o método por eles descrito para *Streptococcus* era também eficiente em muitos lactobacilos. Observaram 3 a 5 cópias de plasmídios em lactobacilos, mas com funções desconhecidas.

KLAENHAMMER & SUTHERLAND (1980) realizaram os primeiros estudos sobre o DNA plasmidial de *Lactobacillus acidophilus*, onde observaram que as células cultivadas em meio contendo DL-treonina são altamente resistentes à lise por lisozima-SDS, e em função disto passaram a utilizar meio contendo tripticase de soja. Através de extração, purificação e análise em eletroforese obtiveram a migração de duas espécies de DNA plasmidial, desconhecendo suas funções.

KLAENHAMMER (1984) citou que o difícil progresso na genética de lactobacilos tem sido devido à dificuldade em realizar a lise celular com lisozima e ao desenvolvimento de procedimentos confiáveis para o isolamento de DNA plasmidial. Ainda assim tem sido descritos DNA plasmidial de *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. helveticus*, sendo que sua detecção tem sido limitada a um número selecionado de linhagens de cada espécie. Isto demonstra a ineficiência dos métodos usuais para este gênero.

Estudando os fatores que afetam a resistência de *L. fermentum* à lisozima, NEUJAHN *et alii* (1973) constataram que a linhagem com a qual eles trabalharam tem um pico de sensibilidade à lisozima durante a fase exponencial de crescimento, sendo as células da fase estacionária resistentes a esta enzima. A incubação com tripsina gerou células sensíveis à lisozima em todas as fases de crescimento. As células do início da fase estacionária requereram temperaturas mais altas para uma ação ótima da lisozima que as fase exponencial. Observaram também que o congelamento das células após o crescimento as tornava mais sensíveis à lise, e a presença de sacarose (0,25 M) inibia consideravelmente a lise. Uma das hipóteses que os autores indicaram para estes efeitos seria o incrustamento de algum material acessório na parede celular no final da fase exponencial que mascararia os sítios de ataque da lisozima.

A adaptação do método de CHASSY *et alii* (1976) para a lise de estreptococos orais, realizada por CHASSY & GIUFRIDA (1980) para uso em lactobacilos, actinomicetos, propionibacterias e pediococos utilizou lisozima diluída em tampão Tris contendo polietilenoglicol. As observações principais foram: 1. bactérias crescidas em meios suplementados com L-treonina e/ou L-lisina são mais susceptíveis à lise por lisozima; 2. os meios contendo glicose produzem células mais fáceis de lisar; 3. o polietilenoglicol não serve apenas como estabilizador osmótico, mas também intensifica a extensão da lise e 4. o tampão Tris mostrou-se superior aos outros tampões comumente usados nas técnicas de lise com muramidases.

Quanto às propriedades funcionais de plasmídios em lactobacilos, sabe-se que como em estreptococos (McKAY, 1983), algumas propriedades são por estes mediadas, tal como: utilização de lactose, resistência à bacteriófagos, produção de bacteriocina, atividade de proteinase, etc. Porém para algumas características, a associação com plasmídios é altamente especulativa, baseando-se apenas na perda fenotípica de uma propriedade metabólica.

Um procedimento para o rápido isolamento de DNA plasmidial, maior que 30 megadaltons para estreptococos lácticos, foi descrito por ANDERSON & McKAY(1983). Com isto observaram grandes plasmídios não detectados anteriormente. Recentemente, vários estudos incluindo lise e extração de DNA plasmidial tem seguido este mesmo procedimento alcalino. Entre eles constam os trabalhos a seguir.

Lactobacilos encontrados em produtos cárneos são utilizados comumente como culturas "starters" comerciais. O estudo genético destas culturas comprovou a presença de plasmídios em

Lactobacillus curvatus, *L. plantarum* e *L. bavaricus*, assim como estabeleceu suas condições de eletrotransformação (AYMERICH *et alli*, 1993).

Visando a preservação de alimentos cárneos, VOGEL *et alli* (1993) pesquisaram a produção de bacteriocina por *Lactobacillus curvatus* LTH 1174, já que esta poderia suprimir o crescimento de microrganismos contaminantes e/ou patogênicos. Após a cura plasmidial de uma linhagem de *L. curvatus*, esta não foi mais capaz de produzir bacteriocina assim como perdeu a capacidade de competir com outras linhagens.

FORTINA *et alii* (1990) procuraram estabelecer a relação entre fenótipos relevantes industrialmente, na área de produtos lácteos, e seus determinantes genéticos. Os autores evidenciaram a presença de DNA plasmidial em *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 e ausência deste em outra duas linhagens da mesma espécie. Este estudo também utilizou o procedimento de ANDERSON & McKAY (1983) com ligeiras modificações como o acréscimo da concentração de lisozima para 10 mg/ml e adição de 25 U/ml de mutanolisina. Apesar da ausência de DNA plasmidial nas duas linhagens, estas apresentaram basicamente o mesmo padrão de fermentação de carboidratos que a linhagem ATCC 15009, conseqüentemente não deixou clara a correlação entre presença de plasmídios e algumas características biotecnológicas, como metabolismo da lactose, atividade proteolítica e resistência à drogas, estando deste modo em discordância com os relatos de CHASSY (1987) para outras espécies de *Lactobacillus*.

Em outro trabalho posterior, FORTINA *et alii* (1993) caracterizaram os plasmídios presentes na linhagem *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. Os três plasmídios detectados de 22,0; 6,0 e 3,5 kb, ainda permanecem crípticos, ou seja, com função desconhecida.

ISHIWA & IWATA (1980) encontraram plasmídios contendo genes de resistência à tetraciclina e eritromicina em *Lactobacillus fermentum* isolados de fezes de seres humanos "sadios". Também RINKEL & SAVAGE (1990) trabalharam com plasmídios de *Lactobacillus* sp contendo resistência à antibióticos.

IWATA *et alii* (1986) realizaram uma fusão de protoplastos induzida por polietilenoglicol, de duas linhagens de *L. fermentum* contendo plasmídios de resistência a diferentes drogas, regenerando-os em um recombinante com ambas resistências. A obtenção de protoplastos ocorreu a partir do uso de lisozima e mutanolisina.

Recentemente, probes ou sondas moleculares tem sido comumente usadas para a detecção e identificação de *Lactobacillus*, obtendo-se um resultado satisfatório com pouco gasto de tempo.

TANNOCK *et alii* (1992) utilizaram um plasmídeo de aproximadamente 50 kb como probe de DNA para a detecção de uma linhagem de *Lactobacillus fermentum* em conteúdo estomacal de suínos.

Para a identificação de *Lactobacillus* em produtos cárneos, HERTEL *et alii* (1991) identificaram sequências de rRNA 23 S específicos para *Lactobacillus curvatus*, *L. sake* e *L. pentosus*/*L. plantarum* e desenvolveram oligonucleotídeos complementares usados como sondas. Para produtos lácteos, HERTEL *et alii* (1993) desenvolveram sondas específicas para a identificação e correlação genética de *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus* e *L. paracasei*, assim como sondas para grupos específicos: *L. casei*/*L. rhamnosus*, *L. casei*/*L. paracasei*/*L. rhamnosus*. Em paralelo examinaram as linhagens em relação aos seus perfis eletroforéticos de proteínas totais, os quais ajudaram a estabelecer a correlação existente entre as diferentes espécies e arranjá-las em grupamentos (clusters).

2.4. Caracterização Fisiológica de *Lactobacillus*

A diferenciação, identificação e classificação de microorganismos, inclusive *Lactobacillus*, é realizada através da observação de características morfológicas das células e das colônias, crescimento à diferentes temperaturas, utilização de carboidratos, produção de gás, além de testes como catalase, benzidina, entre outros.

Recentemente foi desenvolvido um kit para os testes de assimilação de açúcares chamado API 50CH (API Bio Merieux, France), no qual são testados 49 substratos em um curto período de tempo. FERNANDEZ & SIMPSON (1993) utilizaram este kit e outros testes para a caracterização de bactérias lácticas contaminantes de cerveja, incluindo *Lactobacillus fermentum*. Em laboratórios de cervejarias alemãs também estão sendo aplicados este kit e demais testes no controle microbiológico, possibilitando a identificação e diferenciação rápida de bactérias patogênicas das bactérias comuns da flora natural da cerveja (SCHMIDT, 1993).

Porém em vários casos, a diferenciação entre espécies do mesmo gênero se torna insatisfatória. Com isso, pesquisadores recorrem a técnicas mais refinadas como as de biologia molecular.

2.5. Caracterização Molecular de *Lactobacillus*

COLLINS *et alii* (1991) realizaram uma análise filogenética do gênero *Lactobacillus*, pois as sub-divisões em *Betabacterium*, *Streptobacterium* e *Thermobacterium*, baseadas no fenótipo, são consideradas questionáveis. Através do uso de transcriptase reversa, os autores realizaram o sequenciamento direto do rRNA 16S de 55 espécies de *Lactobacillus*, dividindo-as em três grupamentos (clusters).

O perfil eletroforético de proteínas celulares, entre outras características, é muito usado na diferenciação, caracterização e sistemática de microrganismos. Comparações entre o padrão de bandas, obtido em condições semelhantes, são importantes nas investigações de linhagens. A análise numérica destes padrões por computador é de grande valia na avaliação destes resultados.

Contudo, VAUTERIN *et alii* (1993) ressaltam a dificuldade de reprodutibilidade dos padrões de proteínas por diferentes laboratórios, sendo este um fator tão crítico e limitante quanto o da pureza e fonte dos reagentes utilizados. Estes autores apresentam o perfil eletroforético de proteínas como um método rápido para a seleção de microrganismos entre um grande número de linhagens a serem examinadas, podendo posteriormente seguir para análises de DNA.

HERTEL *et alii* (1993) utilizaram a análise computadorizada do perfil eletroforético de proteínas, assim como sondas moleculares para diferenciar *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, pois a classificação destas espécies foi considerada insatisfatória baseando-se apenas em características fenotípicas. Os autores demonstraram que ambas as técnicas são rápidas e praticáveis para a identificação de espécies encontradas em produtos lácteos.

A dificuldade de diferenciar espécies de maneira definitiva, com base em simples testes fisiológicos, foi também relatada por KANDLER & WEISS (1986), em estudos com *Lactobacillus fermentum* e *L. reuteri*. Já determinações de % G+C do DNA, o ácido diamino da mureína e a mobilidade eletroforética da LDH podem separar claramente estas duas espécies.

FERNANDEZ & SIMPSON (1993) utilizaram o perfil de proteínas com objetivo diferente dos citados acima. Eles procuraram estabelecer uma relação entre a capacidade dos lactobacilos de resistir à ação de ácidos do lúpulo e o perfil de proteínas celulares de lactobacilos resistentes e sensíveis a estes ácidos. Os autores não observaram nenhuma banda que ocorresse exclusivamente em bactérias lúpulo-resistentes ou lúpulo-sensíveis.

Assim como as proteínas, os lipídeos e outras moléculas orgânicas são expressões de informações codificadas nos ácido nucleicos e podem ser usados como marcadores taxonômicos devido à sua distribuição estável e descontínua (SUZUKI *et alii*, 1993).

Os lipídeos de membrana e mesossomais de lactobacilos típicos contém carbonos pares, de cadeia linear saturada e ácidos monoenoicos, juntamente com ácidos ciclopropanos (THORNE & KODICEK, 1962; VEERKAMP, 1971). Suas quantidades relativas variam conforme a fase e taxa de crescimento, condições de cultivo, composição do meio de cultura e temperatura (VEERKAMP, 1971; UCHIDA & MOGI, 1973*b*; SMITTLE *et alii.*, 1974; UCHIDA, 1975; GILL & SUISTED, 1978). Como consequência, as propriedades físicas dos lipídeos funcionais variam, e influenciam funções celulares fundamentais, incluindo o transporte e atividade de enzimas ligadas à membrana e envolvidas no metabolismo energético (CRONAN & GELMANN, 1975).

Taxonomicamente, SUZUKI *et alii* (1993) consideram que os ácidos graxos entre C 14 e C 24 revelam grandes informações e estão presentes na grande variedade de microrganismos. Os compostos de baixo peso molecular são geralmente associados ao metabolismo, por exemplo como produtos finais de fermentação, que apesar de serem fonte de informação, são distintos dos ácidos graxos celulares ou estruturais, sendo assim desconsiderados.

OLSEN *et alii* (1991) utilizaram o perfil de ácidos graxos e de proteínas, entre outras características, para identificar e diferenciar *Lactobacillus uli* e *L. rimae* como novas espécies. Anteriormente eram erroneamente classificadas como *L. murinus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

As culturas de *Lactobacillus fermentum* utilizadas foram fornecidas em ampolas liofilizadas pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello". A linhagem FTPT 1405 possui a intensa capacidade de flocular leveduras, enquanto que a linhagem FTPT 1407 não possui esta capacidade. Ambas linhagens foram isoladas de dornas de fermentação com problemas de contaminação bacteriana (OLIVA-NETO, 1990). As células foram cultivadas em caldo MRS (Lactobacilli Man, Rogosa e Sharpe) à 30°C. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 utilizada, uma linhagem não floculenta, foi cultivada em caldo YEPD à 30°C. Como controle dos experimentos, foi utilizada uma linhagem de *Lactobacillus plantarum*, cultivada em MRS à 30°C e uma linhagem de *Escherichia coli* cultivada em BHI à 37°C.

3.2. Isolamento e Teste de floculação de leveduras

Isolamento. Foram feitos plaqueamentos de linhagens de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 e 1407 em MRS ágar com o objetivo de se obter colônias isoladas. As placas foram incubadas a 30°C, onde, em 24 hs, se obteve colônias bem visíveis de FTPT 1405 e em 48 hs, de FTPT 1407. As colônias foram inoculadas em tubos de ensaio (10 x 70 mm) contendo 2 ml de caldo MRS e incubadas por 24 hs à 30°C. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 foi cultivada em frascos erlenmeyers com 100 ml de caldo YEPD à 30°C por 24 hs sob agitação de 100 rpm no agitador-incubador (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co.).

Teste de floculação. Os testes realizados são uma adaptação dos descritos por HELM *et alii* (1953). A tubos de ensaio graduados contendo 2 ml da cultura de levedura, foram adicionados 1 ml de cada bactéria a ser testada. Em seguida, os tubos foram agitados por inversão durante aproximadamente 5 seg, observou-se a formação ou não de flocos, e deixou-se em repouso para a observação do depósito a ser formado. As colônias foram então classificadas conforme o quadro a seguir:

+++	Fortemente flocculadoras (colônias de rápida formação de depósito compacto, no qual se observaram flocos bem grandes e difíceis de se desfazerem).
++	Flocculadoras (colônias formadoras de depósito menos compacto, com flocos grandes e estáveis).
+	Fracamente flocculadoras (colônias de lenta formação de depósito, pouco compacto, com pequenos flocos de difícil visualização que se desfazem facilmente).
-	Não flocculadoras

Após a agitação, a visualização dos tubos se apresentou conforme a figura 1, dependendo da capacidade flocculadora da colônia.



Figura 1: Visualização do teste de flocculação, onde (A) cultura não-flocculadora, (B) fracamente flocculadora, (C) flocculadora e (D) fortemente flocculadora.

3.3. Tratamentos para a lise de *Lactobacillus fermentum*

3.3.1. *Ultrassom*. Culturas bacterianas crescidas em 500 ml de caldo MRS por 18 h à 30°C foram centrifugadas a 8000 g por 10 min à 4°C, lavadas primeiramente em 20 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M e EDTA 10 mM, pH 7,2 e, em seguida, em 20 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M e MgCl₂ 10 mM, pH 7,2 .

O precipitado foi ressuscitado em 20 ml de tampão Glicina 0,1 M pH 9,2 com sacarose 0,75 M e lisozima 0,1 mg/ml (preparação a fresco). A suspensão foi mantida em banho de gelo por 30 min e então submetida ao ultrassom.

A suspensão de cada cultura foi sonicada em Ultrassom de êmbolo (Cole Palmer) a 20.000 ciclos por segundo, mantendo o recipiente em banho de gelo por várias amplitudes e tempos.

Foram feitos testes de sobrevivência, inoculando 0,1 ml da suspensão sonicada em tubo contendo caldo MRS por 24 h à 30°C.

3.3.2. *Ultrassom em presença de elevada concentração de lisozima*. As etapas de lavagem das célula bacterianas foram semelhantes às descritas acima, assim como as condições de crescimento. Na ressuspensão em 20 ml de tampão Glicina 0,1 M pH 9,2 com sacarose 0,75 M, adicionou-se uma elevada quantidade de lisozima (5 mg/ml). Estas suspensões foram mantidas em banho maria à 37°C por 60 min.

A sonicação foi realizada em 7 ciclos de 40 seg na amplitude 10 com 5 min de intervalo entre os ciclos, para evitar aquecimento excessivo.

A lise celular foi acompanhada por observações em microscópio óptico de contraste de fase e por microcopia óptica simples após a coloração de Gram.

3.3.3. *Lisozima*. Teste 1. As células foram ressuscitadas em T.E. (Tris 50 mM; EDTA 1mM, pH 8,0) contendo lisozima 5 mg/ml (Sigma) e incubadas por uma noite em banho-maria à 37°C. Em seguida, verificou-se a lise em lâmina, adicionando-se uma gota da suspensão em uma gota de SDS 10% tornando-se viscosa e grudenta. Foi realizado o teste de floculação, conforme descrito no item 3.2., para determinar o efeito da lisozima sobre esta característica. Como controle foram utilizadas células incubadas sem lisozima.

Teste 2. Foi utilizada lisozima a uma concentração de 10 mg/ml (Sigma) dissolvida em tampão Tris 25 mM. As células crescidas por uma noite, tomando-se 1,3 ml por tubo Eppendorf, foram lavadas e ressuspendidas em 400 µl de T.E.S. (sacarose 6,7%; Tris 50 mM; EDTA 1mM, pH 8,0). Adicionou-se 100 µl da solução de lisozima a cada tubo e incubou-se em banho-maria à 37°C por 10, 30 e 60 minutos.

3.4. Tratamentos para a remoção de proteínas superficiais de *Lactobacillus fermentum*

3.4.1. *Blender*. As culturas bacterianas crescidas por 18 hs foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min à 4°C e ressuspendidas em tampão T.E. (Tris 50 mM; EDTA 1mM). Em seguida foram submetidas à agitação em Blender (Sorvall) por 15 min em banho de gelo. Esta suspensão foi centrifugada a 4200 g por 20 min. Foram realizados testes de floculação, conforme item 3.2., com ambas as fases: sobrenadante e precipitado.

3.4.2. *Ultrassom de banho*. As células bacterianas lavadas em T.E. foram submetidas à agitação em ultrassom de banho (Cole Palmer) à 30°C por 10 min. As suspensões sonicadas foram centrifugadas a 4200 g por 10 min e também testadas a floculação das duas fases.

3.4.3. *Temperatura*. As suspensões bacterianas lavadas como descrito acima, foram submetidas à 60°C em banho-maria durante 30 min. Centrifugou-se e testou-se a floculação das duas fases.

3.5. Análise Genética

3.5.1. Determinação do perfil de DNA plasmidial

Extração de plasmídios - Método 1. Foram realizadas duas técnicas distintas de extração. A primeira foi adaptada da técnica descrita por ANDERSON & McKAY (1983), onde tomou-se alíquotas de 1,3 ml da cultura de *L. fermentum* FTPT 1405 crescida durante 12-24 hs à 30°C em caldo MRS. Centrifugou-se em tubo Eppendorf à 8.400 g durante 3 min à temperatura ambiente. As células foram ressuspendidas em 400 µl de T.E.S. (sacarose 6,7%; Tris 50 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0). Esta suspensão celular foi aquecida em banho-maria à 37°C e adicionou-se 100 µl de uma solução de lisozima 10 mg/ml previamente dissolvida em Tris 25 mM. Incubou-se em banho-maria à 37°C por 1 h.

Aos protoplastos assim obtidos adicionou-se 50 µl de T.E. (EDTA 0,25 M; Tris 50 mM, pH 8,0) e 30 µl de tampão de lise (SDS 20%; Tris 50 mM; EDTA 20 mM, pH 8,0), agitando imediatamente seguido de incubação por 5-10 min à 37°C, para completar a lise celular. Agitou-se os tubos Eppendorf no agitador de tubos por 30 seg para efetuar a lise mecânica do material genético. Adicionou-se 30 µl de uma solução de NaOH 3 N preparada a fresco e agitou-se por inversão lenta e intermitente por 10 min, ocorrendo a desnaturação do DNA.

Procedeu-se a adição de 30 µl de Tris-HCl 2 M, pH 7,0, que proporcionou uma queda no pH para 7,5-8,5, causando a renaturação do DNA. A seguir, adicionou-se 70 µl de NaCl 5 M e 700 µl de fenol saturado com NaCl 3% que provocou o aparecimento de um precipitado branco de SDS juntamente com resíduos de membrana celular e DNA cromossômico, na interface do fenol e a fase aquosa sobrenadante.

Removeu-se a fase superior (aquosa) e extraiu-se com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Novamente removeu-se a fase superior, a qual foi precipitada com 1 volume (700 µl) de isopropanol. Incubou-se à 0 °C por 1 h ou foram mantidos em geladeira por uma noite.

Centrifugou-se o material por 5 min à 8.400 g. Após descartar o sobrenadante, deixou-se os tubos invertidos secando bem. O centrifugado foi ressuscitado em 30 µl de T.E. final (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 7,5), para posterior análise em gel de eletroforese, corando com 10 µl de azul de bromofenol.

Extração de plasmídios - Método 2. Pela modificação da técnica de PORTNOY *et alii* (1981), as alíquotas de 1,3 ml de cultura FTPT 1405, crescida em caldo MRS por 12 hs à 30°C, foram centrifugadas por 5 min a 2.500 g à temperatura ambiente, e as células ressuscitadas em 800 µl de T.E. (Tris 50 mM; EDTA-Na₂ 10 mM). Esta suspensão foi novamente centrifugada a 2.100 g por 5 min e as células ressuscitadas em 150 µl de T.E. acrescido de sacarose 25% (T.E.S.). Foram adicionados 150 µl de uma solução de lisozima preparada em T.E.S. (10 mg/ml), seguindo-se de incubação em banho-maria à 37°C durante 1 h.

Os protoplastos assim obtidos foram centrifugados a 1.400 g por 10 min e recuperados em 10 µl de T.E.S. e 600 µl de tampão de lise (SDS 4% em T.E., pH 12,8), provocando a desnaturação do DNA. Para uma completa ação do tampão de lise, os tubos foram incubados em banho-maria à 37°C por 20 min. A adição de 30 µl de Tris-HCl 2 M, pH 7,0, proporcionou uma queda no pH para 7,5-8,5, ocasionando a renaturação do DNA. A seguir, a adição de 160 µl de NaCl 5 M provocou o aparecimento de um precipitado contendo SDS, membranas celulares e DNA cromossômico. Os tubos foram mantidos à 4°C por pelo menos 1 h, sendo então centrifugados a

14.000 g à 4°C por 30 min. Retirou-se 500 µl do sobrenadante contendo o DNA plasmidial e transferiu-se para um novo tubo Eppendorf. Adicionou-se 200 µl de acetato de sódio 3 M e 700 µl de etanol absoluto, deixando agir por 30 min a temperatura ambiente para a precipitação do DNA plasmidial. Após a centrifugação a 14.000 g por 20 min à 4°C, descartou-se o sobrenadante e secou-se bem os tubos. O centrifugado foi ressuspensionado em 60 µl de T.E. e para a análise em gel de agarose foram usados 30 µl da suspensão acrescidos de 10 µl de azul de bromofenol.

As duas técnicas também foram realizadas em volumes preparativos, onde os valores de cada volume é 33 vezes maior. Para a análise das extrações realizadas, utilizou-se a eletroforese em gel de agarose.

Eletroforese em gel de agarose. Conforme a técnica descrita por MEYERS *et alii* (1976), utilizou-se agarose 0,7% e corrida horizontal em tampão acetato (Tris 400 mM; ácido acético 200 mM; de EDTA-Na₂ 20 mM, pH 8,0, diluído 1:10) ou borato (Tris 54 g; ácido bórico 27,5 g; EDTA 0,05 M, pH 8,0, diluído 1:10). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 g/ml) e examinado em luz ultravioleta (300 nm).

3.6. Análise Fisiológica

3.6.1. *Assimilação de açúcares.* As culturas testadas foram incubadas em tubos inclinados contendo MRS ágar por 24 hs. Foram preparados tubos com caldo MRS modificado (sem extrato de carne e glicose) acrescido de vermelho de clorofenol 0,05% (w/v) (KANDLER & WEISS, 1986). Soluções esterilizadas por filtração dos açúcares a serem testados (galactose, arabinose, trealose, xilose, frutose, rafinose, maltose, manose, celobiose, ribose) foram acrescentadas ao MRS modificado numa concentração final de 1%. Alçadas das culturas crescidas em ágar foram inoculadas nos tubos com caldo e incubadas por 7 dias à 30°C.

3.6.2. *Catalase.* Após crescimento por 24 h a 30°C em caldo MRS, colocou-se uma gota das culturas em lâminas, as quais se adicionou uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3%, observando o aparecimento de bolhas correspondentes ao resultado positivo.

3.6.3. *Benzidina.* A partir de culturas crescidas por 24 hs a 30°C em MRS agar, retirou-se alçadas as quais foram colocadas sobre papel de filtro. Sobre as mesmas foi adicionada uma gota da solução A (hidroclorato de benzidina 1 g, 20 ml de ácido acético glacial, 30 ml de água destilada, 50 ml de álcool etílico 95%) e 1 gota da solução B (água oxigenada 5%). O resultado positivo é observado quando a alçada no papel torna-se azul.

3.6.4. *Morfologia.* A observação morfológica das células foi realizada microscopicamente através da coloração de Gram.

3.6.5. *Crescimento à 15° e 45°C.* Foram inoculados 0,1 ml das culturas crescidas por 24 hs em caldo MRS à 30°C, em tubos contendo 6 ml de litmus milk. Todas as amostras foram incubadas tanto à 15°C quanto à 45°C por 7 dias. A coloração rosa do meio foi considerada como crescimento positivo.

3.6.6. *Produção de gás.* Foram inoculados 0,1 ml das culturas crescidas por 24 hs em caldo MRS à 30°C, em tubos contendo 6 ml de caldo MRS fechados com tampão de algodão. Estes tubos foram introduzidos em tubos maiores contendo uma solução saturada de hidróxido de bário e imediatamente fechados hermeticamente com rolhas. Observou-se a formação de precipitado no tubo exterior quando a cultura liberava CO₂.

3.7. Análises Moleculares

3.7.1. Determinação do perfil cromatográfico de ácidos graxos de membrana plasmática

Preparo das culturas. As bactérias (biomassa) crescidas por 24 hs foram lavadas com água destilada e centrifugadas por duas vezes a 4200 g por 10 min. (Model B-20A Centrifuge, International Equipment Company, USA) e em seguida liofilizadas (Liofilizador com centrifugação, Edwards do Brasil). Para a extração dos ácidos graxos foram utilizados 50 mg de biomassa liofilizada de cada cultura.

Hidrólise básica. O procedimento usado na extração e análise dos ácidos graxos foi semelhante ao descrito por SADDLER *et alii* (1987). A cada tubo contendo 50 mg de biomassa foram adicionados 2 ml de hidróxido de tetrabutilamônio 5% (C₁₆ H₃₇ N O) sendo homogeneizados no agitador de tubos. A suspensão foi aquecida à 75°C durante 3 h em banho seco termostaticado (modelo 4-7080 M, Torika, Japão). Os tubos foram resfriados lentamente até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida foram centrifugados a 1000 g por 10 min, para a separação dos resíduos celulares. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos, aos quais se adicionou 1 ml de diclorometano (CH₂Cl₂) e 25 µl de iodometano (CH₃I) a 0,25%. A extração ocorreu invertendo-se os tubos lentamente durante 60 min., seguida de centrifugação a 1000 g por 10 min para a separação das fases. Retirou-se a fase inferior (fase orgânica) contendo os ácidos graxos e repetiu-se a extração com a adição de mais 1 ml de diclorometano, de modo semelhante à etapa anterior. A evaporação do

solvente das amostras obtidas foi realizada no banho seco à 37°C sob fluxo de nitrogênio, até obter um resíduo seco contendo somente os ácidos graxos.

Cromatografia de camada delgada (CCD). Na cromatografia qualitativa, utilizada para verificar a extração dos ácidos graxos, foram adicionados 50 µl de éter dietílico aos resíduos de ácidos graxos, homogeneizando delicadamente. Então alíquotas foram aplicadas sobre uma placa de sílica sobre suporte de alumínio (60 F254, 0,2 mm, ref. 5554 Merck). O solvente de desenvolvimento usado foi éter de petróleo (p.e. 65-110°C) e acetona na proporção 19:1. A revelação foi realizada mediante a aspersão de ácido molibídico fosfórico 5% em etanol 95%. A placa foi colocada em estufa à 120°C durante 5 minutos, ocorrendo assim a carbonização que possibilita a visualização das manchas dos ácidos graxos.

A CCD preparativa foi realizada em placas de sílica sobre suporte plástico (60 F254, 0,2 mm, ref. 5735 Merck). Ao extrato de ácidos graxos foi adicionado três porções de 250 µl de éter dietílico, aplicadas nas placas e feita a corrida no mesmo solvente acima. A revelação foi realizada com a aspersão de rhodamine 0,01% em etanol 95%. Deixam-se as placas em local escuro por várias horas, e com o auxílio de luz U.V. foram visualizadas as manchas. Estas foram contornadas com lápis, recortadas com cuidado e inseridas em tubos contendo 2 ml de éter dietílico. Os tubos foram agitados por inversão durante 60 min. Os ácidos graxos extraídos em éter dietílico foram eluídos em colunas contendo óxido de alumínio empacotadas em pipetas Pasteur sob leito de lã de vidro. As amostras foram coletadas em ampolas e o solvente evaporado no banho seco à 37°C sob fluxo de nitrogênio. As ampolas, com extrato purificado de ácidos graxos, foram mantidas à 4°C até a etapa de análise do perfil por cromatografia gasosa.

Cromatografia gasosa (CG). Os principais ácidos graxos foram identificados a partir da comparação do tempo de retenção de cada ácido, em relação aos dos ácidos graxos padrão (Bacterial Acid Mix, Supelco). Sabe-se que o tempo de retenção é diretamente proporcional ao comprimento da cadeia de carbonos do ácido graxo. Para a CG foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 14-A, equipado com detector de ionização de chama, injetor com câmara de vaporização para sistema capilar e coluna capilar apolar CBP1 (25 m x 0,25 mm); hélio com 99 % de pureza foi usado como gás de arraste com fluxo de aproximadamente 50 ml/min. O gás combustível hidrogênio/ar sob o fluxo de 40 ml/min foi usado para o detector de ionização de chama. A combinação hélio/hidrogênio, com fluxo de 30 ml/min, foi usada como gás de "make-up" para melhorar a saída do sinal do detector. A razão de amostragem (amostra analisada: amostra injetada) foi de 1:50; pressão na coluna de 1 kg/cm², temperatura de injeção 250°C; temperatura do detector 250°C; temperatura do forno programada para 160°C , aumentando 4°C / 1 min até atingir 180°C, e 1°C / 1 min. até 230°C no experimento 1, sendo programada no experimento 2 para 160°C (0 min), aumentando 4°C/ 1min

até atingir 180°C; 1°C/ 1min até 190°C e 0,5°C/ 1 min até atingir 220°C. As áreas dos picos foram medidas utilizando um integrador Shimadzu, modelo C-R4A Chromatopac. A composição de ácidos graxos de cada linhagem de *Lactobacillus fermentum* foi obtida através da área dos picos (expressa em porcentagem).

3.7.2. Determinação do perfil eletroforético de proteínas totais

Preparo das culturas. As linhagens de *Lactobacillus fermentum* 1405 e 1405 NF1M (fortemente floculadoras); 1405 NF1 e 1405 NF2 (fracamente floculadoras); assim como a 1407 e a cultura tipo 2571 (não floculadoras) foram cultivadas a partir de 5% de inóculo crescido por uma noite, em caldo MRS durante 8 horas a 30 °C onde as células se encontrariam no final da fase exponencial e início da fase estacionária. As células foram centrifugadas a 9000 g retirando o meio, e lavadas com T.E. (Tris 50 mM; EDTA 0,25M; pH 8,0).

Extração de proteínas totais Verificada a lise (lisozima 5 mg/ml em Tris 50 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) centrifugou-se as suspensões de cada linhagem a 10.000 g por 15 min depositando as células, e coletando os sobrenadantes que por sua vez foram armazenados a -20°C para posterior análise.

Análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). Foi realizada de acordo com o método de LAEMMLI (1970), usando gel de corrida a 12,5% e gel de separação a 4%. As amostras de proteínas foram fervidas por 3 min após a adição de igual volume de solução de tratamento (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4%; Glicerol 20% e 2-mercaptoetanol 10%). O padrão de peso molecular (Dalton Mark VII-L, Sigma) utilizado contém: albumina bovina (66 kD), albumina de ovo (45 kD), gliceraldeído-3-P-desidrogenase (36 kD), anidrase carbônica bovina (29 kD), tripsinogênio de pâncreas bovino (24 kD), inibidor de tripsina de soja (20 kD) e alfa-lactalbumina de leite bovino (14,2 kD). Foram aplicadas amostras de 50 a 80 µl e 10 µl do padrão nas canaletas do gel de empacotamento, submetendo a corrente de cerca de 30 mA por uma noite ou 50 mA durante cerca de 4 h.

Coloração de proteínas com nitrato de prata. A coloração do gel seguiu o método de BLUM *et alii* (1987). Após o final da corrida, o gel foi colocado (com uso de luvas) por 1 h em fixador (metanol 50%; ácido acético 12% e formaldeído 0,019%), seguido de 3 lavagens sob agitação em etanol 50% e pré-tratado com tiosulfato de sódio 0,02% por 1 min. Lavou-se duas vezes com água destilada e manteve-se por 20 min sob agitação em solução de impregnação (nitrato de prata 0,2%; usando

espátula plástica). Lavou-se de novo com água e revelou-se sob agitação em carbonato de sódio 6%, acrescido de tiosulfato de sódio 0,4% e formaldeído 0,019%. Após a visualização das bandas, lavou-se duas vezes em água destilada e bloqueou-se a revelação com a adição de metanol 50% e ácido acético 12%. O gel foi fotografado e guardado entre duas folhas de papel celofane.

3.7.3. Determinação do perfil eletroforético de proteínas de parede

Método 1. As culturas foram preparadas e lisadas conforme descrito para proteínas totais, porém adicionou-se 6,7% de sacarose ao tampão T.E. para evitar o rompimento da membrana plasmática, possibilitando a retirada dos protoplastos por centrifugação. Os sobrenadantes foram armazenados, concentrados por liofilização e analisados conforme o descrito anteriormente.

Método 2. As culturas foram preparadas e lisadas conforme descrito acima. Em seguida utilizou-se uma modificação da técnica de LORTAL *et alii* (1991), onde centrifugou-se os lisados a 1500 g para descartar as células inteiras. O sobrenadante foi centrifugado a 30.000 g por 15 min, e o centrifugado foi lavado duas vezes em água destilada, uma vez em tampão sódio-fosfato 0,01M, pH 7,0, e novamente em água destilada. Procurou-se observar se as lavagens geraram decréscimo da absorbância do sobrenadante a 280 nm, para a comprovação de sua eficiência. As amostras de proteína foram analisadas em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, conforme descrito para proteínas totais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de floculação de leveduras por colônias isoladas de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 e 1407

A capacidade de flocular leveduras variou bastante entre as colônias isoladas a partir da linhagem FTPT 1407, enquanto em FTPT 1405 a variação foi bastante menor.

Da linhagem 1405 (fortemente floculadora) obteve-se uma colônia fracamente floculadora denominada 1405 NF1, e a partir desta última obteve-se, por sua vez, uma colônia fortemente floculadora denominada 1405 NF1M.

Da linhagem 1407 (não floculadora) foram isoladas colônias com diferentes capacidades de floculação. As colônias mais estudadas foram: 1407 F3, 1407 P2 e 1407 P5 (floculadoras) e 1407 P3 (fracamente floculadora).

O número de colônias testadas e sua correspondente capacidade de floculação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Capacidade de floculação de leveduras das colônias de *Lactobacillus fermentum* isoladas a partir das linhagens FTPT 1405 e 1407.

Capacidade floculadora					
	+++	++	+	-	Total
1405	595	2	1	0	598
1405 NF1	1	0	396	0	397
1407	0	49	272	254	579
1407 P3	0	27	117	52	196
1407 F3	0	140	50	8	198
1407 P2	0	140	49	7	196
1407 P5	0	195	5	0	200

Os isolados obtidos também foram analisados em subcultivo, sendo testados a cada dia durante um período de cinco dias e não apresentaram instabilidade.

A linhagem de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 apresentou grande instabilidade na capacidade de floculação, estando de acordo com SANTOS (1991). Esta autora observou que entre 398 colônias testadas, 8 delas perderam a capacidade floculadora, sugerindo a possibilidade do gene correspondente estar contido no DNA plasmidial bacteriano. Porém, no presente trabalho não foi possível detectar plasmídios através das técnicas utilizadas. Os dados do isolamento revelam que houve perda significativa da característica na linhagem 1405 (1:598). Contudo, a causa de tal variação não pode ser determinada pela extração de plasmídios. As possíveis causas de instabilidade seriam 1. presença de plasmídios, 2. variações fisiológicas e 3. variações nas condições de cultivo.

Conforme estudo já citado de FORTINA *et alii* (1990), existem casos em que numa mesma espécie de lactobacilos podemos encontrar linhagens onde se detecta DNA plasmidial e outras em que este não é detectado.

A linhagem de *L. fermentum* FTPT 1407 apresentou uma maior instabilidade na capacidade de floculação de leveduras *S.cerevisiae* que a linhagem FTPT 1405. A variação observada levou à suspeita de contaminação. No entanto, foi verificada a pureza da cultura e também a presença de goma (exopolissacarídeos), a qual supostamente poderia afetar a característica estudada.

A viscosidade de bactérias lácticas termofílicas e mesofílicas é relacionada à produção de exopolissacarídeos (CERNING, 1990). Se células estão crescendo lentamente, então a síntese de polímeros de parede também será lenta, por consequência deixará mais fosfato isoprenóide disponível para a síntese de exopolímero, postulou SUTHERLAND (1977).

Em comparação com a linhagem de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1407, outra espécie heterofermentativa, *Lactobacillus hilgardii* NDCO 264, isolada de grãos de kefir, produziu polissacarídeo a partir de sacarose, quando crescida em caldo MRS-sacarose (PIDOUX *et alii*, 1990), enquanto *Lactobacillus casei* CG 11, isolado de queijo e crescido em meio basal mínimo, produziu um heteropolissacarídeo constituído predominantemente de glicose (75%) e rhamnose (15%) (KOJIK *et alii*, 1992). Este último grupo de autores afirma que a produção de exopolissacarídeos é instável. Isto pode ser devido ao envolvimento de DNA plasmidial na expressão do fenótipo mucóide (Muc +). Através de cura plasmidial, constataram que a biossíntese de

exopolissacarídeo em *L. casei* CG 11 está ligada a genes contidos num plasmídeo de aproximadamente 30 kb.

Em vista destes resultados pouco conclusivos, procurou-se estudar melhor a instabilidade do ponto de vista fisiológico. Para isto, foram feitos os perfis de ácidos graxos das linhagens e colônias isoladas.

4.2. Lise de *Lactobacillus fermentum*

Nos tratamentos de lise de *L. fermentum* FTPT 1405 que incluíram o uso de ultrassom de êmbolo, levou-se em conta que o gerador de energia deste aparelho converte a voltagem da linha, equiavalente a 50/60 Hertz a uma alta frequência de 20 kHz ou 20.000 ciclos por segundo. Utilizando uma ponteira de cerca de 13 mm, ajustou-se a amplitude das vibrações entre 4 e 10 e foram realizados 4 tratamentos de 30 seg em cada amplitude testada, fazendo intervalos de 5 min entre os tratamentos para evitar a formação de espuma resultante da desnaturação proteica.

Estes tratamentos tiveram por objetivo a obtenção de dados preliminares sobre as melhores condições de lise e observação do crescimento bacteriano após a inoculação em caldo MRS. Nas condições descritas acima, observou-se crescimento em 24 h e não foram constatadas mudanças na capacidade da bactéria em floccular leveduras.

Portanto, sugeriu-se que haveria certa dificuldade de lise nas condições citadas anteriormente, assim como alterações mecânicas do fator de flocculação, sendo assim fez-se necessário o uso de máximas amplitudes de vibração e tratamentos em banho de gelo por no máximo 40 seg sempre seguidos de intervalos de 5 min também em banho de gelo.

Sendo assim, nos tratamentos com ultrassom de êmbolo associados à elevadas concentrações de lisozima (5 mg/ml), incubando-se por 60 min., o aparelho foi ajustado para a amplitude de vibração 10, com tratamentos de 40 seg por 7 vezes e intervalos de 5 min entre os mesmos.

A lise das culturas de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405, 1405 NF1 e 2571 mostrou resultados satisfatórios e pode ser acompanhada por observação em microscópio de contraste de fase que permitiu visualizar muitos protoplastos em todas as culturas. Como controle do teste de lise foi

testada juntamente uma cultura de *Escherichia coli*, devido à sua facilidade em ser lisada. Nesta cultura foram observados poucos protoplastos, provavelmente devido a uma lise total das células.

Com a coloração de Gram, também utilizada para acompanhar a lise, constatou-se a ausência de bastonetes (células íntegras) e presença de células redondas e não coradas, as quais possivelmente seriam protoplastos. Na cultura de *E. coli* também observou-se a ausência de bastonetes, porém haviam poucas células redonda e não coradas.

Nos tratamentos realizados apenas com lisozima, observou-se que as linhagens apresentaram a lise desejada quando incubadas por uma noite em lisozima 5 mg/ml. A lise foi acompanhada pelo teste de viscosidade na presença de SDS 10% e por microscopia optica de contraste de fase. Em todas as culturas foi verificado o surgimento de uma maior viscosidade na presença de SDS, indicando a ocorrência de lise, a qual foi confirmada pelas observações microscópicas. (Tabela 2)

Tabela 2 : Efeito do tratamento com 5 mg/ml de lisozima por uma noite na lise e capacidade flocladora nas culturas de *Lactobacillus fermentum*.

Lise Bacteriana	
Microscopia	
1405 (+++)*	escombros celulares
1405 NF1 (+)*	escombros e poucas células íntegras
1405 NF2 (+)*	escombros celulares
1405 NF1M (+++)*	escombros celulares
1407 (-)*	escombros celulares
2571 (-)*	escombros e poucas células íntegras

* Capacidade flocladora (vide Tabela 1)

Foram observadas mudanças na capacidade de floclação após a lise, onde todas as culturas, citadas na tabela 2, não foram mais capazes de floclular leveduras.

Para o estudo da ação da lisozima a uma concentração de 10 mg/ml na lise de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 também foram feitas observações ao microscópio optico de contraste de fase, com o objetivo de observar a formação de protoplastos (células sem parede celular). Porém, não se

obteve resultado satisfatório. A lise celular pôde ser verificada apenas após a análise em gel de eletroforese, onde o melhor resultado foi obtido nos extratos das células tratadas por 60 min com lisozima.

É reconhecida a dificuldade de lisar paredes de bactérias Gram positivas, e principalmente lactobacilos (CHASSY & GIUFRIDA, 1980). Com isso vários métodos de lise foram desenvolvidos procurando associar rapidez e eficiência.

Os métodos de extração de DNA plasmidial que incluem a lise com lisozima, podem usar quantidades muito variáveis desta enzima e até associar outra enzima no tratamento. KLAENHAMMER (1984) sugere o uso de 75 µg/ ml de lisozima ou 75 µg/ ml de mutanolisina em seu método de lise para lactobacilos. Em trabalho posterior, O'SULLIVAN & KLAENHAMMER (1993) sugerem o uso de 30 mg/ ml de lisozima num método rápido de isolamento de DNA plasmidial de *Lactococcus* e *Lactobacillus* spp.

VELÁZQUEZ *et alii* (1993) utilizaram 20 mg/ml para lisar *Lactobacillus casei* e *L. fermentum* isolados de fermentações de vinhos.

Na técnica de PITCHER *et alii* (1989) para a extração rápida de DNA genômico bacteriano, foram usados 50 mg/ml de lisozima.

Os métodos de lise utilizados neste trabalho geraram resultados satisfatórios em relação aos objetivos dos experimentos, sem tornar necessário o uso de quantidades de lisozima superiores a 10 mg/ ml.

4.3. Remoção de proteínas superficiais de *Lactobacillus fermentum*

O tratamento com Blender apresentou os resultados presentes na tabela 3.

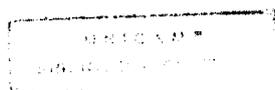


Tabela 3: Efeito do tratamento com Blender na capacidade floculadora de culturas de *Lactobacillus fermentum*

Cultura	Floculação do Sobrenadante	Floculação do Precipitado
1405 (+++)*	-	+++
1405 NF1 (+)*	-	+
1407 (-)/(+)*	-	-

* Capacidade floculadora (vide Tabela 1)

Este tratamento não foi capaz de retirar as proteínas supostamente responsáveis pelo fator de floculação, já que a capacidade de floculação das células bacterianas tratadas foi semelhante a das células intactas.

O tratamento em ultrassom de banho também não promoveu a remoção das proteínas citadas. Os resultados se encontram na tabela 4.

Tabela 4: Efeito do tratamento com ultrassom de banho na capacidade floculadora de culturas de *Lactobacillus fermentum*.

Cultura	Floculação do Sobrenadante	Floculação do Precipitado
1405 (+++)*	-	++
1405 NF1 (+)*	-	+
1405 NF2 (+)*	-	+
1407 (-)/(+)*	-	+
1407 F3 (++)*	-	++
2571 (-)	-	-

* Capacidade floculadora (vide Tabela 1)

O tratamento térmico das culturas de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405, 1405 NF1, 1405 NF2, FTPT 1407, 1407 F3 e FTPT 2571 em banho à 60°C provocou a destruição da capacidade de floculação tanto do sobrenadante quanto do precipitado, tendo portanto desnaturado a proteína supostamente responsável por esta capacidade. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por YOKOYA & OLIVA-NETO (1991)

4.4. Extração de plasmídios em *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405

Nas extrações, seguindo tanto o método de ANDERSON & McKAY (1983) como de PORTNOY *et alii* (1981) modificados, não foi possível detectar banda de DNA plasmidial. Somente uma banda foi detectada e esta correspondia ao DNA cromossômico. Por eletroforese bidimensional descartou-se a possibilidade de haver um plasmídio sobreposto à banda de DNA cromossômico (Figura 2). Estes resultados também foram observados nas extrações preparativas.

Os resultados negativos na extração de plasmídios de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 demonstram que nas condições utilizadas há grande dificuldade de se observar a presença ou não de plasmídios. Portanto os resultados não permitem concluir a ausência destes pois há possibilidades de falhas nos métodos de extração utilizados.

Até o presente momento não foi possível encontrar ou solucionar o problema existente nos métodos de extração quando usados em *Lactobacillus fermentum*. No entanto, quando usados em *Lactobacillus plantarum* não se observaram problemas (RUIZ-BARBA *et alii*, 1991), principalmente pelo método 1, descrito no item 3.5.1. (Ver Figura 2).

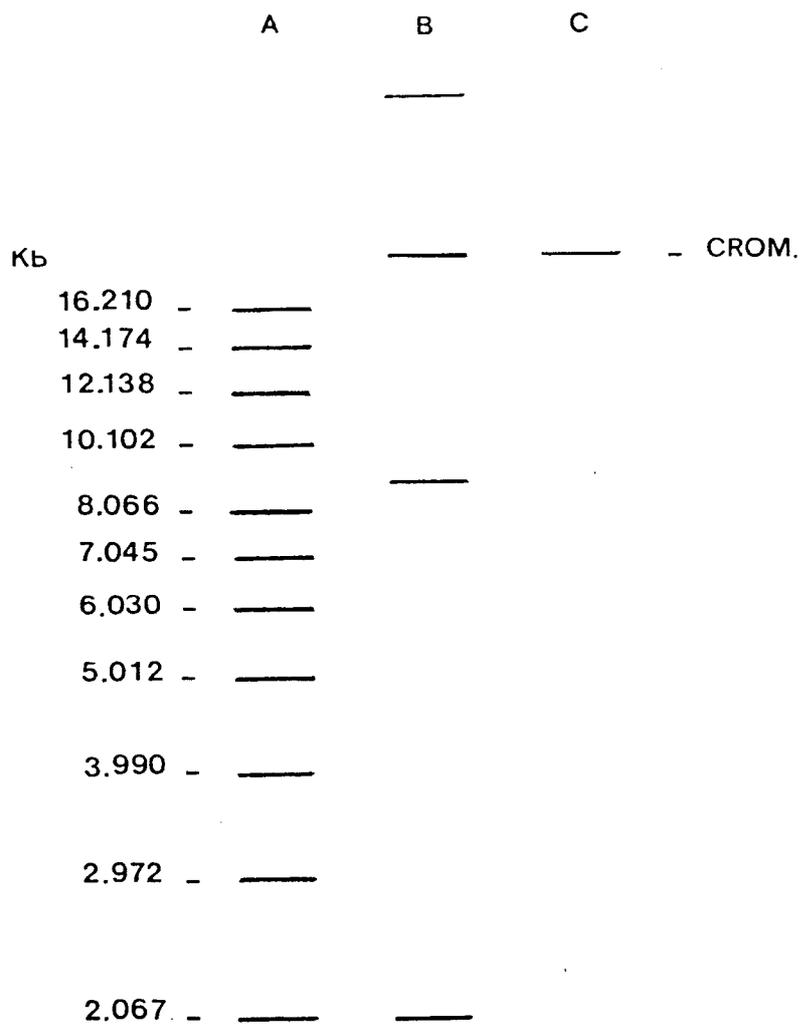


Figura 2: Esquema do perfil eletroforético do DNA plasmidial de *Lactobacillus*. (A) padrão de peso molecular, (B) plasmídios de *L.plantarum* e (C) banda correspondente ao DNA cromossômico de *L.fermentum*.

4.5. Caracterização Fisiológica

Os resultados dos testes de assimilação de açúcares estão contidos na tabela 5.

Tabela 5: Testes de assimilação de açúcares por linhagens e isolados de *Lactobacillus fermentum*.

	1405	1405 NF1	1405 NF2	1405 NF1M	1407	1407 P2	1407 P3	2571	1407 F3	Padrão *
Galact	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Arabin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
Treal	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
Frutos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafin	+	+	+	+	+	+	+	+w	+	+
Maltos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manos	+	+	+	+	+	+	+w	+w	+	+w
Celob	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Dados extraídos de KANDLER & WEISS (1986).

(+) crescimento na presença do açúcar; (+w) crescimento fraco; (-) ausência de crescimento; (d) crescimento em 11-89 % dos casos.

Os demais resultados dos testes da série bioquímica das culturas estão contidos na tabela 6.

Tabela 6 : Testes bioquímicos de linhagens e isolados de *Lactobacillus fermentum*

	Catalase	Benzidina	Prod. Gás	Cresc. 15° C	Cresc. 45° C	Gram
1405	-	-	+	-	+	+
1405 NF1	-	-	+	-	+	+
1405 NF2	-	-	+	-	+	+
1405 NF1M	-	-	+	-	+	+
1407	-	-	+	-	+	+
1407 P2	-	-	+	-	+	+
1407 P3	-	+	+	-	+	+
2571	-	-	+	-	+	+
1407 F3	-	-	+	-	+	+
Padrão	-	-	+	-	+	+

A produção de gás foi verificada em todas as culturas testadas, evidenciando serem bactérias heterofermentativas, as quais além do ácido láctico, também apresentaram o CO₂ como produto final (ver Tabela 6)

Os testes de catalase foram negativos para ambas linhagens e isolados, como era esperado. O mesmo ocorreu no teste de benzidina, com a exceção do isolado 1407 P3 que apresentou resultado positivo neste teste (ver Tabela 6).

Os testes de assimilação de açúcares indicaram que as culturas FTPT 1405, 1405 NF1, 1405 NF2, 1405 NF1M, FTPT 1407, 1407 P2, 1407 P3, FTPT 2571 e 1407 F3 pertencem à espécie *Lactobacillus fermentum*, pois seus resultados estão de acordo aos descritos por KANDLER & WEISS (1986) Apenas a cultura 1407 P2 não apresentou crescimento em presença de galactose (Tabela 5). Isto pode significar uma característica peculiar deste isolado. Para uma melhor avaliação deste resultado, devem ser feitos testes confirmatórios. Os testes de crescimento à 15°C e 45°C enfatizam a caracterização das culturas como sendo *Lactobacillus fermentum*.

Contudo, a análise bioquímica das amostras não revelou diferenças entre as culturas floculadoras e as não floculadoras.

4.6. Caracterização Molecular

4.6.1. Perfil cromatográfico dos ácidos graxos de membrana plasmática de *Lactobacillus fermentum*

O perfil cromatográfico por camada delgada evidenciou a presença de ácidos graxos obtidos nas extrações realizadas com todas as culturas, o que levou a constatar que o método de extração escolhido foi realmente efetivo para *Lactobacillus fermentum* (Figura 3).

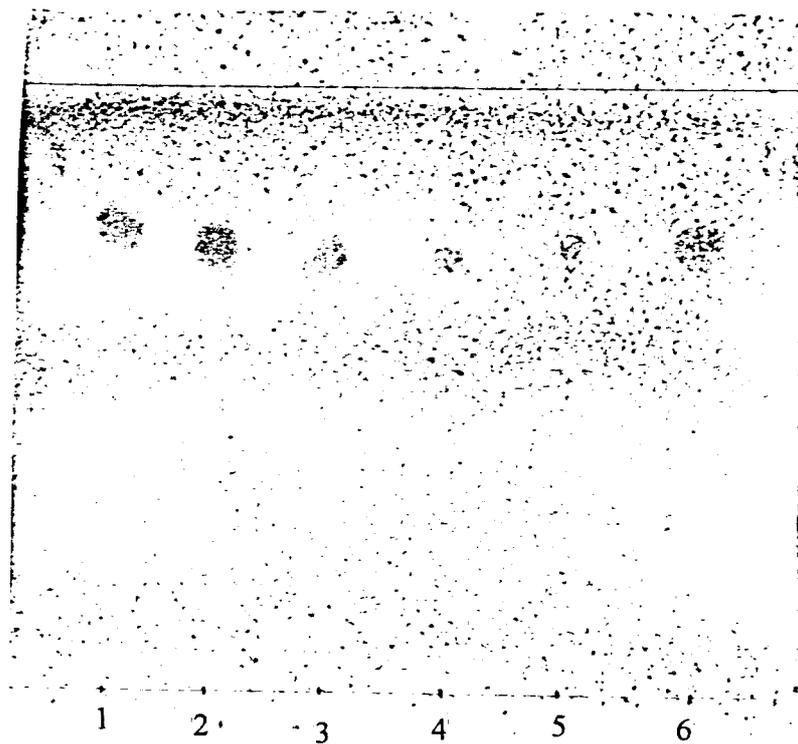


Figura 3: Cromatografia qualitativa de camada delgada dos ácidos graxos de membrana das culturas de *Lactobacillus fermentum* (1) FTPT 1405, (2) 1405 NF1, (3) 1405 NF1M, (4) FTPT 1407, (5) 1407 F3 e (6) 1407 P2.

Os principais ácidos graxos presentes nos cromatogramas das linhagens de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405, 1405 NF1, 1405 NF1M, 1407, 1407 P2 e 1407 F3 foram: o dodecanóico (n-C 12), tetradecanóico (n-C 14), *cis*-9-hexadecenóico (n-C 16:1 **9c**), hexadecanóico (n-C 16), 16-metilhexadecanóico (n-C 17a), *cis*-9,10-metileneoctadodecanóico (n-C 18:1 **9c**), *trans*-9-octadodecenóico e *cis*-11-octadodecenóico (n-C 18:1 **9t,11c**), *cis*-9,10-metileneoctadodecanóico (n-C 19cyc **9,10c**), *cis*-11,12-metileneoctadodecanóico (n-C 19cyc **11,12c**), sendo que os dois últimos ácidos contêm um anel de ciclopropano. Os nomes triviais dos ácidos são: laurico, mirístico, isopalmítico, palmítico, oleico, vacênico, dihidrostelúrico e lactobacílico, respectivamente. Outros ácidos encontrados em menor quantidade foram: o 13-metiltetradecanóico (n-C 15i), 12-metiltetradecanóico (n-C 15a), pentadecanóico (n-C 15), 14-metilpentadecanóico (n-C 16i), 15-metilhexadecanóico (n-C 17i), heptadecanóico (n-C 17), octadodecanóico ou esteárico (n-C 18). Os valores encontrados para cada ácido graxo estão contidos nas tabelas 7 e 8. Não foram detectados ácidos graxos poli-insaturados, nem com grupos hidroxil.

Os ácidos contendo anel de ciclopropano, chamados ácido dihidrostelúrico e ácido lactobacílico, não puderam ser diferenciados devido à falta do segundo na mistura de padrões Supelco. Serão então denominados respectivamente, n-C 19 cyc (9,10c) e n-C19 cyc A nos resultados.

Os ácidos graxos monoenoícos podem ser ciclizados à ácidos ciclopropanos pela enzima ciclopropano sintetase. O ácido lactobacílico é formado a partir do ácido vacênico e do oleico (CHALK & KODICEK, 1961; CRONAN *et alii*, 1979). Existe a ocorrência natural do ácido oleico como constituinte natural do crescimento aeróbico de *Lactobacillus fermentum*, tendo papel importante na adaptação à temperatura através de interconversões com os ácidos vacênico e dihidrostelúrico (SUUTARI & LAAKSO, 1992).

O ácido lactobacílico é de grande importância na identificação dos lactobacilos. Segundo RIZZO (1987), este ácido constitui 24% dos ácidos graxos totais de *Lactobacillus fermentum* detectados na extração por saponificação seguida de cromatografia gasosa. Acredita-se que este seja uma boa ferramenta na diferenciação das espécies de *Lactobacillus*.

Acredita-se que os ácidos ciclopropanos são responsáveis por tornar as membranas celulares mais estáveis durante a exposição às condições adversas. A conversão dos ácidos vacênico e oleico em ácidos lactobacílico e dihidrostelúrico ocorrem em resposta às mudanças de temperatura acima de 26°C. Isto indica o grande significado fisiológico dos ciclopropanos em *L. fermentum*. A reação

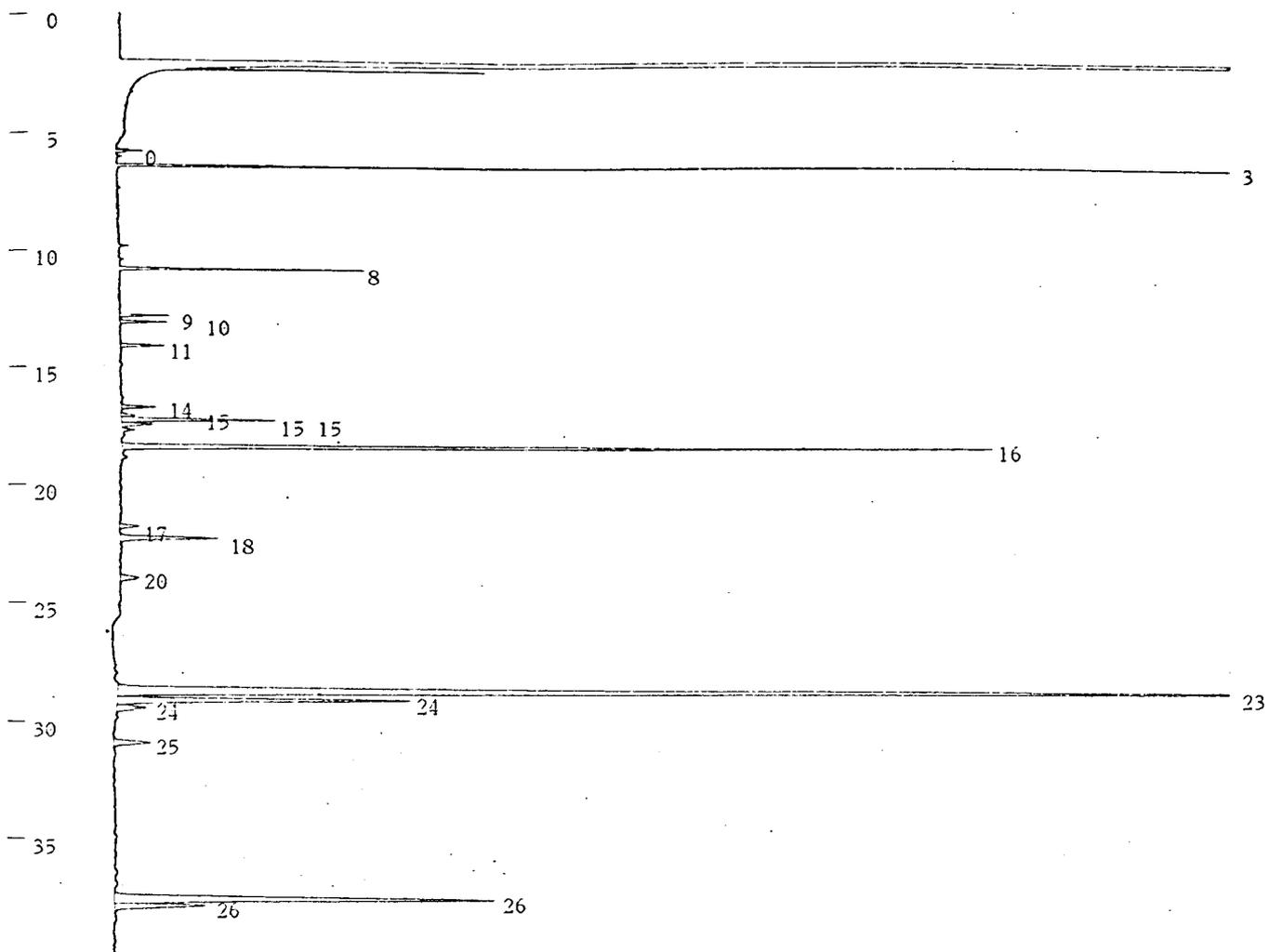
oposta ocorre quando a temperatura cai abaixo de 20°C, onde a formação de ácido lactobacílico é baixa, assim como a taxa de crescimento do microrganismo. O aparecimento dos ácidos ciclopropanos também está ligado a outras condições desfavoráveis tais como envelhecimento celular (entrada na fase estacionária), abaixamento de pH e presença de oxigênio (SUUTARI & LAAKSO, 1992).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que programação de temperatura do experimento 2 foi mais eficiente na detecção de ácidos graxos presentes em menores quantidades nas amostras (Figuras 4 e 5). Os principais ácidos graxos encontrados estão de acordo com os dados na literatura para *Lactobacillus fermentum* (RIZZO *et al.*, 1987; SUUTARI & LAAKSO, 1992).

Os perfis de ácidos graxos encontrados em todas as linhagens foi bastante semelhante, ou seja, não houve grandes diferenças qualitativas. Isto pode ser observado nas Tabelas 7 e 8 e correspondentes Figuras 6 e 7.

Foram encontradas algumas diferenças quantitativas nos ácidos graxos dos dois principais grupos de linhagens: 1405 (floculadora de leveduras) e 1407 (não floculadora de leveduras). As linhagens 1407 apresentaram uma maior quantidade de ácido ciclopropano e menor quantidade de ácido oleico (figuras 5 e 6). Isto pode ser devido a uma maior conversão do ácido oleico em ciclopropano, pois sabe-se ser este seu precursor. O motivo desta maior conversão pode ser existência de alguma condição desfavorável no cultivo destas linhagens, o que segundo os autores acima levaria a uma maior produção de ácidos ciclopropanos. Apesar das linhagens 1407 e 1405 terem sido cultivadas nas mesmas condições, observou-se que o crescimento das linhagens 1407 é mais lento que o das 1405, podendo levar o dobro do tempo para atingir a mesma biomassa. Por isso foram cultivadas em duplicata, para que em 24 hs se obtivesse suficiente biomassa.

Entre as linhagens 1407 (não floculadora), 1407 P2 (não floculadora) e 1407 F3 (floculadora) também foram observadas algumas diferenças entre as quantidades dos ácidos oleico e ciclopropanos, mas não parecem acompanhar alguma diferença na capacidade de flocular leveduras. Estas diferenças podem ser devido às condições usadas na cromatografia.



223-02000-11

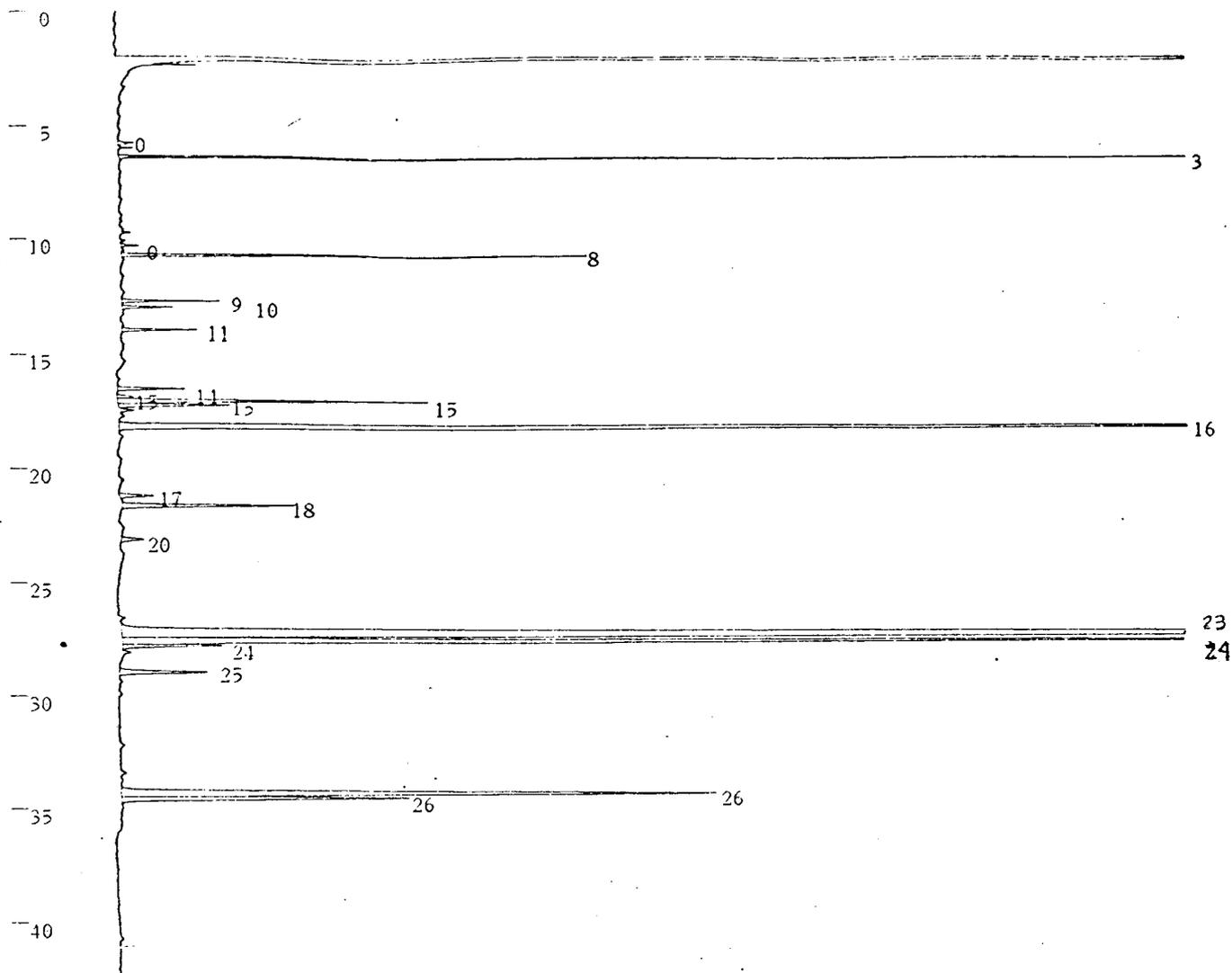
202114A

SHIMADZU

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	5.808	202	51	V			
	4	6.43	9876	3536		3	14.6509	n-12:0
	7	10.827	1738	439		8	2.5783	n-14:0
	8	12.844	425	90		9	0.6298	i-15:0
	9	13.122	406	86	V	10	0.6022	a-15:0
	10	14.128	403	81		11	0.5985	n-15:0
	11	16.725	368	63		14	0.5461	i-16:0
	12	17.078	156	25		15	0.2319	n-16:1 (9c)
	13	17.273	1745	276	V	15	2.589	n-16:1 (9c)
	14	17.469	339	54	V	15	0.5023	n-16:1 (9c)
	16	18.431	10099	1563		16	14.9828	n-16:0
	18	21.775	258	35		17	0.382	i-17:0
	19	22.271	1395	178		18	2.0699	a-17:0
	20	23.961	374	34		20	0.5543	n-17:0
	21	28.824	24160	2300		23	35.8423	n-18:1 (9c)
	22	29.142	4738	522	V	24	7.0291	n18:1 (9t/11c)
	23	29.449	479	55	V	24	0.7099	n18:1 (9t/11c)
	24	30.935	673	67		25	0.9978	n-18:0
	25	37.654	8140	679		26	12.076	cy-19 (9,10c)
	26	37.927	1636	163	V	26	2.4271	cy-19 (9,10c)
TOTAL			67607	10297			100	

Figura 4: Cromatografia gasosa de ácidos graxos de membrana de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 nas condições do experimento 2



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.757	155	29				
	3	6.37	7738	2823		3	5.8096	n-12:0
	6	10.312	152	32	V			
	7	10.717	3389	867		8	2.5441	n-14:0
	8	12.708	812	182		9	0.6093	i-15:0
	9	12.98	444	96		10	0.3334	a-15:0
	10	13.975	675	140		11	0.5064	n-15:0
	11	16.524	701	126		14	0.5263	i-16:0
	12	16.858	210	30		15	0.1577	n-16:1(9c)
	13	17.061	3414	577	V	15	2.563	n-16:1(9a)
	14	17.233	1215	207	V	15	0.9123	n-16:1(9c)
	16	18.212	25053	3605		16	18.8091	n-16:0
	17	21.221	423	64		17	0.3172	i-17:0
	18	21.65	2192	319		18	1.6459	a-17:0
	19	23.127	337	43		20	0.2529	n-17:0
	20	27.364	50599	4461		23	37.9892	18:1(9c)
	21	27.636	17884	2237	V	24	13.4271	18:1(St.11c)
	22	27.818	1244	185	V	24	0.9343	18:1(St.11c)
	24	28.991	1281	162		25	0.9617	n-18:0
	27	34.368	11388	1106		26	8.5499	cy-19(9.10c)
	28	34.577	4197	533	V	26	3.1507	cy-19(9.10c)
TOTAL			133501	17824			100	

223-02000-11

202114A

SHIMADZU

Figura 5: Cromatografia gasosa de ácidos graxos de membrana de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1407 nas condições do experimento 2

Tabela 7: Composição de ácidos graxos (%) de membrana celular de *Lactobacillus fermentum* utilizando cromatografia gasosa nas condições do experimento 1

ácido graxo	linhagem					
	1405	1405 NF1	1405 NF1M	1407	1407 P2	1407 F3
C 12	7,6	6,5	6,8	16,3	7,2	8,3
C 14	2,6	1,7	2,6	3,0	4,9	6,7
C 15i	-	-	0,6	-	0,9	1,4
C 15a	-	-	0,3	-	0,9	0,8
C 15	-	-	0,5	-	0,8	1,1
C 16 i	-	-	0,5	-	-	0,9
C 16:1	1,8	1,7	3,2	-	5,1	4,6
C 16	19,9	16,6	18,6	17,2	16,3	19,7
C 17i	-	-	0,3	-	-	-
C 17a	1,5	1,5	1,5	-	2,4	2,5
C 17	-	-	-	-	-	-
C 18:1(9c)	38,7	44,9	37,9	42,5	14,8	18,6
C 18:1(9t,11c)	14,2	14,5	15,1	6,9	2,5	1,9
C 18	-	0,8	0,9	-	0,8	-
C 19cyc(9,10c)	10,1	8,7	7,8	13,9	43,4	33,6
C 19cyc(11,12c)	3,9	3,1	3,2	-	-	-

Tabela 8: Composição de ácidos graxos (%) de membrana celular de *Lactobacillus fermentum* utilizando cromatografia gasosa nas condições do experimento 2.

linhagem						
ácido graxo	1405	1405 NF1	1405 NF1M	1407	1407 P2	1407 F3
C 12	5,8	9,1	8,5	14,6	11,8	10,8
C 14	2,5	1,8	2,2	2,6	4,0	3,8
C 15i	0,6	0,5	0,6	0,6	0,9	0,8
C 15a	0,3	0,4	0,3	0,6	0,7	0,7
C 15	0,5	0,4	0,5	0,6	0,7	0,7
C 16i	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7	0,7
C16:1	3,6	2,8	3,0	3,3	4,9	5,5
C 16	18,8	15,6	18,5	15,0	14,7	14,7
C 17i	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
C 17a	1,6	1,4	1,6	2,1	2,3	2,3
C 17	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,3
C 18:1 (9c)	38,0	41,8	36,5	35,8	26,1	22,4
C 18:1 (9t,11c)	14,4	13,4	12,9	7,7	3,3	3,3
C 18	1,0	1,0	1,1	1,0	0,8	0,8
C19cyc(9,10c)	8,5	8,1	9,7	12,1	26,9	30,5
C19cyc(11,12c)	3,2	2,8	3,4	2,4	1,5	2,1

Figura 6: COMPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS DE MEMBRANA CELULAR DE *Lactobacillus fermentum* POR CROMATOGRAFIA GASOSA - EXPERIMENTO 1

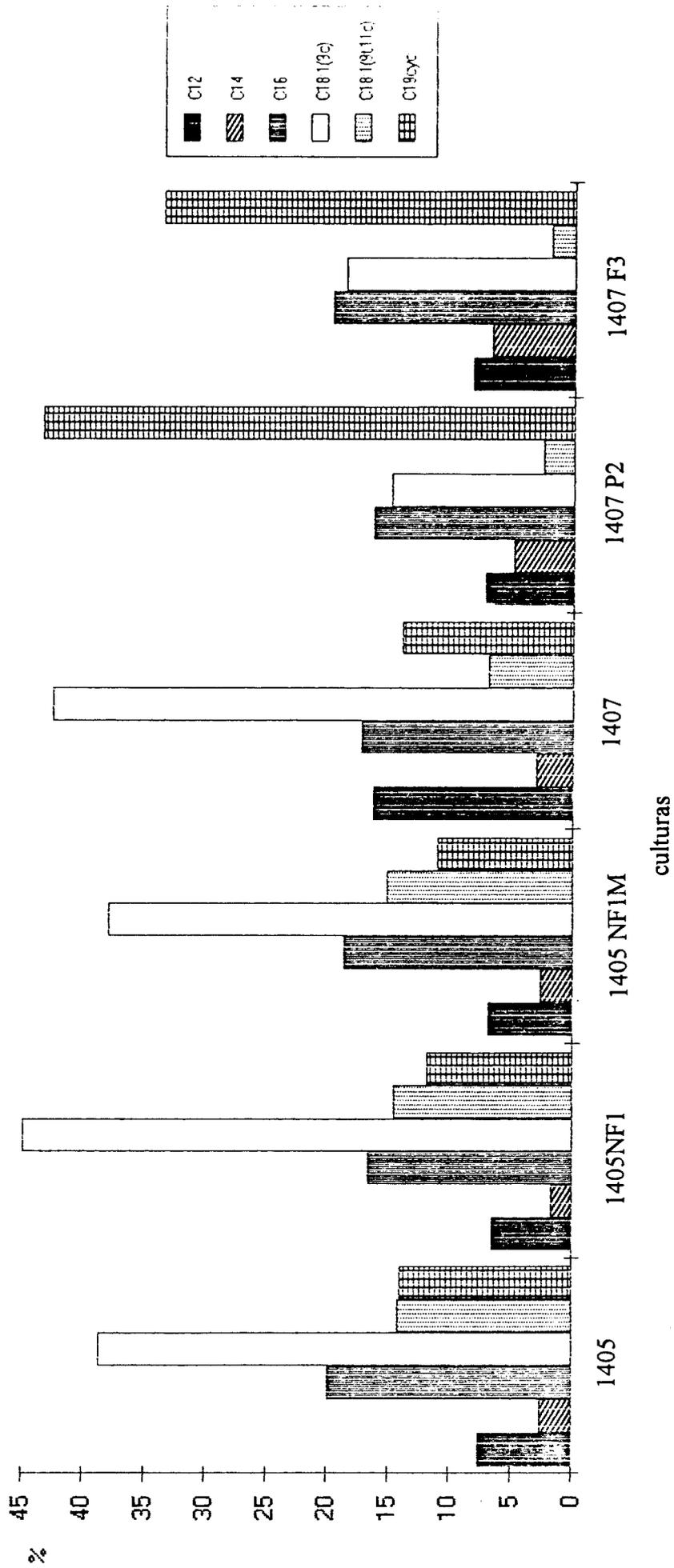
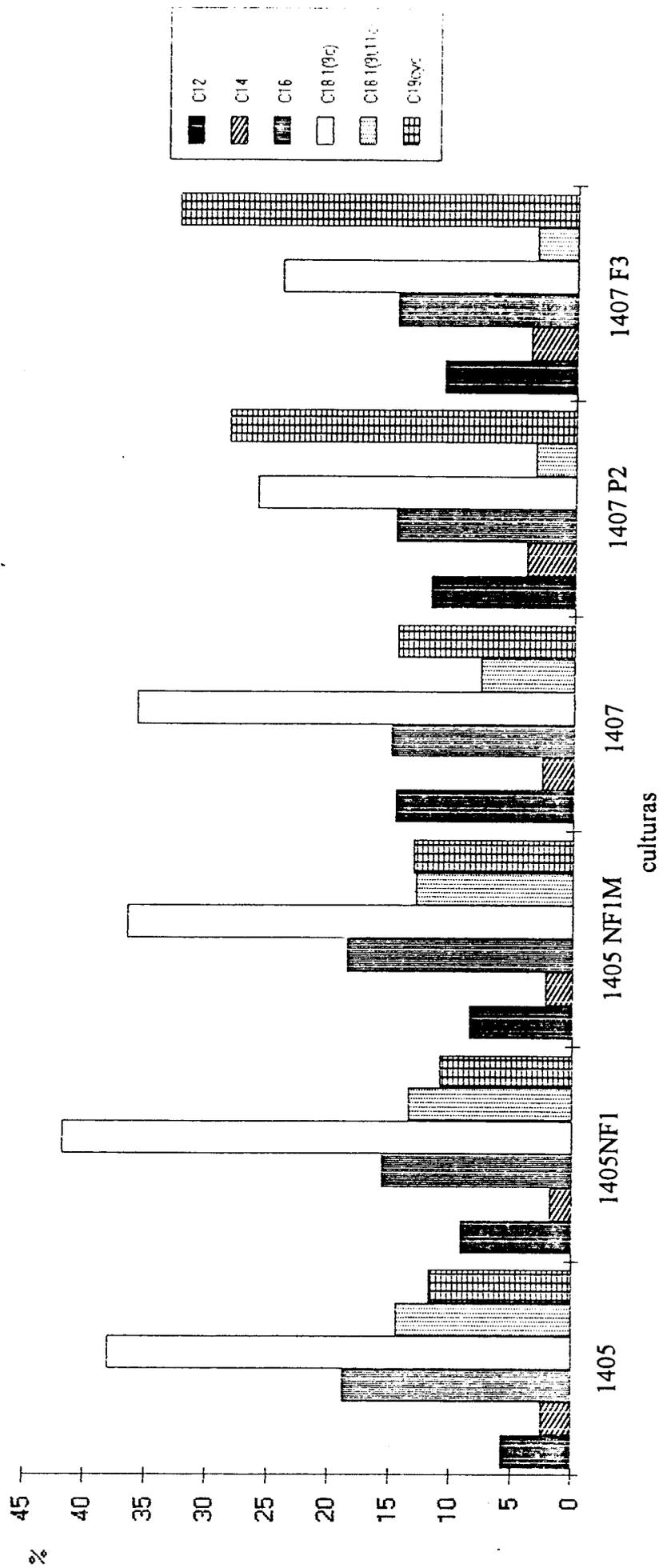


Figura 7: COMPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS DE MEMBRANA CELULAR DE *Lactobacillus fermentum* POR CROMATOGRAFIA GASOSA - EXPERIMENTO 2



4.6.2. Perfil eletroforético de proteínas totais de *Lactobacillus fermentum*

Os perfis de proteínas totais das linhagens FTPT 1405, FTPT 1407 e FTPT 2571 (linhagem tipo) e isolados 1405 NF1, 1405 NF2, 1405 NF1M, apresentaram bandas semelhantes, como visto na figura 8.

Os perfis de proteínas totais da linhagem FTPT 1405 e de seus isolados 1405 NF1, 1405 NF2 e 1405 NF1M foram bastante semelhantes (ver Figura 8), assim como também apresentaram grande semelhança com o perfil das linhagens 1407 e 2571 (linhagem tipo-ATCC14931).

Com isto não foi possível diferenciar as linhagens floculentas das não floculentas através do perfil de proteínas totais, partindo-se para o perfil de proteínas de parede. Acredita-se que o fator responsável pela floculação esteja intrinsicamente ligado à parede celular (YOKOYA & OLIVANETO, 1991) e dependente da integridade desta, já que os resultados mostram que as células bacterianas lisadas perdiam a capacidade de flocular leveduras.

4.6.3. Perfil eletroforético de proteínas de parede de *Lactobacillus fermentum*

Os resultados da extração das proteínas de parede pelo método 1, descrito no item 3.5.1, indicam que a adição de sacarose com o objetivo de manter os protoplastos intactos, teve efeito prejudicial na ação da lisozima. A lise celular foi acompanhada por microscopia de contraste de fase, onde foram observados poucos protoplastos e escombros celulares, mas houve predomínio de células íntegras.

No método 2, descrito no item 3.5.1., as lavagens e centrifugações foram acompanhadas em espectrofotômetro e indicaram que as lavagens não foram eficientes para estas linhagens, já que a absorbância nem sempre diminuiu como o esperado. O centrifugado final de cada amostra foi analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, resultando num perfil muito fraco. Portanto as amostras foram concentradas por liofilização e novamente analisadas em eletroforese (Figura 9).

Os resultados obtidos na extração de proteínas de parede não possibilitaram identificar diferenças entre as amostras, pois as metodologias aplicadas foram pouco eficientes neste estudo. No método 1 observou-se uma baixa formação de protoplastos quando as células foram tratadas com lisozima em tampão com sacarose. Este efeito inibitório da presença da sacarose na ação da lisozima em células de *Lactobacillus fermentum* também foi descrito por NEUJAHR *et alii* (1973).

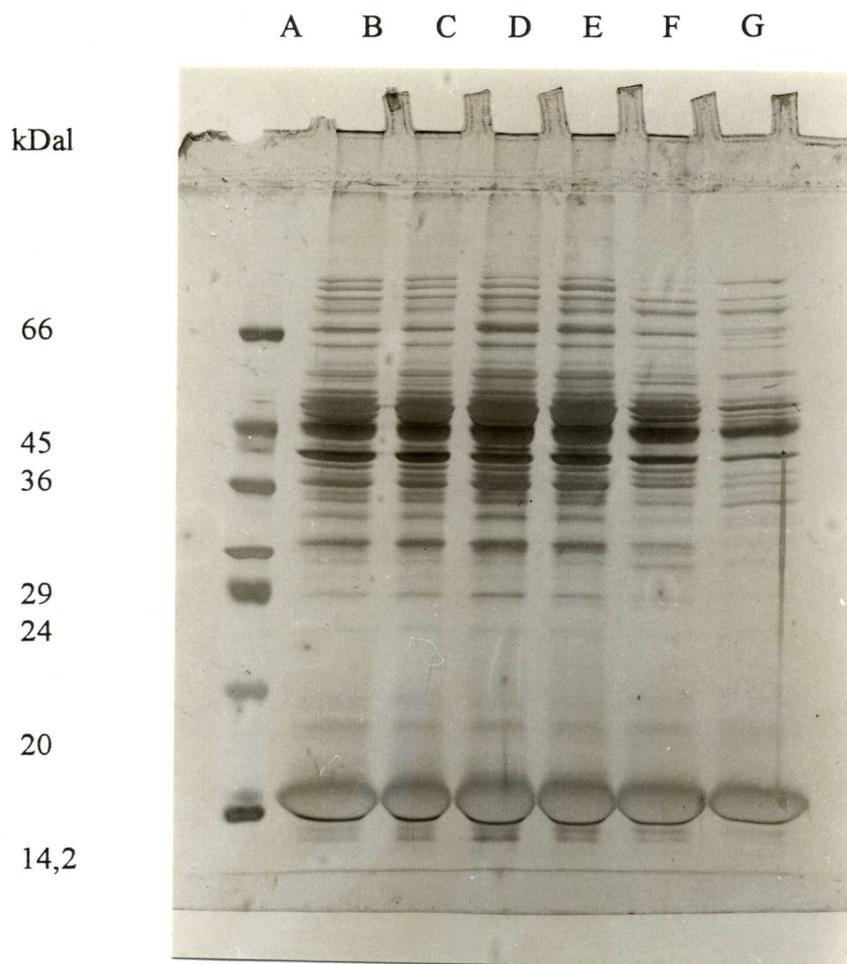


Figura 8 : Perfil eletroforético de proteínas totais: (A) padrões de peso molecular, (B) FTPT 1405, (C) 1405 NF1, (D) 1405 NF2, (E) 1405 NF1M, (F) FTPT 1407, (G) FTPT 2571.

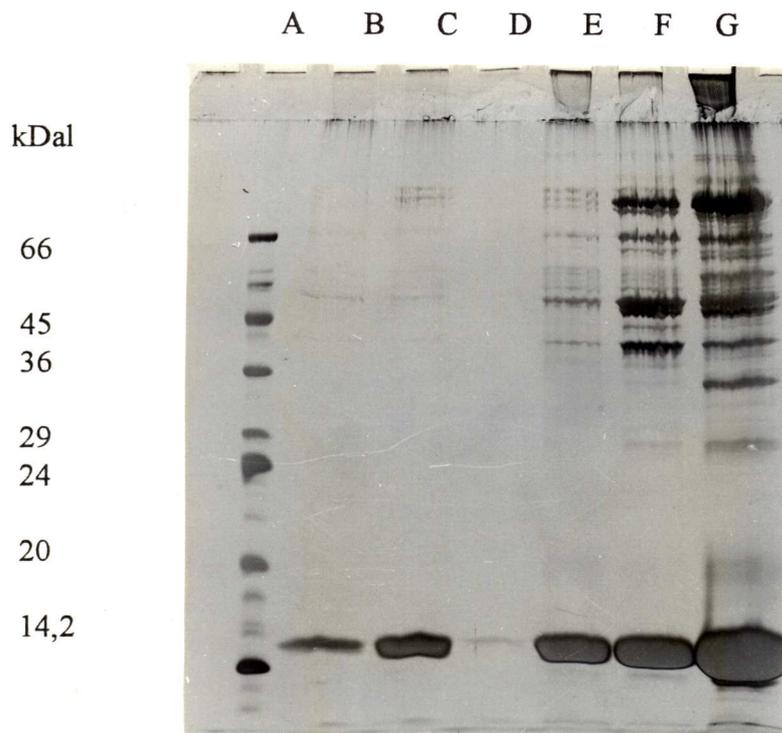


Figura 9: Perfil eletroforético de proteínas de parede das amostras: (A) padrões de peso molecular, (B) FTPT 1405, (C) 1405 NF1, (D) 1405 NF2, (E) 1405 NF1M, (F) FTPT 1407 e (G) FTPT 2571

No método 2, as culturas 1407 e 2571 quando centrifugadas não formavam um centrifugado compacto, levando a considerar uma possível migração de proteínas citoplasmáticas para o sobrenadante, onde estariam as proteínas de parede. O acompanhamento das lavagens por espectrofotometria indicou que haviam perdas durante as mesmas. O centrifugado final foi ressuspenso e observado seu perfil eletroforético, porém houve poucas bandas e de difícil visualização. Após a concentração das amostras por liofilização foi feito um novo gel (Figura 9). Os perfis das culturas 1407 e 2571 apresentaram um maior número de bandas e de maior intensidade, porém possivelmente incluem proteínas citoplasmáticas, devido à sua semelhança com o perfil de proteínas totais (figura 8).

Houve dificuldade em se quantificar as proteínas a serem aplicadas no gel, já que a grande quantidade de lisozima (5 mg/ml) utilizada na lise elevou o título das amostras, dificultando a sua dosagem pelos métodos tradicionais. Com isto, a comparação entre os perfis das culturas não pode ser realizada devidamente.

O perfil das outras amostras apresentou bandas fracas, onde se destacam duas bandas de peso molecular acima de 66 kDal (figura 9). No trabalho de ENDO & TAKAHASHI (1981) estudaram a genética do fator de floculação de uma linhagem B de *Flavobacterium* onde, após o tratamento com guanidina, obtiveram mutantes não-floculantes e revertantes floculantes. A análise do perfil eletroforético das proteínas de parede dos mutantes, revertantes e parentais não mostrou diferenças nas bandas, apenas na intensidade das mesmas. Portanto, o perfil de proteínas de parede nem sempre é eficiente na diferenciação de linhagens floculadoras e não floculadoras.

4.7. Considerações finais

Neste trabalho, foram feitas várias tentativas de diferenciação entre as culturas de *Lactobacillus fermentum* floculadoras e não-floculadoras quanto a características genéticas e morfofisiológicas, a fim de relacionar o fator de floculação com alguma destas características. No entanto, constatou-se a dificuldade de fazer associações diretas entre o fator responsável pela capacidade floculadora com componentes estruturais superficiais da bactéria, ou mesmo explicar a instabilidade deste fator.

Foram realizados estudos, no Japan Collection of Microorganisms-Japão, sobre o perfil cromatográfico de aminoácidos do peptidoglicano de linhagens e isolados de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405, 1405 NF1, 1405NF1M, 1407, 1407 P2 e 1407 F3.

Os resultados preliminares mostraram não estar de acordo com a literatura que cita a ornitina como aminoácido predominante no peptidoglicano. Foram encontradas porções equivalentes de ornitina e lisina nas culturas analisadas. A lisina é o principal aminoácido da espécie *Lactobacillus reuteri*. Portanto, o estudo da composição dos aminoácidos do peptidoglicano das culturas citadas deverá ser aprofundado em próximos trabalhos.

Portanto, permanece em aberto a questão da identificação do fator responsável pela capacidade floculadora, o qual deverá continuar sendo investigado.

5. CONCLUSÕES

1. A lise de *Lactobacillus fermentum*, com 10 mg/ml de lisozima à 37°C por 60 min, demonstrou ser eficiente para posterior extração de DNA. Para a extração de proteínas, o uso de 5 mg/ml de lisozima à 37°C por 18 h, revelou resultados satisfatórios.
2. A tentativa de remoção de proteínas superficiais de *Lactobacillus fermentum* por agitação e temperatura não foi observada, indicando que tais proteínas devem estar intrinsecamente ligadas à parede bacteriana. Os tratamentos com agitação não modificaram a capacidade de floculação das culturas, enquanto o tratamento térmico à 60°C inibiu esta capacidade.
3. A instabilidade fenotípica de *Lactobacillus fermentum* FTPT 1045 foi considerada elevada. Partindo de uma linhagem altamente floculadora, isolou-se uma colônia de reduzida capacidade floculadora na proporção de 598:1. A partir deste isolado obteve-se uma colônia que reapresentou alta capacidade floculadora (397:1)
4. A presença de DNA plasmidial não foi verificada em *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405, a qual poderia ter explicado a grande instabilidade de seu fator de floculação.
5. As características morfológicas e bioquímicas confirmaram que as culturas estudadas pertencem à espécie *Lactobacillus fermentum*. Porém, não apresentaram diferenças significativas entre linhagens floculadoras e não-floculadoras.
6. O perfil cromatográfico de ácidos graxos de membrana plasmática foi semelhante para todas as culturas analisadas.

7. Através do perfil eletroforético de proteínas não foi possível identificar uma banda exclusiva de linhagens floculadoras ou não-floculadoras. O padrão de bandas foi semelhante entre as culturas analisadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VARIO, M. L. R.; GABASSI, D. M. Efeito dos microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB* 3 (1): 42-49, 1984.
- AMORIM, H.V. & OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Álcool e açúcar* 5: 12-18, 1982.
- ANDERSON, D.G. & McKAY, L. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Env. Microbiol.* 45 (3): 549-552, 1983.
- AYMERICH, M.T.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; VOGEL, R.F.; MONFORT, M. Electrotransformation of meat lactobacilli. Effect of several parameters on their efficiency of transformation. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 320-325, 1993.
- BEAVAN, M. J.; BELK, D. M.; STEWART, G. G.; ROSE, A. H. Changes in electrophoretic mobility and lytic enzyme activity associated with the development of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 25: 888-895, 1979.
- BLOMBERG, L.; HENRIKSSON, A.; CONWAY, P.L. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. *Appl. Env. Microbiol.* 59(1): 34-39, 1993.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99, 1987.
- BROMBERG, R. **Estudo do mecanismo de de flocculação de leveduras causado por *Lactobacillus fermentum***. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1994. 74 p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas,
- CALLEJA, G.B. Cell aggregation. In: ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. eds. *The Yeasts* 2 ed. London, Academic Press, 1987. v. 2. p. 165-238.
- CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by acid lactic bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews* 87: 113-130, 1990.
- CHALK, K.J.I. & KODICEK, E. The incorporation of [Me-14C] methionine into lactobacillic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 50: 579-581, 1961.

- CHASSY, B.M. Prospects for the genetic manipulation of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Reviews* **46**: 297-312, 1987.
- CHASSY, B.M.; GIBSON, E.; GIUFRIDA, A. Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1576-1578, 1976.
- CHASSY, B.M. & GIUFRIDA, A. Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. *Appl. Env. Microbiology* **39**(1):153-158, 1980.
- COLLINS, M.D.; RODRIGUES, U.; ASH, C.; AGUIRRE, M.; FARROW, J.A.E.; MARTINEZ-MURCIA, A.; PHILLIPS, B.A.; WILLIAMS, A.M.; WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA. *FEMS Microbiol. Letters* **77**: 5-12, 1991.
- CONWAY, P.L. & KJELLEBERG, S. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1175-1186, 1989.
- CRONAN, J.E. Jr & GELMANN, E.P. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriological Reviews* **39**: 232-256, 1975.
- CRONAN, J.E. Jr; REED, R.; TAYLOR, F.R.; JACKSON, M.B. Properties and biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **138**: 118-121, 1979.
- DEJONGHE, G. Traité complet de la fabrication L'alcool et des levures. Lille- In Premiere Typographique et Lithographique Le Bigot. 1889. In: SERRA, G. E.; CEREDA, M.P.; FERES, R. J. F.; BERTOSO, M. T. & VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação alcoólica, Flocculação do fermento. *Brasil Açucareiro* **93** (6): 336-341, 1976.
- ENDO, T. & TAKAHASHI, H. Genetic evidence for the involvement of aggregation factor and other components in flocculation of *Flavobacterium* strain B. *Agri. Biol. Chem.* **45** (2): 379-383, 1981.
- ESSER, K. & KUES, U. Flocculation and its implication for biotechnology. *Process. Biochem.* **18**: 21-23, 1983.
- FERNANDEZ, J.L. & SIMPSON, W.J. Aspects of the resistance of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 315-319, 1993.
- GALLI, Z.F. II Semana de fermentação alcoólica: fermentação do mel final das usinas de Piracicaba. Piracicaba, *Instituto Zimotécnico*, 1961. v.2. p.297-304.

- GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1990. 388 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas.
- GILL, C.O. & SUISTED, J.R. The effects of temperature and growth rate on the proportion for unsaturated acids in bacterial lipids. *J. Gen. Microbiol.* **104**: 31-36, 1978.
- HARTY, D.W.S.; PATRIKAKIS, M.; HUME, E.B.H.; OAKEY, H.J.; KNOX, K.W. The aggregation of human platelets by *Lactobacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2945-2951, 1993.
- HELM, E., NORTH, B.; THORNE, R.S.W. *Wallerstein Laboratory Communication* **16**:115, 1953. In: *Journal of the Institute of Brewerie* **87**: 303-321, 1981.
- HENRIKSSON, A. & CONWAY, P. Adhesion to porcine squamous epithelium of saccharide and protein moieties of *Lactobacillus fermentum* strain 104-S. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2657-2661, 1992.
- HENRIKSSON, A.; SZENWZYK, R.; CONWAY, P.L. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 499-502, 1990.
- HERTEL, C.; LUDWIG, W.; OBST, M.; VOGEL, R.F.; HAMMES, W.P.; SCHLEIFER, K.H. 23 S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the rapid identification of meat lactobacilli. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**: 173-177, 1991.
- HERTEL, C.; LUDWIG, W.; POT, B.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K.H. Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electroforetic protein profiles. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 463-467, 1993.
- HERZBERG, M. C.; BRINTZEHOFF, K.L.; CLAWSON, C.C. Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infection and Immunity* **39**: 1457-1469, 1983.
- HINTERMANN, G.; FISHER, H.M.; CRAMERI, R.; HUTTER, R. Simple procedure for distinguishing CCC, OC and L forms of plasmid DNA by agarose gel electroforesis. *Plasmid* **5**: 371-373, 1981.
- ISHIWA, H. & IWATA, S. Drug resistance plasmids in *Lactobacillus fermentum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**: 71-74, 1980.
- IWATA, D.A.; MADA, M.; ISHIWA, H. Protoplast fusion of *Lactobacillus fermentum*. *Appl. Env. Microbiol.* **55**(2): 392-393, 1986.

- JONHSON, D.F.; WALKER, T.; CALLEJA, G.B.; SELIGY, V. L. Sexual co-flocculation and asexual self-flocculation in budding and fission yeasts: experimental establishment of fundamental difference. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1105-1107, 1988.
- KAJI, D.A. **Influência da temperatura e infecção lática na fermentação alcoólica.** Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1989. 136p. Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
- KANDLER, O. & WEISS, N. Regular nonsporing Gram-positive rods. In: Sneath, P. eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. v. 2. p.1208-1234.
- KLAENHAMMER, T.R. A general method for plasmid isolation in lactobacilli. *Current Microbiology* **10**: 23-28, 1984.
- KLAENHAMMER, T.R. & SUTHERLAND, S.M. Detection of plasmid deoxyribonucleic acid in an isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Env. Microbiol.* **39**(3): 671-674, 1980.
- KOJIK, M.; VUJICIC, M.; BANINA, P.; COCCONCELLI, P.; CERNING, J.; TOPISIROVIC, L. Analysis of a exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG 11, isolated from cheese. *Appl. Env. Microbiol.* **58** (12): 4086-4088, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- LEWIS, C.W.; JOHNSON, J. R.; MARTIN, P. A. The genetics of the yeast flocculation. *J. Inst. Brew.* **82**, 158- 160. 1976.
- LORTAL, S., ROUSSEAU, M., BOYAVAL, P.; HEIJENNOORT, J. Cell and autolytic system of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 549-559, 1991.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins as molecules and tools. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 35-69, 1986.
- LIPKE, P. N. & HULL-PILSBURY, C.. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* *tup1* mutants. *J. Bacteriol.* **159**: 797-799, 1984.
- Mc KAY, L. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 259-274, 1983.

- MEYERS, J.A.; SANCHES, D.; ELWELL, L.P.; FALCOW, S. Simple agarose gel electrophoretic method for identification and characterization of plasmid deoxiribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **127**: 1529-1537, 1976.
- MIKI, B.L.A.; POON, N.H.; JAMES, A.P.; SELIGY, V.L. Possible mechanism for flocculation Interactions governed by gene FLO 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **150** (2): 878-89, 1982.
- MILL, P.J. The nature of the interactions of flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **35**: 61-68, 1964.
- MUKAY, T.; ARIHARA, K.; HIROSHI, I. Lectin-like activity of *Lactobacillus acidophilus* JCM 1026. *FEMS Microbiol. Letters* **98**: 71-74, 1992.
- NEUJAHN, H.Y.; BORSTAD, B.; LOGARDT, I.M. Factors affecting the resistance of *Lactobacillus fermenti* to lysozyme. *J. Bacteriol.* **116**(2): 694-698, 1973.
- NEVES, L.B. Tecnologia da fabricação do álcool. *Rev. Bras. Química* **Cap.VII**: 89-134, 1938.
- NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Effect of chemical modification of cell components of a brewer's yeast on the floc forming ability. *Arch. Microbiol.* **115**: 19-23, 1977.
- NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effects of metal ions. *Arch. Microbiol.* **131**: 112-115, 1982.
- OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada.** Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1990. 207p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas.
- OLSEN, I.; JOHNSON, J.L.; MOORE, L.V.H.; MOORE, W.E.C. *Lactobacillus uli* sp. nov. and *Lactobacillus rimae* sp. nov. from the human gingival crevice and emended descriptions of *Lactobacillus minutus* and *Streptococcus parvulus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**(2): 261-266, 1991.
- O'SULLIVAN, D.J. & KLAENHAMMER, T.R. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Env. Microbiol.* **59**: 2730-2733, 1993.
- PIDOUX, M.; MARSHALL, V.M.; ZANONI, P.; BROOKER, B. Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 311-320, 1990.

- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 151-156, 1989.
- PORTNOY, D.A.; MOSELEY, S.L.; FALKOW, S. Characterization of plasmids and plasmid associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infection and Immunity* **31**: 775-782, 1981.
- RIZZO, A.F.; KORKEALA, H.; MONONEN, I. . Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *Appl. Env. Microbiol.* **53**: 2883-2888, 1987.
- ROSE, A.P. Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces*. In: SKINNER, F. A.; PASSMORE, S.M. & DAVENPORT, R. R. eds. *Biology and activities of yeasts*. London, Academic Press, 1980. p. 103-121.
- RUIZ-BARBA, J.L.; PIARD, J.C.; JIMENEZ-DIAS, R. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *J. Appl. Bact.* **71**: 417-421. 1991.
- RUSSELL I.; STEWART, G.G.; READER, H.P.; JOHNSTON, J.R.; MARTIN, P.A. Revised nomenclature of genes that control yeast flocculation. *J. Inst. Brew.* **86**: 120-121, 1980
- SADDLER, G.S.; O'DONNELL, A.G.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. SIMCA pattern recognition in the analysis of streptomycete fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1137-1147, 1987.
- SANTOS, M.T. **Características da flocculação de leveduras causada por *Lactobacillus fermentum***. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1991. 207 p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas.
- SANTOS, M.T. & YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *J. Ferment. Bioeng.* **75** (2): 151-154, 1993.
- SAVAGE, D.C. Mechanisms by which indigenous microorganisms colonize gastrointestinal epithelial surfaces. *Prog. Food Science* **47**: 65-74, 1983.
- SCHMIDT, H.J. Moderne keimidentifizierung im betriebslabor. *Brauwelt* **4**: 142-145, 1993.
- SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOSO, M.T., VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica, flocculação do fermento. *Brasil Açucareiro* **93** (6): 336-341, 1976.

- SMITTLE, R.B., GILLILAND, S.E., SPECK, M.L.; WALTER, W.M., Jr.
Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology* 27: 738-743, 1974.
- STRATFORD, M. Yeast flocculation: the influence of agitation. *Yeast* 5: s97-s102, 1989a.
- STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5: s441-s445, 1989b.
- STRATFORD, M. & ASSINTER, S. Yeast flocculation: Flo 1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* 7: 559-574, 1991.
- STRATFORD, M.; COLEMAN, H.P.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: a dynamic equilibrium. *Yeast* 4: 199-208, 1988.
- STRATFORD, M. & KEENAN, H.J. Yeast flocculation: quantitation. *Yeast* 4: 107-115, 1988.
- SUTHERLAND, I. Bacterial exopolysaccharides - their nature and production. In: SUTHERLAND, I. ed., *Surface carbohydrates of procaryotic cell*. New York, Academic Press, 1977. p. 27-96.
- SUUTARI, M. & LAAKSO, S. Temperature adaptation in *Lactobacillus fermentum*: interconversions of oleic, vaccenic and dihydrostearic acids. *J. Gen. Microbiol.* 138: 445-450, 1992.
- SUZUKI, K.; GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A.G. Cell envelopes and classification. In: GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.G. ed. *Handbook of new bacterial systematics*. London, Academic Press, 1993. p. 195-250.
- TANNOCK, G.W.; McCONNELL, M.A.; FULLER, R. A note on the use of a plasmid as an DNA probe in detection of *Lactobacillus fermentum* strain in porcine contents. *J. Appl. Bacteriol.* 73(1): 60-62, 1992.
- TILBIRY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: CAN, J.G.; CUTTING, C.V.; WHITTING, G.C. eds. *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. London, Academic Press, 1975. p. 171-177.
- THORNE, K.J.I. & KODICEK, E. The metabolism of acetate and mevalonic acid by lactobacilli. IV. Analysis of the fatty acids by gas-liquid chromatography. *Biochimica and Biophysica Acta* 59: 306-312, 1962.

- UCHIDA, K. Effects of cultural conditions on the cellular fatty acid composition of *Lactobacillus heterohiochii*, and alcoholophilic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 837-842, 1975.
- UCHIDA, K. & MOGI, K. Cellular fatty acid spectra of hiochi bacteria, alcohol-tolerant lactobacilli, and their group separation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19**, 233-249. 1973.
- VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Protein electroforesis and classification. In: GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.G. ed. *Handbook of new bacterial systematics*. London, Academic Press, 1993. p. 251-280.
- VEERKAMP, J.H. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* **108**: 861-867, 1971.
- VELÁZQUEZ, J.B.; CANSADO, J.; SIEIRO, C.; CALO, P.; LONGO, E.; VILLA, T.G. Improved lysis of wine lactobacilli for high yield isolation and characterization of chromosomal DNA. *J. Microb. Methods* **17**: 247-253, 1993.
- VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; BARRE, P. Mapping of the FLO 5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* by transfer of a chromosome during cytoduction. *Biotechnol. Lett.* **13** (1): 47-52, 1991.
- VOGEL, R.F.; POHLE, B.S.; TICHACZEK, P.S.; HAMMES, W.P. The competitive advantage of *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in sausage fermentations is caused by formation of curvacin A. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 457-462, 1993.
- YAMASHITA, I. & FUKUI, S. Mating signals control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene Flo 8 in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47** (12): 2889-2896, 1983.
- YOKOYA, F. & OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia* **22**: 12-16, 1991.