



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

ACÇÃO DA LISOZIMA SOBRE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DO  
VINHO: A INFLUÊNCIA DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE (S-layer)

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

por

Rita Luisa Gandra Dias

Julho 2010



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

ACÇÃO DA LISOZIMA SOBRE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DO  
VINHO  
A INFLUÊNCIA DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE (S-layer)

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

por

Rita Luisa Gandra Dias

sob orientação de

José António Couto

Julho 2010

**Resumo:**

A lisozima pode ser usada na produção de vinho para prevenir o crescimento de bactérias do ácido láctico (BAL) de forma a impedir ou controlar a extensão da fermentação maloláctica (FML), ou para evitar a deterioração causada por estas bactérias em fases pós-fermentativas.

Trabalhos anteriores demonstraram que a resposta das BAL do vinho à lisozima é dependente da espécie e da estirpe. Algumas estirpes de lactobacilos isoladas de vinho do Porto foram consideradas altamente resistentes à lisozima (sobrevivendo na presença de 500 a 2000 ppm). Foi observado que as estirpes resistentes produzem uma camada proteica cristalina (S-layer), que envolve o peptidoglicano. Pensa-se que esta camada, composta exclusivamente por proteínas ou glicoproteínas, possa ter um papel protector a factores ambientais.

Neste trabalho, investigou-se o possível papel protector da S-layer contra a acção da lisozima. Foram usados vários tratamentos para remover esta camada de superfície, sendo o tratamento com LiCl (5 M) o mais efectivo, conforme evidenciado por SDS-PAGE. A estirpe *Lactobacillus hilgardii* 35 tratada com LiCl e posteriormente exposta à acção da lisozima (2000 ppm) em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , manteve a sua resistência. No entanto, a substituição do meio de suspensão celular por água estéril revelou um aumento da sensibilidade das células à acção da lisozima. Verificou-se ainda que a adição de etanol (20% v/v) ao meio de suspensão (água estéril) desencadeou um forte efeito de inactivação especialmente nas células previamente tratadas com LiCl (redução de UFC/mL superior a 6 ciclos logarítmicos em 30 e 60 min na presença de 2000 e 500 ppm de lisozima, respectivamente). Os resultados mostram que: a) a S-layer exerce um efeito protector relativamente à acção da lisozima; b) O meio de suspensão celular influencia a eficiência de lise das células submetidas à acção da lisozima. Componentes do tampão e do vinho poderão conferir protecção osmótica às células preservando a sua integridade e viabilidade; c) o etanol tem um importante efeito potenciador da inactivação das células submetidas à acção da lisozima.

## **Abstract:**

Lysozyme can be used in wine production to prevent the growth of lactic acid bacteria (LAB) in order to avoid or control the extent of malolactic fermentation (MLF), or to prevent the deterioration caused by these bacteria in post fermentative stages.

Previous work demonstrated that the response of wine LAB to lysozyme is species and strain dependent. Some strains of lactobacilli isolated from Port wine were found to be highly resistant to lysozyme (surviving in the presence of 500 to 2000 ppm). It was observed that resistant strains produce a crystalline protein layer (S-layer), which involves the peptidoglycan. It is thought that this layer, consisting exclusively of proteins or glycoproteins, may have a protective role to environmental factors.

In this study, we investigated the possible protective role of the S-layer against the action of lysozyme. Various treatments were used to remove this layer from the cells, the treatment with LiCl (5 M) being the most effective, as evidenced by SDS-PAGE. LiCl treated populations of *Lactobacillus hilgardii* 35 exposed to lysozyme (2000 ppm) were found to keep their resistance in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer. However, the substitution of the  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer by sterile water as cellular suspension medium led to an increase in the sensitivity of cells to lysozyme. It was also found that when ethanol (20% v/v) was added to the suspending medium (sterile water), a strong inactivation effect was observed, especially in cells previously treated with LiCl (> 6 log CFU/mL reduction in 30 and 60 min in the presence of 2000 and 500 ppm of lysozyme, respectively). The results show that: a) the S-layer exerts a protective effect against the action of lysozyme; b) the cellular suspension medium influences the inactivation efficiency of lysozyme. Components of buffer and wine seem to give osmotic protection to cells which retain their integrity and viability; c) ethanol potentiates the inactivation of cells exposed to lysozyme.

## **Agradecimentos:**

Quero agradecer à Escola Superior de Biotecnologia (ESB) por me permitir estudar de forma a obter o grau de Mestre e me providenciar todo o suporte necessário para levar a cabo este trabalho.

Pretendo expressar toda a minha sincera gratidão ao meu orientador José António Couto, pela sua amizade, paciência, encorajamento, constante orientação e conselhos indispensáveis, essenciais na realização deste trabalho.

Estou particularmente agradecida à minha família por me proporcionar esta oportunidade de continuar a minha formação, por acreditar em mim e me apoiar todas as horas com os seus cuidados e afectos.

Não posso esquecer de todo o ânimo, apoio, carinho e paciência que os meus amigos, pessoas muito queridas, me concederam nos momentos de convivência mesmo nas situações mais desesperadoras. Peço desculpa não os nomear, mas eles sabem quem são.

## **Índice:**

**Resumo 2**

**Abstract 3**

**Agradecimentos 4**

**Índice 5**

**Lista de Abreviaturas e Símbolos 7**

## **1. Introdução 10**

1.1. Taxonomia e características gerais das bactérias do ácido láctico **10**

1.2. Habitats das bactérias do ácido láctico **11**

1.2.1. Bactérias do ácido láctico na produção de alimentos **11**

1.3. Bactérias do ácido láctico no processo de produção de vinho **12**

1.3.1. Bactérias do ácido láctico em vinhos fortificados **14**

1.3.1.1. Bactérias do ácido láctico em vinhos fortificados do Douro **15**

1.3.1.1.1. *Lactobacillus hilgardii* no vinho **16**

1.3.2. Factores que afectam o crescimento/sobrevivência de bactérias do ácido láctico em vinhos **16**

1.3.2.1. O SO<sub>2</sub> e a Lisozima **18**

1.3.2.1.1. Aplicações da Lisozima **19**

1.4. Proteínas de superfície (S-layers) **21**

1.4.1. S-layer em bactérias do ácido láctico **24**

1.5. Objectivo deste trabalho **24**

## **2. Materiais e Métodos**

2.1. Bactérias e condições de crescimento **26**

2.2. Extracção da S-layer a partir de diferentes métodos e análise da viabilidade celular **26**

2.3. SDS-PAGE **27**

2.3.1. Preparação dos extractos proteicos **27**

2.3.2. Electroforese SDS-PAGE **28**

2.3.3. Visualização das bandas proteicas **29**

- 2.4. Inativação das bactérias do ácido lático pela lisozima **30**
  - 2.4.1. Em tampão fosfato como meio de suspensão celular **30**
  - 2.4.2. Em água estéril como meio de suspensão celular **31**
  - 2.4.3. Com adição de etanol ao meio de suspensão celular **31**
  - 2.4.4. Em vinho como meio de suspensão celular **32**

### **3. Resultados e Discussão**

- 3.1. Análise da viabilidade celular ao longo dos tratamentos de extracção da S-layer **36**
- 3.2. SDS-PAGE para verificação da eficácia da remoção da S-layer **37**
- 3.3. Verificação da resistência das bactérias do ácido lático à lisozima **39**
  - 3.3.1. Em tampão fosfato como meio de suspensão celular **39**
  - 3.3.2. Em água estéril como meio de suspensão celular **40**
  - 3.3.3. Com adição de etanol ao meio de suspensão celular **41**
  - 3.3.4. Em vinho como meio de suspensão celular **44**

### **4. Conclusões Gerais 46**

### **5. Trabalho Futuro 47**

### **6. Referências Bibliográficas 48**

## **Lista de Abreviaturas e Símbolos:**

**APS** – Persulfato de amónio  
**ATP** – Adenosina trifosfato  
**ATPase** – Adenosina trifosfatase  
**BAL** – Bactérias do ácido láctico  
**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético  
**EMP** – Via de Embden, Meyerhof and Parnas  
**ESB** – Escola Superior de Biotecnologia  
**FA** – Fermentação alcoólica  
**FDP** – Frutose difosfato  
**FML** – Fermentação maloláctica  
**g** – Aceleração da gravidade  
**GHCI** – Guanidine hydrochloride solution  
**G6P** – Glucose-6-fosfato  
**h** – Hora  
**HCl** – Ácido clorídrico  
**HMP** – Via hexose monofosfato  
**kDa** – Kilo Dalton  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Tampão fosfato  
**L** – Litro  
**LiCl** – Cloreto de lítio  
**Log** – Logaritmo de base 10  
**M** – Molar (mol/L)  
**mA** – Miliampere  
**mg** – Miligrama  
**min** – Minuto  
**mL** – Mililitro  
**mol** - Mole  
**MRS** – Meio selectivo Man, Rogosa and Sharpe  
**NaPBS** – Tampão fosfato de sódio  
**nm** – Nanómetros  
**6PG** – 6-Fosfogluconato  
**pI** – Ponto isoeléctrico

**ppm** – Parte por milhão (mg/L)

**rpm** – Rotações por minuto

**SDS** – Sodium dodecyl sulfate

**SDS-PAGE** – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**SO<sub>2</sub>** – Dióxido de enxofre

**TCA** – Ácido tricloroacético

**TEMED** – N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina

**UFC** – Unidades formadoras de colónias

**μL** – Microlitros

**μm** – Micrómetros

**°C** – Grau Célsius

**v** – Volt

## **1. Introdução**

- 1.1. Taxonomia e características gerais das bactérias do ácido láctico **10**
- 1.2. Habitats das bactérias do ácido láctico **11**
  - 1.2.1. Bactérias do ácido láctico na produção de alimentos **11**
- 1.3. Bactérias do ácido láctico no processo de produção de vinho **12**
  - 1.3.1. Bactérias do ácido láctico em vinhos fortificados **14**
    - 1.3.1.1. Bactérias do ácido láctico em vinhos fortificados do Douro **15**
      - 1.3.1.1.1. *Lactobacillus hilgardii* no vinho **16**
  - 1.3.2. Factores que afectam o crescimento/sobrevivência de bactérias do ácido láctico em vinhos **16**
    - 1.3.2.1. O SO<sub>2</sub> e a Lisozima **18**
      - 1.3.2.1.1. Aplicações da lisozima **19**
- 1.4. Proteínas de superfície (S-layers) **21**
  - 1.4.1. S-layer em bactérias do ácido láctico **24**
- 1.5. Objectivo deste trabalho **24**

## 1. Introdução

### 1.1. Taxonomia e características gerais das bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um grupo de microrganismos procariotas caracterizado como sendo bactérias Gram-positivo, normalmente sem motilidade, não esporuladas e que produzem ácido láctico como o maior ou único produto do metabolismo fermentativo de hidratos de carbono. A falta de citocromos de grupo heme e de catalase faz com que estes microrganismos sejam quimioorganotróficos, obtendo energia a partir de um metabolismo estritamente fermentativo (Costello, 2006). Apesar de serem anaeróbias facultativas, são um grupo de bactérias característico de habitats não aeróbios, muito exigentes do ponto de vista nutritivo (fundamentalmente açúcares, vitaminas, aminoácidos e bases azotadas) e que suportam valores de pH muito baixos, sendo a tolerância à acidez uma característica variável entre estirpes (Åvall-Jääskeläinen, 2005; Krieger, 2006; Inês *et al.*, 2008).

O grupo das BAL é constituído por 12 géneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Enterococcus*, *Oenococcus* e *Leuconostoc*.

Relativamente a estas bactérias, estabeleceram-se 3 grupos fisiológicos distintos: a) Espécies homofermentativas estritas, utilizam o percurso glicolítico de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (glicólise), que converte hexoses – principalmente glicose – em ácido láctico mas são incapazes de fermentar pentoses. Falta-lhes completamente ou contêm muito baixa actividade de duas enzimas chave da via da hexose monofosfato (HMP), a glucose-6-fosfato (G6P) desidrogenase e 6-fosfogluconato (6PG) desidrogenase mas contêm elevada actividade de frutose difosfato (FDP) aldolase. Estas espécies formam duas moléculas de lactato a partir de uma molécula de glucose pela via glicolítica. O rendimento energético é de 2 ATP por mole de glucose oxidada; b) Espécies heterofermentativas facultativas fermentam hexoses em ácido láctico pela via EMP. Estas espécies são também capazes de fermentar pentoses em ácido láctico e em ácido acético. Elas contêm elevados níveis de FDP aldolase, G6P e 6PG desidrogenases. Estes microrganismos, a partir de uma molécula de glucose, formam duas moléculas de lactato; c) Espécies heterofermentativas estritas usam hexoses e pentoses com produção de ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Não contêm FDP aldolases mas têm elevadas actividades de G6P e 6PG desidrogenases. Pela via

heterofermentativa o rendimento é de apenas 1 ATP (Kandler, 1983; Kandler e Weiss, 1986; Cox e Henick-Kling, 1989; Cox e Henick-Kling, 1990; Henick-Kling, 1995).

## **1.2. Habitats das bactérias do ácido láctico**

Apesar da exigência nutricional de muitas estirpes de BAL, elas são capazes de crescer numa multiplicidade de habitats e têm sido isoladas de uma variedade de fontes, incluindo tracto respiratório, intestinal e genital humanos e animais, águas residuais, solo e alimentos como vegetais, fruta, cereais, carne, produtos lácticos e bebidas fermentadas.

Vários benefícios nutricionais são derivados da acção de algumas espécies de BAL, tais como: aumento do valor nutricional de alguns alimentos, regulação de infecções intestinais – propriedades probióticas, melhoria na utilização da lactose em pessoas com má absorção, acção inibitória contra alguns tipos de cancro e controlo dos níveis de colesterol. Alguns benefícios potenciais podem resultar do crescimento e acção das bactérias durante o processamento de alimentos (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2005; Inês *et al.*, 2008).

### **1.2.1. Bactérias do ácido láctico na produção de alimentos**

As BAL representam um importante papel na produção de alimentos e fermentações industriais. Estão envolvidas no fabrico de alimentos fermentados de matérias-primas como leite, carne, uvas, vegetais e cereais. Estes alimentos fermentados são uma parte importante da indústria alimentar e são muitas vezes preparados usando estirpes seleccionadas que têm capacidade para eficientemente produzir os produtos desejados ou alterados, como por exemplo: queijo, manteiga, iogurte, carne curada, salsicha, linguiça e pickles. Estas bactérias têm importância não só na obtenção destes produtos como também em conferir sabor, aroma, textura e outros aspectos desejáveis. Também são úteis na preservação já que conseguem inibir o crescimento bacteriano e contribuem desta forma, para a manutenção da qualidade do produto. São microrganismos relacionados com a produção de alimentos de média e alta acidez, da qual podem participar como coadjuvantes da fabricação ou como deteriorantes, levando a perdas significativas na indústria alimentar (Inês *et al.*, 2008).

### 1.3. Bactérias do ácido láctico no processo de produção de vinho

A produção de vinho pode ser vista como uma das tecnologias mais antigas da humanidade, inclusive anterior à produção de pão. O vinho é muito complexo, com uma miríade de compostos que podem ser positivos ou negativos para o desenvolvimento de alguns microrganismos.

O processo de produção vínica envolve interações de diferentes e várias espécies microbianas, incluindo leveduras, fungos, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético (Gao *et al.*, 2002).

As leveduras, por competirem pelos nutrientes e por produzirem substâncias inibidoras (etanol, dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e ácidos gordos de cadeia média) retardam o crescimento das BAL durante a fermentação alcoólica (FA). Contudo, as leveduras também podem ter um papel estimulante no crescimento das BAL e na actividade maloláctica.

Após a FA, ocorre autólise das leveduras, sendo libertado para o meio, vitaminas, bases azotadas, péptidos e aminoácidos que estimulam o crescimento das BAL e que podem explicar a sucessão das espécies destas bactérias observada durante a FA (Krieger, 2006; Powell *et al.*, 2006; Inês *et al.*, 2008).

Várias espécies de BAL têm sido isoladas em diversas fases de produção, tais como, nas uvas, nos mostos e em vinhos armazenados (Mesas e Alegre, 1999).

Durante a produção vínica, as populações indígenas de BAL variam quantitativa e qualitativamente. Esta variação traduz-se numa sucessão de espécies e estirpes antes, durante e após a fermentação alcoólica (FA).

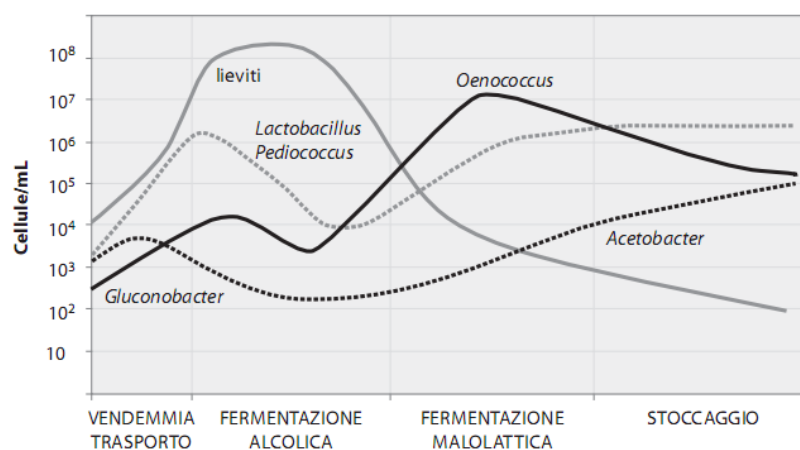
Devido ao ambiente selectivo dos vinhos, apenas alguns géneros de BAL são capazes de crescer em tal ambiente (Costello *et al.*, 1983). As bactérias deste tipo, isoladas do vinho, pertencem aos géneros: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*.

*Oenococcus oeni* é a espécie dominante na fermentação maloláctica (FML), enquanto que no mosto e no início da FA são, normalmente, espécies de *Lactobacillus* que predominam (Krieger, 2006). Dentro do género de *Lactobacillus* são principalmente as espécies *Lact. hilgardii*, *Lact. plantarum*, *Lact. collinoides*, *Lact. fructivorans*, *Lact. mali*, *Lact. casei* e *Lact. brevis* as mais encontradas (Costello *et al.*, 1983; Couto e Hogg, 1994; Couto, 1996; Krieger, 2006; Powell *et al.*, 2006; Inês *et al.*, 2008). A presença de *Pediococcus* é geralmente detectada após a FML (Krieger, 2006).

No mosto, antes de se dar início à FA, geralmente encontram-se BAL a níveis de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL, na maioria *Lact. plantarum* e *Lact. casei* e em menor quantidade *Leuconostoc*, *Oenococcus oeni* e *Pediococcus cerevisiae*.

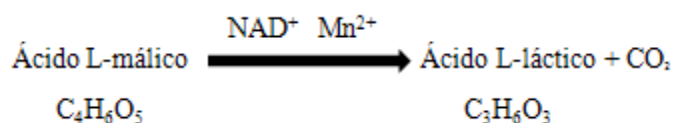
O número de BAL no vinho aumenta exponencialmente depois da FA, começando a FML quando o número bacteriano excede  $10^6$  células/mL.

Na FML, as BAL podem atingir  $10^6$  a  $10^8$  UFC/mL (Fig. 1). Estas bactérias podem ser prejudiciais caso permaneçam viáveis após o término desta fermentação (Krieger, 2006).



**Fig. 1** – Crescimento das BAL no vinho durante a vinificação e o armazenamento (Fonte: Krieger, 2006).

A FML, prática corrente em vinificação, é um processo de desacidificação biológica, realizado pelas BAL naturalmente presentes no meio ou através da adição de culturas de arranque. O crescimento e actividade destas bactérias, associadas à descarboxilação do ácido L-málico em ácido L-láctico, e os seus efeitos na qualidade do vinho estão bem documentados (Mesas e Alegre, 1999; Costello, 2006; Krieger, 2006). Esta conversão é representada pela seguinte fórmula:



A energia é produzida através de um mecanismo quimiosmótico que gera um gradiente protónico ( $\Delta P$ ) através da membrana celular (Cox e Henick-Kling, 1989). A entrada do ácido L-málico na célula bacteriana é facilitada por uma enzima específica de transporte. O

ácido L-málico é descarboxilado na célula produzindo-se ácido L-láctico e CO<sub>2</sub>, o que aumenta o pH intracelular. O ácido L-láctico e o CO<sub>2</sub> saem da célula. Para cada molécula de ácido L-láctico, que deixa a célula, um próton é transferido para o interior. Desta forma gera-se um gradiente protónico que vai ser utilizado para a produção de moléculas de ATP através da acção da ATPase vinculada à membrana. A síntese de uma molécula de ATP requer a entrada de três prótons pela ATPase (Cox e Henick-Kling, 1989; Cox e Henick-Kling, 1990; Henick-Kling, 1995).

Enolologicamente, a FML tem importantes consequências, consideradas positivas e desejáveis para muitos vinhos visto que (Daeschel *et al.*, 1991; Mesas e Alegre, 1999; Costello, 2006; Powell *et al.*, 2006):

- Confere estabilidade, uma vez que, enquanto houver ácido málico no vinho, este é mais instável
- Proporciona um refinamento do paladar, uma vez que o ácido málico é mais agressivo do que o ácido láctico
- Produz uma diminuição na acidez, originando mudanças importantes nas propriedades organolépticas do vinho, tanto na cor como no sabor e no aroma

Embora as BAL desempenhem um papel chave na desejada FML em certos vinhos, algumas estirpes indesejadas podem contribuir para o decréscimo da sua qualidade por provocarem um aumento do importante parâmetro enológico “acidez volátil” a níveis inaceitáveis. Esta situação ocorre através da produção de ácido acético a partir da degradação heteroláctica de hexoses (frutose e glucose) e outros substratos (Costello *et al.*, 1983; Mesas e Alegre, 1999; Gao *et al.*, 2002).

### **1.3.1. Bactérias do ácido láctico em vinhos fortificados**

Os vinhos fortificados são obtidos pela fermentação parcial do mosto, em que, além do álcool produzido pelas leveduras, se adiciona aguardente vínica, resultando num vinho com elevada concentração de etanol (19-21% v/v) (Couto, 1996). Os vinhos do Porto, Sherry ou Madeira, por exemplo, são vinhos em que o teor alcoólico foi aumentado pela adição de aguardente e que conseqüentemente sofreram alterações nas características e no sabor.

As bactérias encontradas e que são mais consistentemente associadas com a deterioração dos vinhos fortificados, foram identificadas como pertencendo ao género *Lactobacillus* (Gini e Vaughn, 1962; Rankine e Bridson, 1971, Couto e Hogg, 1994). Os

lactobacilos responsáveis por contaminações nos vinhos, atacam açúcares (hexoses) e formam ácido acético, ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e em algumas circunstâncias, manitol.

Entre os lactobacilos, há espécies bastante tolerantes ao etanol e por esta razão são considerados os organismos mais importantes como agentes de deterioração de vinhos fortificados (Fornachon, 1943).

#### **1.3.1.1. Bactérias do ácido láctico em vinhos fortificados do Douro**

Os vinhos fortificados do Douro são vinhos que, após creditação pelo Instituto de Vinho do Porto (IVP), podem ser comercializados como vinho do Porto. São feitos nas regiões demarcadas do Douro no Norte de Portugal a partir das uvas que crescem nesta região. Além do clima e influências geográficas, a escolha das castas e os parâmetros de maturação são determinantes para a composição química e qualidade do produto final.

Durante a produção do vinho podem ocorrer erros microbiológicos, desde logo ao nível das matérias-primas em que, as uvas podem estar infectadas por bolores, leveduras e bactérias do ácido acético e láctico. Mesmo depois da FA, o vinho pode não ser considerado um produto estável.

A FA das uvas esmagadas, incluindo as películas, é levada a cabo usando leveduras naturais ou mais raramente por inoculação com estirpes de leveduras seleccionadas. Quando a fermentação atinge o ponto desejado, é interrompida através da adição de aguardente vínica dando origem a vinhos com elevadas concentrações de etanol, aproximadamente 20% (v/v).

Durante a vinificação, a concentração de SO<sub>2</sub> é normalmente mantida a baixos níveis, uma vez que, a elevada concentração de etanol confere protecção contra a maior parte dos microrganismos. Os vinhos são maturados em cubas antigas ou barris e são sempre misturados durante o período de maturação.

Embora contenham um teor alcoólico de 18-20% (v/v) ou mais, os vinhos podem sofrer problemas sensoriais devido à presença de compostos indesejados produzidos por bactérias, geralmente exprimindo-se na forma de um aumento de acidez volátil (Couto e Hogg, 1994). A deterioração de vinhos fortificados da região demarcada do Douro tem sido reconhecida como um fenómeno ocasional e imprevisível na indústria, ocorrendo muitas vezes durante o primeiro e segundos anos de maturação dos vinhos.

Apesar das condições desfavoráveis para o crescimento bacteriano, existem certos lactobacilos capazes de crescer no vinho metabolizando as quantidades consideráveis de

açúcares que permanecem por fermentar (Inês *et al.*, 2008). As bactérias normalmente associadas ao vinho do Porto são lactobacilos heterofermentativos (Couto e Hogg, 1994)

#### **1.3.1.1.1. *Lactobacillus hilgardii* no vinho**

A maioria das bactérias exibem uma inibição de crescimento no intervalo de 1 a 10% de etanol, contudo, várias BAL podem sobreviver sob condições adversas de concentrações acima de 10% (v/v). Os lactobacilos heterofermentativos têm sido identificados como as BAL mais problemáticas em vinhos fortificados, incluindo o vinho do Porto.

Entre os lactobacilos, *Lactobacillus hilgardii* é dos organismos mais tolerantes ao etanol, sendo capaz de crescer na presença de 15-18% (v/v). O seu metabolismo é heterofermentativo obrigatório. É um organismo típico de bebidas ácidas e alcoólicas e foi identificada como a contaminante mais comum do vinho do Porto (Couto e Hogg, 1994).

Embora normalmente associada com a deterioração do vinho, principalmente causado pela degradação de açúcares, a *Lact. hilgardii* também é capaz de levar a cabo a FML.

O vinho tem sido o habitat mais relatado para *Lact. hilgardii*, embora estirpes representativas possam ser encontradas em associação com fruta fermentada, por exemplo.

Devido à sua elevada resistência intrínseca, esta bactéria obtida de vinho fortificado do Douro é um bom modelo de estudo para analisar mecanismos de resistência a este desafio ambiental.

#### **1.3.2. Factores que afectam o crescimento/sobrevivência de bactérias do ácido láctico em vinhos**

A propriedade fundamental dos organismos vivos é a sua capacidade de se adaptarem ao ambiente. Determinados microrganismos adaptaram-se a ambientes extremos tendo desenvolvido modificações em enzimas e na estrutura da membrana que não é encontrado em organismos que vivem em condições mais moderadas.

Alguns vinhos são mais sujeitos a contaminações bacterianas que outros do mesmo tipo. Diferenças que ocorrem na composição dos vinhos fortificados são de muita importância para o desenvolvimento bacteriano.

Vários factores influenciam o crescimento de BAL em vinhos fortificados, tais como:

- a) Acidez dos vinhos: o pH é um dos parâmetros mais importantes, que afecta o comportamento das BAL, influenciando a duração da fase de latência, a taxa de crescimento e consequentemente a duração da FML, as espécies que crescem no vinho, o seu comportamento metabólico e a sua sobrevivência (Costello *et al.*, 1983). Quanto mais baixo for o valor de pH, menos o vinho é sujeito ao ataque bacteriano (Powell *et al.*, 2006). Para além de afectar o crescimento das BAL, o pH também afecta a actividade maloláctica, os substratos transformados e os metabolitos produzidos (Mesas e Alegre, 1999; Krieger, 2006; Inês *et al.*, 2008).
- b) Temperatura: o máximo e o óptimo para o crescimento das bactérias varia de acordo com o conteúdo de álcool no meio. A temperatura para o crescimento das BAL em vinhos fortificados e em meio artificial contendo álcool varia entre 20 e 25 °C. Durante o processo de vinificação, 20 °C é a temperatura ideal para que ocorra o crescimento das BAL e a degradação do ácido málico. Valores inferiores atrasam e prolongam a FML, enquanto que valores superiores a 25 °C afectam a biomassa produzida e a qualidade do produto final pela maior produção de ácido acético levando à sua depreciação ou deterioração (Mesas e Alegre, 1999; Inês *et al.*, 2008).
- c) Substâncias de crescimento acessórias: bactérias pertencentes ao género *Lactobacillus* são notoriamente exigentes nos seus requisitos de crescimento. Um número de componentes minerais são essenciais para o crescimento e metabolismo de BAL como é o caso de  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$  e  $SO_4^{2-}$ . Os vinhos nem sempre contêm quantidades suficientes destes componentes, podendo provocar o retardo ou inclusivamente ausência da FML (Mesas e Alegre, 1999).
- d) Presença de açúcares fermentáveis e ácidos orgânicos: vinhos como os fortificados do Douro, contêm largas quantidades de açúcares que possam suportar um crescimento vigoroso de bactérias. A presença de determinados ácidos orgânicos, como o ácido málico ou o cítrico, pode tornar o vinho num meio mais favorável para o crescimento de estirpes que são capazes de atacar estes ácidos, desde que o pH do vinho não seja demasiado baixo (Inês *et al.*, 2008).
- e) Conteúdo de álcool nos vinhos: é de grande importância em relação aos contaminantes bacterianos. Quanto mais elevado o conteúdo de álcool, menos o vinho é sujeito ao ataque bacteriano mas é difícil determinar exactamente o nível mais elevado de tolerância. Embora algumas estirpes de BAL sejam capazes de crescer em vinhos com 20% de álcool, de forma lenta, o efeito inibitório é muitas vezes verificado a concentrações mais baixas. Portanto, vinhos contendo 20% de etanol não são imunes

ao ataque mas são atacados por menos tipos de bactérias do que vinhos que contêm 18% ou menos (Powell *et al.*, 2006). Os mecanismos da acção do álcool e as formas pelas quais certas bactérias apresentam elevados níveis de resistência ao etanol ainda não são totalmente compreendidos embora se pense que seja o resultado de modificações estruturais (composição em ácidos gordos, fosfolípidos e proteínas) e funcionais da membrana celular (Mesas e Alegre, 1999; Inês *et al.*, 2008).

- f) Dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>): o conteúdo de SO<sub>2</sub> adicionado ao vinho é importante na prevenção do crescimento bacteriano. A sensibilidade ao SO<sub>2</sub> varia com a espécie e com a estirpe. Este composto na forma livre é bastante efectivo como agente antimicrobiano (Rankine, 1989). O seu efeito bactericida é atribuído à fracção de SO<sub>2</sub> livre que entra na célula por difusão e, no seu interior, é convertida em ião bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que reage com proteínas, ácidos nucleicos e alguns cofactores, inibindo enzimas e consequentemente conduzindo à morte das células (Mesas e Alegre, 1999; Krieger, 2006; Rojo-Bezares, 2007; Inês *et al.*, 2008).
- g) Compostos fenólicos: a quantidade e natureza específica destes compostos que estão normalmente presentes no mosto e nos vinhos, podem retardar o crescimento e a produção de metabolitos bacterianos indesejados (Inês *et al.*, 2008).

A capacidade para sobreviver ou crescer sob o que normalmente seria considerado condições extremamente adversas, requer estratégias celulares específicas que são de importância fundamental para a vida microbiana em ambientes variados (Hecker e Volker, 1990).

#### **1.3.2.1. O SO<sub>2</sub> e a Lisozima**

A investigação e o desenvolvimento na indústria alimentar tem dado atenção a substâncias e tecnologias capazes de eliminar ou reduzir significativamente o uso de SO<sub>2</sub> na estabilização microbiana nos alimentos.

O SO<sub>2</sub> é tradicionalmente usado na indústria do vinho pelos muitos efeitos que produz tais como controlar a FML através da função antimicrobiana (SO<sub>2</sub> na forma molecular) e por ser antioxidante (Powell *et al.*, 2006).

Problemas de saúde, como a toxicidade em indivíduos sensíveis ou características sensoriais negativas associado ao SO<sub>2</sub> faz com que seja importante encontrar alternativas

apropriadas para eliminar ou reduzir o seu uso. Todas as tentativas para substituí-lo por outros aditivos, têm mostrado não serem eficientes.

A lisozima é capaz de combater o crescimento indesejado de BAL demonstrando ter a capacidade de satisfazer estas necessidades de substituir ou ser usada em conjugação com o SO<sub>2</sub> (Krieger, 2006).

Descoberta casualmente por Alexander Fleming em 1922, a lisozima é uma enzima que se encontra na natureza, é produzida comercialmente em larga escala a partir da clara do ovo e consiste em 129 resíduos de aminoácidos ligadas por 4 pontes dissulfito com um peso molecular de 14.6 kDa. É uma proteína com características básicas, com um ponto isoeléctrico de 10.5-11.0.

A lisozima é efectiva no ataque da parede celular de diferentes espécies bacterianas levando à lise e conseqüente morte devido à pressão osmótica interna da célula. A parede celular, em particular a componente peptidoglicano, é responsável pela rigidez da parede bacteriana. O peptidoglicano está presente na parede celular de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. A lisozima causa a degradação do peptidoglicano de certas espécies de bactérias por hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  do ácido N-acetilmurâmico e da N-acetilglucosamina. Esta hidrólise do peptidoglicano resulta na lise e morte celular em ambientes hipotónicos (Schulz *et al.*, 2003). É um produto que é mais efectivo em bactérias Gram-positivo, uma vez que, a parede celular é mais acessível. Já as bactérias Gram-negativo têm o peptidoglicano protegido pela membrana externa (Gerbaux *et al.*, 1995; Prescott *et al.*, 1996; Gill e Holley, 2000; Gill e Holley, 2003; Nattress e Baker, 2003; Krieger, 2006).

A lisozima comercial é preparada como um pó branco de elevada pureza (> 99.5% de lisozima), microcristalino, inodoro e empacotado em recipientes selados. O armazenamento, em condições secas e frescas, é bastante estável e não deve exceder os 3 anos. Quando solubilizada em água, como solução de stock, manter-se-á acima de 80% da sua actividade num período de um ano (Gao *et al.*, 2002; Delfini *et al.*, 2004).

#### **1.3.2.1.1. Aplicações da lisozima**

Muitos anos de investigação têm demonstrado que a lisozima tem uma forte actividade lítica contra as BAL. Acredita-se que esta característica desta enzima, pode ser utilizada na aplicação de alimentos e bebidas para eliminar BAL indesejadas. Especificamente, este conceito é aplicado à produção de vinho de forma a ser controlado o crescimento de espécies

como lactobacilos, responsáveis pela degradação de ácido málico (FML) e possível formação de ácidos voláteis em excesso (por exemplo, ácido acético).

A vantagem oferecida pela lisozima é não ser tóxica e não interferir com a fermentação das leveduras ao contrário do SO<sub>2</sub> que é comumente usado hoje em dia para controlar o crescimento de BAL (Gao *et al.*, 2002).

Existem três aplicações da lisozima no processamento do vinho:

- a) Inibição da FML: O nível de aplicação sugerida é 250-500 ppm dependendo das uvas, carga inicial bacteriana e pH. Contudo, a lisozima é activa e estável numa gama de pH entre 3 a 10 e tem actividade óptima num pH entre 3.5 a 7.0. A aplicação da lisozima é particularmente útil em vinhos com pH mais elevado onde a acção antibacteriana do SO<sub>2</sub> é mais limitada. De forma a maximizar os efeitos antibacterianos, a enzima deve ser adicionada o mais cedo possível. Geralmente a perda está entre 20 a 40% por um período de poucas semanas, contudo, esta perda não é prejudicial desde que a acção da lisozima seja rápida e as populações bacterianas rapidamente diminuam numa questão de dias (Gao *et al.*, 2002; Delfini *et al.*, 2004; Inês *et al.*, 2008).
- b) Controlo da extensão da FML: Esta aplicação tem o objectivo de regular a FML ao nível desejado e adiar a ocorrência da mesma.
  - I. Regular a FML a níveis desejados: Nesta aplicação, a lisozima proporciona uma ferramenta flexível para obter a FML a um grau pré-determinado de fermentação. A sua adição ao vinho em fermentação inibe um posterior crescimento de BAL. Desde que a FML esteja em curso e a população bacteriana esteja bastante elevada, a dosagem de 500 ppm é sugerida (Delfini *et al.*, 2004, Inês *et al.*, 2008).
  - II. Atrasar o começo da FML: O início da FML numa fase inicial pode comprometer o desenvolvimento desejável da FA, pela acção das bactérias nos açúcares causando um incremento de acidez volátil e perda de aromas. A utilização de lisozima após o esmagamento permite atrasar a FML até ao final da FA e assim incrementar o tempo de maceração, sem adição ou aumento da dose de SO<sub>2</sub>. O uso de lisozima a um nível de 150-200 ppm temporariamente inibirá o crescimento das BAL, permitindo o grau desejado de FA (Inês *et al.*, 2008).
- c) Estabilização microbiana após FML: Vinhos com FML completa, contém um elevado número de bactérias que, se não forem eliminadas, podem atacar outros constituintes

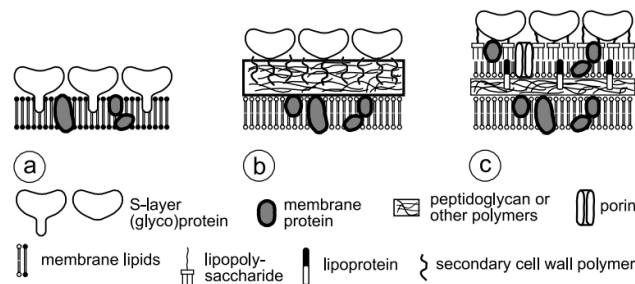
do vinho e causar defeitos tais como, viscosidade, aromas e sabores indesejados. A lisozima adicionada a um nível de 250-500 ppm pode eliminar as bactérias e proteger o vinho (Krieger, 2006; Inês *et al.*, 2008).

Do ponto de vista de aplicações práticas na produção de vinho, seria interessante compreender a variabilidade da sensibilidade em estirpes de *Lactobacillus*, que geralmente são responsáveis por graves defeitos no mosto e no vinho. Alguns estudos mostraram que a sensibilidade geral das BAL no vinho em relação à lisozima está compreendida em 250-500 ppm (Delfini *et al.*, 2004; Curvelo-Garcia, 2005). O uso desta enzima no vinho não causa mudanças significativas, química e organolepticamente mas foi observado um aumento na turbidez com a adição de 1000 ppm.

Delfini *et al.* (2004) verificaram que as BAL podem diferir na resistência à lisozima de acordo com a espécie.

#### **1.4. Proteínas de superfície (S-layers)**

As camadas cristalinas de superfície (S-layers) da célula bacteriana são compostas por proteínas ou glicoproteínas – as proteínas S, que cobrem completamente a superfície da célula. Têm sido encontradas em várias espécies de Eubacteria Gram-positivo e Gram-negativo e em quase todas as Archaeabacteria (Sleytr *et al.*, 2001; Åvall-Jääskeläinen, 2005; Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2005; Mobili *et al.*, 2008). Em algumas Archaeabacteria (a), a S-layer representa o único componente externo da membrana plasmática e frequentemente aparece integrada na camada lipídica. (b) Em bactérias Gram-positivo, e em Archaeabacteria, a S-layer está ligada à parede, que é composta principalmente por peptidoglicano ou pseudomureína, respectivamente. (c) Em bactérias Gram-negativo, a S-layer está ligada a lipopolissacarídeos (LPS), componente da membrana externa (Fig. 2).



**Fig. 2** - Ilustração esquemática da arquitetura das três maiores classes de envólucros de células procariotas contendo camadas cristalinas da superfície celular bacteriana (S-layers). (a) Estrutura do envólucro celular de Archaeabacteria com S-layer como único componente externo à membrana citoplasmática. (b) Envólucro celular como observado em Archaeabacteria e Eubacteria Gram-positivo. Em Eubacteria, a componente rígida da parede é principalmente composta por peptidoglicano. Em Archaeabacteria são encontrados outros polímeros (pseudomureína ou metanocondroitina). (c) O perfil do envólucro celular das bactérias Gram-negativo é composto por uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa. Se presente, a S-layer é associada com lipopolissacarídeos da membrana externa (Fonte: Sleytr *et al.*, 2001).

As proteínas da S-layer podem compreender mais de 20% das proteínas celulares totais sugerindo que esta grande quantidade deve ser considerada biologicamente importante para a vida bacteriana na natureza. Além disso, outro motivo que reforça o papel importante desta camada é a energia consideravelmente necessária para sintetizar esta quantidade de proteínas (Lortal *et al.*, 1992; Sleytr *et al.*, 2001; Åvall-Jääskeläinen, 2005; Frece *et al.*, 2005). A sua massa molecular em bactérias pode ir de 40 até 200 kDa. Tem normalmente 5-25 nm de espessura com uma superfície externa lisa comparada com uma superfície interna mais estruturada. O ponto isoelétrico teórico destas proteínas é fracamente ácido entre 4 e 6 (Sleytr *et al.*, 2001; Åvall-Jääskeläinen, 2005). A S-layer forma uma estrutura altamente porosa com poros de morfologia idênticos e tamanho com alguma variedade. A porosidade desta camada ocupa uma área de superfície que pode ir até 70% (Sleytr *et al.*, 2001; Åvall-Jääskeläinen, 2005).

Estudos efectuados sobre a permeabilidade demonstraram que as S-layers têm o potencial de prevenir a entrada de moléculas com massas moleculares que excedam 10 000-15 000 kDa, providenciando ao organismo uma vantagem selectiva (Lortal *et al.*, 1992).

Embora a função biológica exacta ainda seja desconhecida, as hipóteses descritas ou assumidas inclui protecção contra agentes ambientais hostis, determinar a forma celular das Archaeobacteria, mascarar propriedades da parede celular como carga e receptores de fagos, capacitar a adesão celular e reconhecimento de superfície (Lortal *et al.*, 1992; Yasui, 1995; Atlas, 1997; Sleytr *et al.*, 2001; Åvall-Jääskeläinen, 2005; Frece *et al.*, 2005; Mobili *et al.*, 2008). De facto, existindo na superfície da célula, pode-se esperar que as proteínas estejam directamente envolvidas em interacções entre a célula e o seu ambiente, muito provavelmente desenvolvidas como consequência da pressão selectiva gerada por estas interacções (Messner *et al.*, 1984; Koval, 1988; Hollmann *et al.*, 2007). Um dos papéis geralmente atribuídos a estas proteínas é a sua acção potencial como barreira física contra factores externos (Sleytr e Messner, 1983). A prevenção da libertação de moléculas da célula tem sido também proposto como papel funcional (Sleytr e Messner, 1988).

Há evidências de que bactérias portadoras de S-layer podem usar variações desta camada proteica. Estas variações devem-se à expressão de genes alternativos de proteínas S, para adaptação a diferentes factores de stress, como uma resposta imune do hospedeiro ao patogéneo e mudanças drásticas em condições ambientais para não patogénicos.

As proteínas S-layer estão presentes durante todas as fases de crescimento das bactérias e em caso de danos, regenera-se (Sleytr *et al.*, 2001; Åvall-Jääskeläinen, 2005; Frece *et al.*, 2005).

A S-layer difere consideravelmente na sua susceptibilidade à extracção da estrutura de suporte e disrupção em subunidades monoméricas. As subunidades da maioria destas proteínas interagem umas com as outras e com a camada de suporte por combinação de ligações iónicas envolvendo catiões divalentes ou interacções directas de grupos polares, ligações de hidrogénio e interacções hidrofílicas. Além disso, pequenas interacções específicas podem ocorrer entre a superfície interna da S-layer e a camada de suporte. É comum a completa desintegração das S-layers em monómeros que podem ser obtidos por tratamentos das preparações da parede celular por diferentes métodos. Têm sido utilizados agentes de desnaturação que quebrem ligações de hidrogénio com elevadas concentrações molares (ureia ou guanidine hydrochloride (GHCl)), detergentes (a pH <4.0), agentes quelantes de metais como EDTA ou ainda agentes de dissociação por substituição de catiões ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{Li}^+$  (LiCl) a substituir o  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Sleytr *et al.*, 2001; Åvall-Jääskeläinen, 2005; Frece *et al.*, 2005).

### 1.4.1. S-layer em bactérias do ácido láctico

A existência destas proteínas tem sido relatada num grande número de estirpes de várias espécies de *Lactobacillus* mas a massa molecular nestas bactérias é relativamente pequena, entre 40 e 55 kDa. Estas proteínas são geralmente não glicosiladas (Yasui, 1995; Atlas, 1997; Åvall-Jääskeläinen, 2005; Frece *et al.*, 2005; Hollmann *et al.*, 2007). Encontram-se covalentemente ligadas à parede celular, em camadas superficiais e cobrem-na completamente (Åvall-Jääskeläinen, 2005).

Comparativamente com a maioria das S-layer com natureza acídica, nas espécies de lactobacilos, as proteínas são altamente básicas com pIs entre 8 a 10 (Sleytr *et al.*, 2001; Schär-Zammaretti e Ubbink, 2003; Åvall-Jääskeläinen, 2005).

A partir de estudos efectuados sobre a permeabilidade, foi demonstrado que as S-layers previnem a entrada de moléculas que excedam determinado tamanho conferindo ao organismo vantagem selectiva. Assim, a superfície celular dos lactobacilos é capaz de adaptar a sua hidrofobicidade, capacitada por estas proteínas, em resposta a mudanças ambientais como pH ou força iónica (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2005).

## 1.5. Objectivo deste trabalho

Estudos prévios realizados na Escola Superior de Biotecnologia (ESB) da Universidade Católica Portuguesa, demonstraram que a sensibilidade de estirpes de lactobacilos (*Lactobacillus hilgardii*) à lisozima é variável. Foi observado que as estirpes mais resistentes, mesmo a concentrações acima de 500 ppm, são produtoras de S-layer. Estes resultados sugeriram que a S-layer poderia ter um papel protector contra a acção da lisozima, bloqueando ou dificultando o acesso desta enzima ao peptidoglicano.

Assim, este trabalho teve como objectivo investigar a acção da lisozima na inactivação das BAL (*Lact. hilgardii* 35 e *Lactobacillos* spp. 100) após tratamento de extracção da S-layer, de forma a analisar se esta camada proteica é responsável por lhes conferir a resistência à lisozima.

## **2. Materiais e Métodos**

- 2.1. Bactérias e condições de crescimento **26**
- 2.2. Extracção da S-layer a partir de diferentes métodos e análise da viabilidade celular **26**
- 2.3. SDS-PAGE **27**
  - 2.3.1. Preparação dos extractos proteicos **27**
  - 2.3.2. Electroforese SDS-PAGE **28**
  - 2.3.3. Visualização das bandas proteicas **29**
- 2.4. Inactivação das bactérias do ácido láctico pela lisozima **30**
  - 2.4.1. Em tampão fosfato como meio de suspensão celular **30**
  - 2.4.2. Em água estéril como meio de suspensão celular **31**
  - 2.4.3. Com adição de etanol ao meio de suspensão celular **31**
  - 2.4.4. Em vinho como meio de suspensão celular **32**

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Bactérias e condições de crescimento**

As bactérias escolhidas para realizar este trabalho foram as estirpes *Lact. hilgardii* 35 e *Lactobacillus* spp. 100 por serem produtoras de S-layer. A produção desta camada proteica foi previamente detectada por SDS-PAGE (Couto e Hogg, 1994).

Estas bactérias encontravam-se armazenadas a -80 °C em meio MRS broth (Biokar Diagnostics, Beauvis, France) contendo 30% (v/v) de glicerol.

Antes do uso experimental, os stocks foram cultivados duas vezes em meio MRS. O pH inicial deste meio foi ajustado a 4.5 com uma solução de HCl 37% antes de esterilização (121 °C, 15 min). Posteriormente, foi adicionado etanol (99.5% v/v) de forma a obter uma concentração final de 5% (v/v). A adição de etanol ao meio de cultura teve como objectivo, estimular o crescimento destes organismos.

As bactérias cresceram em culturas estáticas, até ao fim da fase exponencial (~60 h), em 100 mL de meio MRS a 30 °C.

### **2.2. Extração da S-layer a partir de diferentes métodos e análise da viabilidade celular**

De forma a analisar a presença de S-layer, sujeitaram-se as células a diferentes tratamentos de extração desta proteína com o objectivo de seleccionar o mais eficiente e que não provocasse morte celular.

As células foram recolhidas por centrifugação (10 min, 4000 × rpm), na parte final da fase exponencial (~60 h), lavadas duas vezes com água estéril e ressuspensas em 10 mL de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 M, pH 4.5 (Merk, Darmstadt, Germany). A lavagem celular foi efectuada, uma vez que se tomou em consideração o facto do meio de cultura poder comprometer a eficácia do tratamento (Delfini *et al.*, 2004).

As suspensões celulares foram sujeitas a diferentes tratamentos, especificados na tabela seguinte:

**Tabela 1.** Métodos para extracção das proteínas.

<b>Tratamentos</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Concentração</b>
Proteinase K (Frece, 2005)	30 min	37 °C	1 g/L, 10 e 100 mg/L
SDS (Matijasic, 2000)	30 min	37 °C	0.2%
LiCl (Lortal, 1992; Frece, 2005)	30 min	0 e 37 °C	2.5 e 5 M
SDS com LiCL	30 min	37 °C	0.1 ou 0.2% com 2.5 M

Todos os compostos foram obtidos da Sigma (St Louis, MO, USA). Os tratamentos foram realizados em duplicado.

Recolheram-se amostras ao longo do tempo. Estas amostras foram diluídas (diluições decimais) em solução de Ringer (Lab M, Bury, UK), plaqueadas pela técnica da gota em meio MRS broth, ajustado a pH 4.5 e suplementado com 2.5% de Agar bacteriológico (Lab M, Bury, UK). As placas foram incubadas a 30 °C durante 6-7 dias. A viabilidade foi determinada a partir de contagens das UFC/ml.

Ao fim dos 30 min, quer as células não tratadas, quer as tratadas foram centrifugadas (10 min, 4000 × rpm) e lavadas três vezes com tampão NaPBS (contendo 0.05 M de EDTA). O sobrenadante foi removido e reservou-se a biomassa a -20 °C.

## **2.3. SDS-PAGE**

### **2.3.1. Preparação dos extractos proteicos**

Para proceder à preparação dos extractos proteicos, a partir das células reservadas, pesou-se 120 mg de biomassa (húmida) à qual se adicionou 900 µL de tampão de tratamento da amostra e 20 µL de solução stock de lisozima em tubos eppendorf. Esta mistura foi incubada a 37 °C num banho, durante 2.5 h. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de solução SDS a 20% (w/v) à mistura, aquecendo-se a 95 °C durante 10 min. Seguidamente, os tubos eppendorf foram colocados em gelo para arrefecimento. Por fim, centrifugou-se 5 min a 8000

x g e recolheu-se o sobrenadante onde se encontrava as proteínas, para novos tubos eppendorf.

### 2.3.2. Electroforese SDS-PAGE

A electroforese SDS-PAGE foi executada num sistema BIO-RAD Mini-Protean® II de acordo com o método de Laemmli (1970) modificado de acordo com Kiredjin (1986), usando um gel de separação a 12% (1.5 mm) (Tabela 2) e um gel de compactação a 5% (Tabela 3) para pesos moleculares baixos.

**Tabela 2.** Preparação do gel de separação a 12% de concentração de bisacrilamida (1.5 mm). Após montagem das placas de vidro, os seguintes componentes foram misturados com um agitador magnético (volumes indicados para um gel).

H <sub>2</sub> O destilada	3.35 mL
Tampão do gel de separação (1.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.8)	2.5 mL
Solução de monómero de Acrilamida-Bis (30% T, 2.67% C)	4.0 mL
10% SDS	100 µL

Após a estabilização da mistura a 19 °C, o seguinte foi adicionado:

TEMED	5.0 µL
10% APS	50.0 µL

**Tabela 3.** Preparação do gel de compactação a 5% de concentração de bisacrilamida (1.5 mm). Os seguintes componentes foram misturados:

H <sub>2</sub> O destilada	6.1 mL
Tampão do gel de compactação (0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8)	2.5 mL
Solução de monómero de Acrilamida-Bis (30% T, 2.67% C)	1.3 mL
10% SDS	100 µL

Após o aquecimento da mistura até 19 °C, o seguinte foi adicionado:

TEMED	10.0 mL
10% APS	50.0 µL

A quantidade aplicada de amostra foi de 20 µL de cada extracto.

Estas amostras, correram verticalmente e usou-se uma corrente constante de 150 v, a 18 °C durante 1.5 h até o corante Coomassie brilliant blue migrar 105 mm através do gel de separação.

### 2.3.3. Visualização das bandas proteicas

Após o final da electrofresse, efectuou-se a fixação das proteínas, imergindo os géis durante 1 h em 10% de solução TCA.

Os géis foram tingidos durante 1 h em solução contendo 0.25% (w/v) de Coomassie brilliant blue, 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. De seguida, removeu-se o corante numa solução contendo 25% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. Os químicos usados foram todos fornecidos pela Bio-Rad excepto o SDS (Sigma), TCA e o Coomassie brilliant blue (Merk) e ainda, o ácido acético e o metanol (Pronalab, Lisboa, Portugal).

## 2.4. Inativação das bactérias do ácido láctico pela lisozima

Células tratadas (sofreram extracção da S-layer a partir do tratamento mais eficaz) e células não tratadas foram submetidas à acção da lisozima. O comportamento das células foi analisado em diferentes meios de suspensão, com diferentes concentrações de lisozima e ainda, com adição de etanol.

Devido aos resultados obtidos, apenas a bactéria *Lact. hilgardii* 35 foi utilizada na continuação das experiências.

### 2.4.1. Em tampão fosfato como meio de suspensão celular

As células, após tratamento prévio com LiCl 5 M (tratamento escolhido para prosseguir o estudo), foram centrifugadas (10 min, a 4000 x rpm) e lavadas três vezes com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.15 M, pH 4.5). Rejeitou-se o sobrenadante e o pellet foi utilizado para analisar a cinética de inactivação.

A concentração de lisozima comercial (BIOSTAR, Toledo, Spain) testada foi de 1000 e 2000 ppm em matrizes com 100 mL de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.15 M, pH 4.5) de acordo com o especificado na tabela 4.

**Tabela 4.** Experiências efectuadas para a análise da cinética de inactivação de *Lact. hilgardii* 35 pela lisozima, em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.15 M, pH 4.5).

Tratamento com LiCl 5 M	Suspensão	Lisozima (ppm)
Com tratamento	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0
		1000 e 2000
Sem tratamento		0
		1000 e 2000

Os matrizes de 100 mL com agitador magnético foram colocados num banho a 25 °C com agitação a 190 rpm. Cada experiência foi realizada em triplicado.

Ao longo do tempo, recolheram-se amostras em intervalos regulares. Procedeu-se à diluição das mesmas em solução de Ringer e plaqueou-se pela técnica da gota em meio MRS,

ajustado a pH 4.5, suplementado com 2.5% de Agar bacteriológico. As placas foram a incubar a 30 °C durante 6-7 dias.

A solução “mãe” de lisozima (20000 ppm) foi preparada adicionando 0.4 g desta enzima a 20 mL de água no próprio dia das experiências.

#### 2.4.2. Em água estéril como meio de suspensão celular

De forma a verificar se alterando o meio de suspensão celular ocorreria alguma modificação no comportamento celular quanto à cinética de inativação, testou-se a concentração de 2000 ppm de lisozima em matrizes com 100 mL de água estéril de acordo com a tabela 5.

Todo o procedimento experimental foi semelhante ao descrito em 2.4.1.

**Tabela 5.** Experiências efectuadas para análise da cinética de inativação de *Lact. hilgardii* 35 pela lisozima, em água estéril.

Tratamento com LiCl 5 M	Suspensão	Lisozima (ppm)
Com tratamento	H <sub>2</sub> O	0
		2000
Sem tratamento		0
		2000

#### 2.4.3. Com adição de etanol ao meio de suspensão celular

Seguidamente, pretendeu-se verificar o comportamento celular com a adição de 20% de etanol, ao tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.15 M, pH 4.5) e à água estéril. As diversas combinações experimentais realizadas encontram-se descritas na tabela 6.

O procedimento experimental foi realizado de acordo com o descrito em 2.4.1..

**Tabela 6.** Experiências efectuadas para análise da cinética de inactivação de *Lact. hilgardii* 35 pela lizozima, em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e em água estéril, com a adição de 20% de etanol.

Tratamento com LiCl 5 M	Suspensão	Adição
Com tratamento	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0
		2000 ppm de lizozima + 20% de etanol
	$\text{H}_2\text{O}$	0
		500 ou 2000 ppm de lizozima + 20% de etanol
		20% de etanol
	Sem tratamento	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
2000 ppm de lizozima + 20% de etanol		
$\text{H}_2\text{O}$		0
		2000 ppm de lizozima + 20% de etanol
		20% de Etanol

#### 2.4.4. Em vinho como meio de suspensão celular

Por fim, testou-se a concentração de 500 ppm de lizozima em matrizes com 100 mL de vinho do Porto. Estas experiências encontram-se descritas na tabela 7.

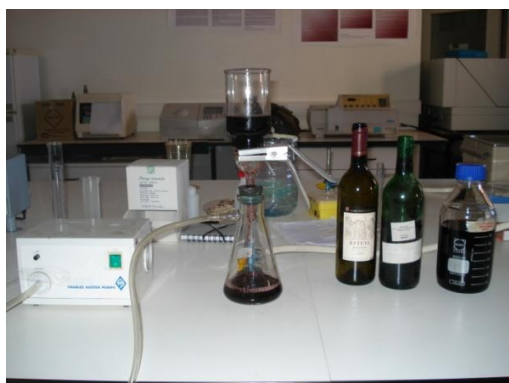
O procedimento experimental foi realizado de acordo com o descrito em 2.4.1..

**Tabela 7.** Experiências efectuadas para análise da cinética de inactivação da bactéria *Lact. hilgardii* 35 pela lisozima, em vinho do Porto.

Tratamento com LiCl 5 M	Suspensão	Lisozima (ppm)
Com tratamento	Vinho do Porto	0
		500
Sem tratamento		0
		500

O vinho fortificado foi um Porto 2001 (20 % v/v etanol). Este vinho, antes de ser utilizado, sofreu uma filtração esterilizante como se pode observar na Fig. 3. O filtro estéril utilizado tinha as seguintes características: 0.45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, da PALL Corporation, Michigan.

Todo o material e as garrafas de 1 L onde o vinho foi posteriormente armazenado, foram a esterilizar (121 °C, 15 min).



**Fig. 3** – Sistema de filtração efectuado para o vinho do Porto.

Na tabela 8, estão apresentadas todas as experiências das diferentes condições testadas para analisar a cinética de inactivação de *Lact. hilgardii* 35 a 25 °C.

**Tabela 8.** Resumo das experiências efectuadas para análise da cinética de inactivação da bactéria *Lact. hilgardii* 35 pela lisozima:

<b>Tratamento com LiCl 5 M</b>	<b>Suspensão</b>	<b>Adição</b>
Com tratamento	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0
		1000 ou 2000 ppm de lisozima
		2000 ppm de lisozima + 20% de etanol
	H <sub>2</sub> O	0
		2000 ppm de lisozima
		500 ou 2000 ppm de lisozima + 20% de etanol
		20% de etanol
	Vinho do Porto	0
		500 ppm de lisozima
Sem tratamento	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0
		1000 ou 2000 ppm de lisozima
		2000 ppm de lisozima + 20% de etanol
	H <sub>2</sub> O	0
		2000 ppm de lisozima
		2000 ppm de lisozima + 20% de etanol
		20% de Etanol
	Vinho do Porto	0
		500 ppm de lisozima

### **3. Resultados e Discussão**

- 3.1. Análise da viabilidade celular ao longo dos tratamentos de extracção da S-layer **36**
- 3.2. SDS-PAGE para verificação da eficácia da remoção da S-layer **37**
- 3.3. Verificação da resistência das bactérias do ácido láctico à lisozima **39**
  - 3.3.1. Em tampão fosfato como meio de suspensão celular **39**
  - 3.3.2. Em água estéril como meio de suspensão celular **40**
  - 3.3.3. Com adição de etanol ao meio de suspensão celular **41**
  - 3.3.4. Em vinho como meio de suspensão celular **43**

### 3. Resultados e Discussão

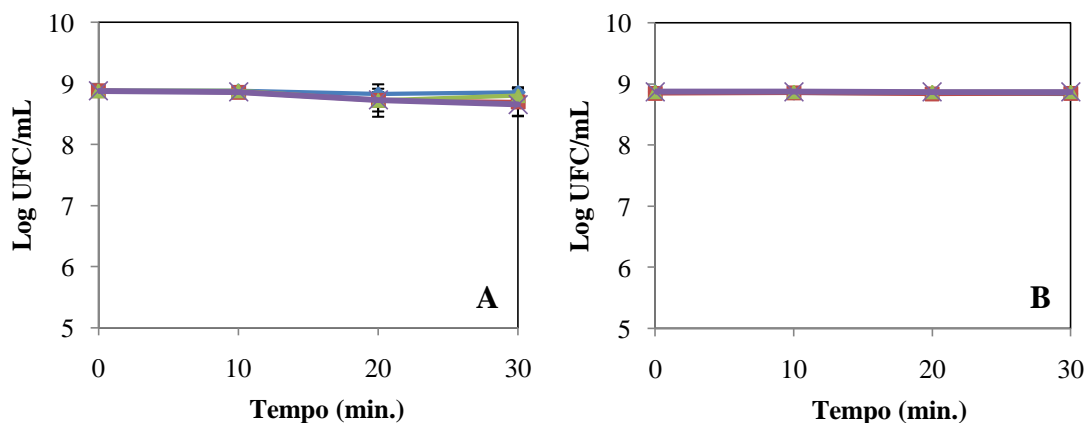
#### 3.1. Análise da viabilidade celular ao longo dos tratamentos de extração da S-layer

Em experiências prévias realizadas na ESB, verificou-se que as BAL podem diferir quanto à resistência à lizozima. Foi observado que as estirpes mais resistentes são produtoras de S-layer. A partir destes dados preliminares, pretendeu-se avaliar se a remoção da S-layer tornaria as células mais sensíveis à lizozima. Assim, o trabalho começou com a pesquisa de metodologias de extração desta camada de proteínas.

*Lact. hilgardii* 35 e *Lactobacillus* spp. 100 foram escolhidas para realizar este estudo porque são possuidoras de S-layer.

Os tratamentos testados envolveram a acção das seguintes substâncias: Proteínase K, SDS, LiCl e SDS com LiCl a diferentes concentrações.

Ao longo do tempo, foram recolhidas amostras para verificar a viabilidade celular, representada na Fig. 4.



**Fig. 4** - Análise da viabilidade de *Lact. hilgardii* 35 (Lh35) e *Lactobacillus* spp. 100 (L100) em tampão fosfato após tratamento com LiCl 5 M a (A) 0° e (B) 37 °C. (—●—) Células de Lh35 não tratadas com LiCl 5 M; (—■—) Células de Lh35 tratadas com LiCl 5 M; (—▲—) Células de L100 não tratadas com LiCl 5 M; (—×—) Células de L100 tratadas com LiCl 5 M.

Os resultados da viabilidade celular dos tratamentos com LiCl 2.5 M, Proteínase K e SDS às concentrações testadas, foram semelhantes aos da acção de LiCl 5 M acima representados, sem redução significativa do número de células (resultados não apresentados).

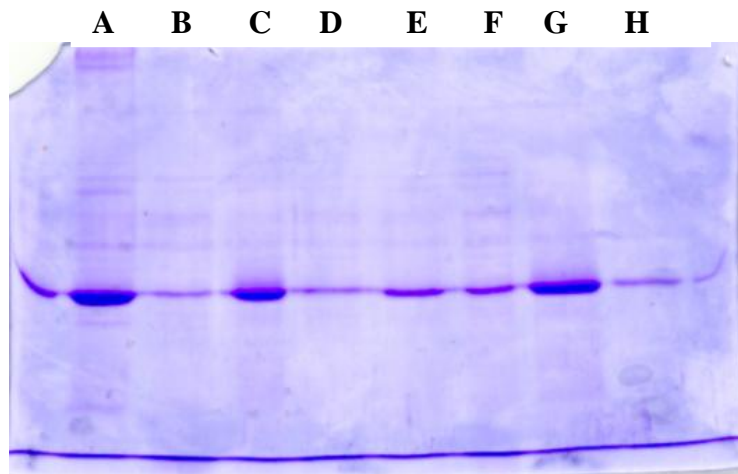
No caso da combinação de SDS com LiCl, o tratamento foi letal para as células após 10 minutos ( $\text{UFC/ml} < 5 \times 10^3$ ) (resultados não apresentados).

Os resultados mostram que todos os tratamentos, à excepção de SDS + LiCl não afectaram a viabilidade das células.

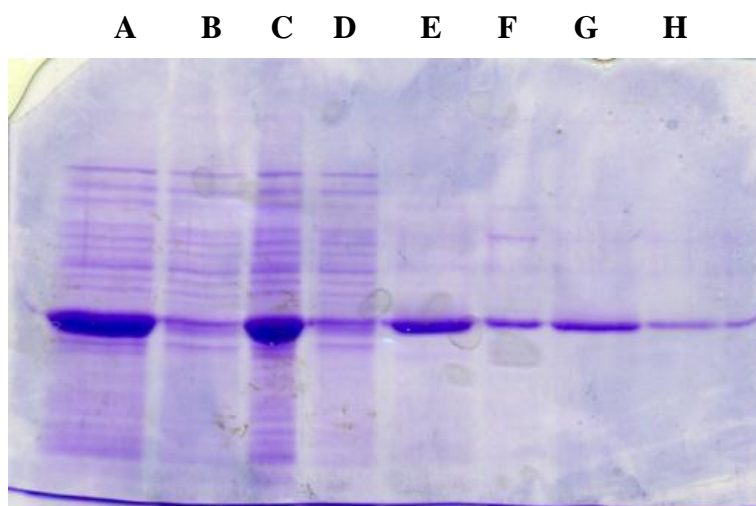
### 3.2. SDS-PAGE para verificação da eficácia da remoção da S-layer

Para verificar se a remoção da S-layer foi efectiva, realizaram-se várias electroforeses (SDS-PAGE). Para tal, foram preparados extractos proteicos de *Lact. hilgardii* 35 e *Lactobacillus* spp. 100 após os tratamentos de extracção da S-layer.

Através da análise dos géis, foi possível seleccionar os tratamentos que melhor retiraram esta camada de superfície. Assim, as bandas reveladas nas Fig. 5 e 6, confirmam a presença da proteína de superfície, sendo, normalmente, a banda dominante, correspondente a 14-20% do conteúdo total de proteínas das bactérias (Lortal, 1992; Frece, 2005).



**Fig. 5** - Detecção de proteínas de *Lact. hilgardii* 35 (Lh35) e *Lactobacillus* spp. 100 (L100) por SDS-PAGE. A: Células de Lh35 não tratadas com LiCl 5 M; B: Células de Lh35 tratadas com LiCl 5 M; C: Células de Lh 35 não tratadas com LiCl 5 M (experiência repetida); D: Células de Lh35 tratadas com LiCl 5 M (experiência repetida); E: Células de L100 não tratadas com LiCl 5 M; F: Células de L100 tratadas com LiCl 5 M; G: Células de L100 não tratadas com LiCl 5 M (experiência repetida); H: Células de L100 tratadas com LiCl 5 M (experiência repetida). Os extractos proteicos analisados provinham dos tratamentos com LiCl 5 M efectuados a 37 °C.



**Fig. 6** - Detecção de proteínas de *Lact. hilgardii* 35 (Lh35) e *Lactobacillus* spp. 100 (L100) por SDS-PAGE. A: Células de Lh35 não tratadas com LiCl 5 M; B: Células de Lh35 tratadas com LiCl 5 M; C: Células de L100 não tratadas com LiCl 5 M; D: Células de L100 tratadas com LiCl 5 M; E: Células de Lh35 não tratadas com SDS 0.2%; F: Células de Lh35 tratadas com SDS 0.2%; G: Células de L100 não tratadas com SDS 0.2%; H: Células de L100 tratadas com SDS 0.2%. Os extractos proteicos analisados provinham dos tratamentos realizados a 0 °C com LiCl 5 M e a 37 °C com SDS 0.2%.

A análise dos géis evidencia que os tratamentos com LiCl 5 M (30 min, a 0 e 37 °C) e com SDS 0.2% (30 min, a 37° C) removem total ou parcialmente a S-layer. O tratamento com o LiCl conduziu a uma diminuição da quantidade das proteínas de superfície mais significativa. Estes resultados confirmam os obtidos por Lortal *et al.* (1992) e Frece *et al.* (2005), em que descrevem o tratamento LiCl 5 M como o mais eficiente na extracção destas proteínas e sem perda de viabilidade celular.

Foram realizados ensaios com LiCl 2.5 M e observou-se que a extracção foi menor do que com 5 M (resultados não apresentados).

Em relação ao tratamento com Proteínase K, na revelação do gel, não apareceram quaisquer bandas devido, possivelmente, à degradação das proteínas em unidades de tal maneira pequenas que não foram retidos no gel da electroforese (resultados não apresentados).

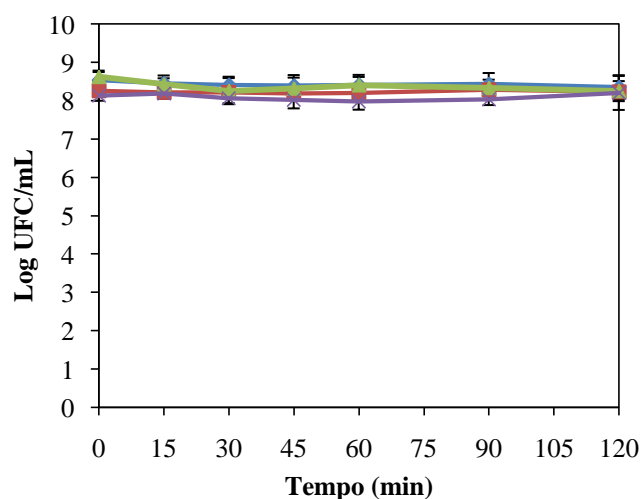
Os resultados obtidos sugerem que os tratamentos foram mais eficazes em *Lact. hilgardii* 35 do que em *Lactobacillus* spp. 100.

Assim, tendo em conta os resultados obtidos em termos de eficácia de remoção da S-layer e de preservação da viabilidade celular, optou-se por prosseguir o estudo com *Lact. hilgardii* 35 e o tratamento LiCl 5 M (30 min. a 37 °C).

### 3.3. Verificação da resistência das bactérias do ácido láctico à lisoizima

#### 3.3.1. Em tampão fosfato como meio de suspensão celular

Após o tratamento de *Lact. hilgardii* 35 com LiCl (5 M, 30 min, a 37 °C), analisou-se o comportamento celular na presença de 1000 e 2000 ppm de lisoizima em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como meio de suspensão. A partir da recolha de amostras ao longo do tempo, obteve-se o gráfico apresentado na Fig. 7. Os valores apresentados nos gráficos são médias de triplicados e as barras representam o desvio padrão.



**Fig. 7** - Viabilidade celular de *Lact. hilgardii* 35 em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a 25 °C: (●) Células não tratadas com LiCl 5 M; (■) Células tratadas com LiCl 5 M; (▲) Células não tratadas com LiCl 5 M, expostas a 2000 ppm de lisoizima; (×) Células tratadas com LiCl 5 M, expostas a 2000 ppm de lisoizima.

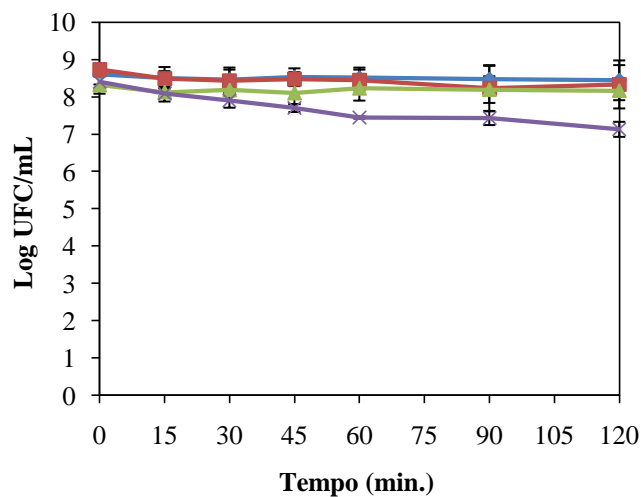
Não se apresentam os resultados referentes às experiências efectuadas com a concentração de 1000 ppm de lisoizima, uma vez que, foram semelhantes aos apresentados na Fig. 7 com 2000 ppm.

De acordo com os resultados obtidos, podemos verificar que a bactéria *Lact. hilgardii* 35 não foi inactivada, mantendo-se resistente a concentrações elevadas de lisoizima (1000 e

2000 ppm) em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  quer no caso das células que sofreram tratamento de extracção da S-layer, quer nas células não tratadas (controlos). Nestas condições, a remoção total ou parcial da S-layer não mostrou ser um factor determinante na diminuição da resistência das células à acção da lisozima.

### 3.3.2. Em água estéril como meio de suspensão celular

A bactéria *Lact. hilgardii* 35 sofreu tratamento de extracção da S-layer com LiCl (5 M, 30 min, a 37 °C) e de seguida analisou-se o comportamento celular alterando apenas o meio de suspensão, o tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por água estéril. Com a recolha de amostras ao longo do tempo, foi possível obter o gráfico apresentado na Fig. 8.



**Fig. 8** - Inativação de *Lact. hilgardii* 35 em água estéril, a 25 °C: (—●—) Células não tratadas com LiCl 5 M; (—■—) Células tratadas com LiCl 5 M; (—■—) Células não tratadas com LiCl 5 M, expostas a 2000 ppm de lisozima; (—×—) Células tratadas com LiCl 5 M, expostas a 2000 ppm de lisozima.

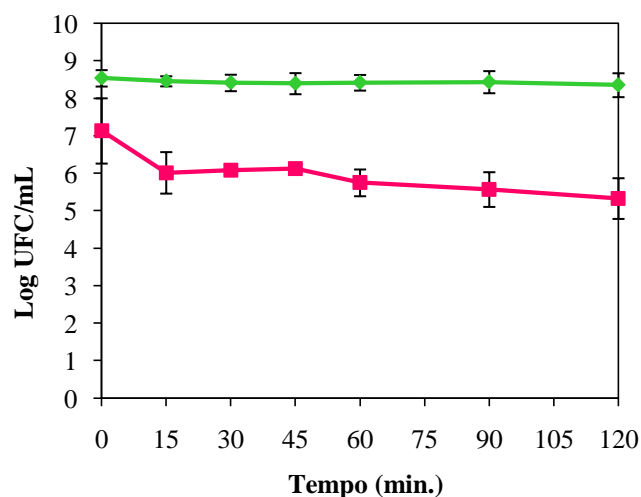
A partir destes resultados podemos observar que as células tratadas com LiCl, apresentaram alguma sensibilidade à acção da lisozima em água estéril como meio de suspensão, sofrendo uma redução de cerca de 1 ciclo logarítmico ao fim de 120 min. Os controlos usados (células não tratadas com LiCl e células tratadas não submetidas à acção da lisozima) não sofreram diminuição da viabilidade.

Os resultados indicam que parte da população de células tratadas com LiCl sofreu lise osmótica após acção da lisozima. Esta lise ocorre numa solução hipotónica (água), o mesmo

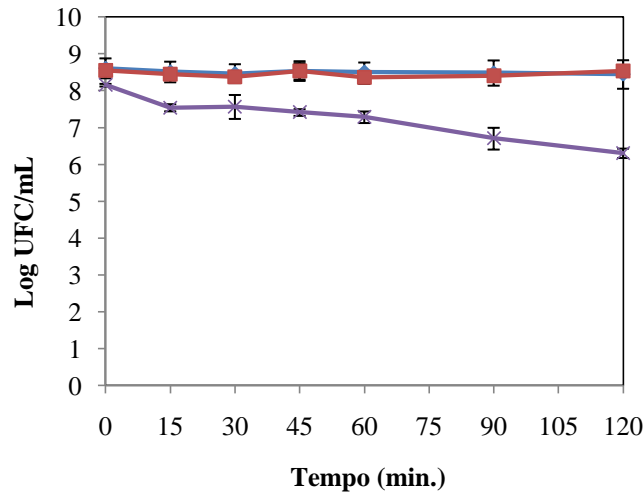
não se verificando em condições isotónicas ou ligeiramente hipertónicas provavelmente conferidas pelo tampão fosfato usado nas experiências anteriores. A lise de bactérias na presença de lisozima pode ser evitada se realizada nestas condições (Schlegel, 1993). Chassy e Giufrida (1980) testaram a influência do meio de suspensão na sensibilidade à lisozima e verificaram que o aumento da concentração do tampão diminui a eficiência de lise celular de espécies de *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com LiCl poderá facilitar a acção da lisozima tornando as células mais vulneráveis à pressão osmótica do meio conduzindo à lise celular.

### 3.3.3. Com adição de etanol ao meio de suspensão celular

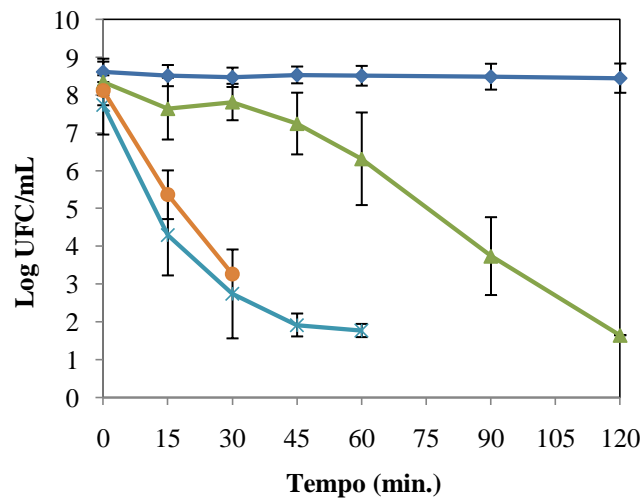
Tendo em conta que *Lact. hilgardii* 35 foi isolada do vinho pretendeu-se analisar o efeito do etanol na sua resistência à lisozima em tampão fosfato e em água estéril. Para tal, a bactéria *Lact. hilgardii* 35 foi tratada com LiCl (5 M, 30 min, a 37 °C) e sujeitou-se, posteriormente, ao contacto com etanol (20% v/v) na presença de diferentes concentrações de lisozima nos dois meios de suspensão testados – o tampão fosfato e água estéril. A partir da recolha das amostras, obtiveram-se os gráficos representados nas Fig. 9, 10 e 11.



**Fig. 9** - Inativação de *Lact. hilgardii* 35 a 25 °C em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  com 2000 ppm de lisozima e 20% de etanol: (—■—) Células não tratadas com LiCl 5 M; (—□—) Células tratadas com LiCl 5 M.



**Fig. 10** - Inativação de *Lact. hilgardii* 35 em água estéril, a 25 °C: (—◆—) Células não tratadas com LiCl 5 M; (—■—) Células não tratadas com LiCl 5 M, expostas a 20% de etanol; (—×—) Células tratadas com LiCl 5 M, expostas a 20% de etanol.



**Fig. 11** - Inativação de *Lact. hilgardii* 35 em água estéril, a 25 °C: (—◆—) Células não tratadas com LiCl 5 M; (—▲—) Células não tratadas com LiCl 5 M, expostas a 2000 ppm de lisozima e 20% de etanol; (—\*—) Células tratadas com LiCl 5 M, expostas a 500 ppm de lisozima e 20% de etanol; (—●—) Células tratadas com LiCl 5 M, expostas a 2000 ppm de lisozima e 20% de etanol.

Com a observação destes gráficos, foi possível verificar que o etanol influencia a sobrevivência das células quando expostas à lisozima, sendo a diminuição da viabilidade celular muito mais acentuada em água do que em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

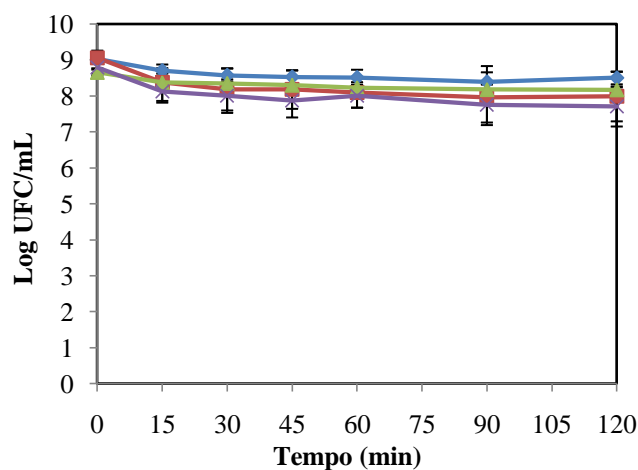
Em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , as células tratadas com LiCl (■) e expostas à acção de 2000 ppm de lisozima na presença de etanol, sofreram uma diminuição de cerca de 2 ciclos logarítmicos (Fig. 9). O etanol parece actuar como facilitador da acção da lisozima nas células previamente tratadas com LiCl.

Em relação à suspensão com água estéril, mesmo as células não tratadas com LiCl, mostraram sensibilidade à acção de 2000 ppm de lisozima na presença de etanol (▲), especialmente verificada após 45 min de exposição. As células que sofreram extracção da S-layer sofreram uma forte inactivação (superior a 6 ciclos logarítmicos) nos ensaios com lisozima a 500 (✱) e 2000 ppm (●), deixando de ser detectadas células viáveis ( $<1 \times 10^3$  UFC/mL) a partir dos 60 e 30 minutos, respectivamente (Fig. 11).

Neste estudo, o etanol aumentou a taxa de inactivação de *Lact. hilgardii* 35 durante a exposição à lisozima o que poderá estar correlacionado com os danos provocados por este na membrana celular (Dombek e Ingram, 1984; Ingram 1986). Este efeito foi claramente mais notório nas células pré-tratadas com LiCl. Ingram (1981) afirmou que a adição de etanol a soluções aquosas enfraquece as interacções hidrofóbicas, constituindo um mecanismo pelo qual o etanol poderá enfraquecer as ligações moleculares do peptidoglicano e induzir a lise celular. Neste sentido, os resultados deste trabalho indicam que o etanol contribui, juntamente com a lisozima, para a desestabilização da parede celular aumentando assim a taxa de lise. O aumento da sensibilidade de bactérias ao stress osmótico pela acção do etanol foi demonstrado em *Listeria monocytogenes* por Barker and Park (2001).

#### **3.3.4. Em vinho como meio de suspensão celular**

Por fim, extraiu-se a S-layer de *Lact. hilgardii* 35 com LiCl (5 M, 30 min, a 37 °C) e de seguida, analisou-se o comportamento celular em vinho do Porto com 500 ppm de lisozima, o limite máximo permitido em vinhos. Os resultados obtidos encontram-se representados na Fig. 12.



**Fig. 12** - Inativação de *Lact. hilgardii* 35 em vinho do Porto, a 25 °C: (—◆—) Células não tratadas com LiCl 5 M; (—■—) Células tratadas com LiCl 5 M; (—▲—) Células não tratadas com LiCl 5 M, expostas a 500 ppm de lisozima; (—×—) Células tratadas com LiCl 5 M, expostas a 500 ppm de lisozima.

É possível verificar que as células mostraram uma baixa sensibilidade à acção da lisozima mesmo num meio que contém elevado teor de etanol (20% v/v). As bactérias, tratadas ou não tratadas com LiCl, mostraram um comportamento semelhante ao dos ensaios em tampão fosfato. Os resultados indicam que os componentes do vinho poderão exercer um efeito de protecção osmótica e/ou de estabilidade da superfície celular responsável pela manutenção da viabilidade das células. Determinados componentes do vinho podem também afectar a acção bacteriolítica da lisozima, como o caso de compostos polifenólicos (Delfini *et al.*, 2004; Fugelsang e Edwards, 2007). De facto, estudos realizados mostraram que a lisozima é mais activa em vinhos brancos do que em tintos, o que pode ser reflexo do conteúdo polifenólicos (Daeschel *et al.*, 2002; Bartowsky, 2003; Henschke *et al.*, 2003). Kihm *et al.* (1994), na sequência de trabalhos realizados em leite, concluíram que o efeito protector deste relativamente a acção de inactivação da lisozima, se deve à acção de certos minerais, provavelmente através do aumento da estabilidade da superfície celular.

#### 4. Conclusões Gerais

As principais conclusões retiradas deste trabalho são:

- O meio de suspensão celular influencia a eficiência de lise das células submetidas à acção da lisozima. As células de *Lact. hilgardii* 35 submetidas à acção da lisozima numa suspensão tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  não sofreram inactivação, inclusive as que sofreram tratamento prévio de remoção da S-layer com LiCl 5 M. Quando o meio de suspensão celular foi substituído por água, a sobrevivência das células tratadas com LiCl 5 M foi afectada tendo o número de células viáveis diminuído cerca de 1 ciclo logarítmico.
- A remoção parcial ou total da S-layer torna as células mais sensíveis à acção da lisozima. Células tratadas com LiCl 5 M, posteriormente suspensas em água e submetidas à acção da lisozima + etanol sofreram uma forte inactivação (> 6 ciclos logarítmicos em 30 e 60 min, respectivamente para lisozima a 2000 e 500 ppm).
- O etanol tem um importante efeito potenciador de inactivação das células submetidas à acção da lisozima. Este efeito poderá estar relacionado com a reconhecida acção deste composto sobre a membrana celular e/ou pela interferência com as ligações moleculares no peptidoglicano induzindo a lise celular (Ingram, 1981).

## 5. Trabalho futuro

Com este estudo levantaram-se novas questões, tais como, a possível existência de outros factores nas células que conferem resistência à lisozima e encontrar um método eficaz de inactivação com este anti-bacteriano ou em possível combinação sinérgica com outros agentes. Chassy e Giuffrida (1980) verificaram nos seus estudos que a incorporação de L-treonina e L-lisina ou ambos os aminoácidos ao meio de crescimento, produziram células que são mais susceptíveis à lise por acção da lisozima nas estirpes do género *Lactobacillus* que estudaram. Estes investigadores usaram L-treonina devido a esta enfraquecer as ligações da parede celular e tornar as células mais susceptíveis à lisozima.

Neujahr *et al.* (1973) observaram que em suspensões celulares, a incubação com tripsina tornou as células em todas as fases de crescimento, sensíveis à lisozima. O efeito da tripsina é independente da presença de lisozima e vice-versa. Assim, testar a adição ou supressão de aminoácidos ao meio de crescimento pode ser um caminho para estudar outros factores de resistência destas baterias.

Delves-Broughton (1990) mencionou a utilização da nisina para controlar o crescimento de bactérias que deterioram carnes, peixes, frutas, vegetais como também a sua adição em bebidas alcoólicas por exemplo, cerveja, vinho e aguardente de frutas. Chung e Hancock (2000) concluíram que a mistura de nisina com a lisozima parece demonstrar um efeito sinérgico contra bactérias Gram-positivo e sugerem os benefícios do uso desta mistura para prevenir contaminações alimentares. Estes investigadores não conseguiram explicar precisamente o mecanismo na base do sinergismo contudo obtiveram um aumento da lise celular. Assim, o uso da nisina para o controlo das BAL indesejáveis no vinho torna-se relevante e promissor. Além disso, parece que o espectro antimicrobiano e a potencia da lisozima e da nisina pode aumentar quando usadas em combinação uma com a outra. Propõem-se então, continuar este estudo analisando o comportamento da *Lact. hilgardii* 35 no vinho com adição da lisozima e da nisina para verificar se esta bactéria é inactivada.

## 6. Referências Bibliográficas

- Åvall-Jääskeläinen, S.** (2005) Characterization and applications of *Lactobacillus brevis* S-layer proteins and evaluation of *Lactococcus lactis* as a porcine cytokine producer, University of Helsinki: Department of Basic Veterinary Sciences, Available from: Division of Microbiology and Epidemiology.
- Barker, C. and Simon F. P.** (2001) Sensitization of *Listeria monocytogenes* to Low pH, Organic Acids, and Osmotic Stress by Ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4):1594-1600
- Bartowsky, E.** (2003) Lysozyme and winemaking. *Aust. NZ Grapegrower Winemaker* (473a): 101-104
- Chassy, B.M. and Giuffrida, A.** (1980) Method for the lysis of gram-positive, *Asporogenous* bacteria with lysozyme, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 39, N° 1, p. 153-158
- Chung, W. and Hancock, R.E.W.** (2000) Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 60, 25-32
- Costello, P.** (2006) *Il Biochimismo della Fermentazione Malolattica, La Fermentazione Malolattica del Vino, Selezionati dalla natura*, Lallemand, 4:1
- Costello, P.J., Morrison, G.J., Lee, T.H. and Fleet, G.H.** (1983) Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technhology in Australia*, vol. 35 (1), 14-18
- Couto, J.A.** (1996) Studies on the diversity, taxonomy and physiology of ethanol tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine. PhD, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.
- Couto, J.A. and Hogg, T.A.** (1994) Diversity of ethanol-tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine: clustering and identification by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 487-491

**Cox, D.J. and Henick-Kling, T.** (1990) A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:215-218

**Cox, D.J. and Henick-Kling, T.** (1989) Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *Journal of Bacteriology* 171: 5750-5752

**Curvelo-Garcia, A.S.** (2005) Práticas Enológicas Internacionalmente Reconhecidas. *Ciência Téc. Vitiv.* 20 (2), 105-130

**Daeschel, M.A., Jung, D. and Watson, B.T.** (1991) Controlling Wine Malolactic Fermentation with Nisin and Nisin-Resistant Strains of *Leuconostoc oenos*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no 2, p. 601-603

**Delfini, C., Cersosimo, M., Prete, V.D., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A. and Ambrò, S.** (2004) Resistance Screening Essay of Wine Lactic Acid Bacteria on Lysozyme: Efficacy of Lysozyme in Unclarified Grape Musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

**Delves-Broughton, J.** (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, Chicago, v. 44, n.11, p.100-117

**Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J.** (2004) New preservation technologies: Possibilities and limitations, *International Dairy Journal*, 14, 273-285

**Dombeck, K.M. and Ingram, L.O.** (1984) Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *Journal of Bacteriology*, 157, 233-239

**Fornachon, J.** (1949) *Bacterial Spoilage of Fortified Wines*. Australia: The griffin press

**Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrsa, V. and Suskovic, J.** (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 285-292

**Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G.** (2007) *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*, second edition, Springer, p.72

**Gao, Y.C., Zhang, G., Krentz, S., Darius, S., Power, J. and Lagarde, G.** (2002) Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 76-83

**Gerbaux V., Villa A., Monamy C. and Bertrand A.** (1997) Use of Lysozyme to Inhibit Malolactic Fermentation and to Stabilize Wine After Malolactic Fermentation. Volume 48, *American Society for Enology and Viticulture*.

**Gill, A.O. and Holley, R.A.** (2003) Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C, *International Journal of Food Microbiology*, 80, 251-259

**Gill, A.O. and Holley, R.A.** (2000) Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA, *Food Research International*, 33, 83-90

**Gini, B. and Vaughn, R.** (1962) Characteristics of some bacteria associated with the spoilage of Californian dessert wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 13:20-31

**Henick-Kling, T.** (1995) Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. Board, R. G., D. Jones, and B. Jarvis (Eds) *Microbial fermentations: beverages, foods and feeds*. Society for applied bacteriology symposium series No. 24. Blackwell Science. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement* 79:29S-37S

**Hollmann, A., Delfederico, L., Glikmann, G., Antoni, G., Semorile, L. and Disalvo, E.A.** (2007) Characterization of liposomes coated with S-layer proteins from lactobacilli, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 393-400

**Inês, A., Tenreiro, T., Tenreiro, R. and Mendes-Faia, A.** (2008) Review: Wine Lactic Acid Bacteria – part I, *Ciência Técn.Vitiv.*, 23 (2) 81-96

**Ingram, I.O.** (1986) Microbial tolerance to alcohol: role of the cell membrane. *Trends in Biotechnology* 4, 4W4.

**Ingram, I.O.** (1981) Mechanism of Lysis of *Escherichia coli* by Ethanol and Other Chaotropic Agents. *Journal of Bacteriology*, 461, 331-336

**Jamuna, M., Babusha, S.T. and Jeevaratnam, K.** (2005) Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems, *Food Microbiology*, 22, 449-454

**Kandler, O.** (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49:209-224.

**Kandler, O. and Weiss, N.** (1986) Genus *Lactobacillus*. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins, Baltimore. 1208-1234.

**Kihm, D.J., Leyer, G.J., An, G.-H. and Johnson, E.A.** (1994) Sensitization of Heat-Treated *Listeria monocytogenes* to added Lysozyme in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 3854-3861.

**Krieger, S.** (2006) La Storia dei Batteri Malolattici nel Vino – Uno Sguardo al Futuro, *La Fermentazione Malolattica del Vino, Selezionati dalla natura, Lallemand*, 3:1

**Lortal, S., Heijenoort, J.V., Gruber, K. and Sleytr, U.B.** (1992) S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride, *Journal of General Microbiology*, 138, 611-618

**Matijasic, B.B. and Rogelj, I.** (2000) *Lactobacillus* K7 - A New Candidate for a probiotic Strain, *Food Technol. biotechnol*, 38 (2) 113-119

**Melo, N.R., Soares, N.F.F. and Gonçalves, M.P.J.C.** (2005) Nisina: Um conservante natural para alimentos, *Revista Ceres*, 52(303):921-938

**Mesas, J.M. and Alegre, M.T.** (1999) The role of the microorganisms in winemaking, *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol. 2, No. 4, pp. 174-183

**Mobili, P., Londero, A., Maria, T.M.R., Eusébio, M.E.S., Antoni, G.L. and Fausto, R.** (2008) Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Vibrat. Spectrosc.*, doi:10.1016

**Nattress, F.M. and Baker, L.P.** (2003) Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork, *International Journal of Food Microbiology*, 85, 259-267

**Neujahr, H.Y., Borstad, B. and Logardt, I.** (1973) Factors Affecting the Resistance of *Lactobacillus fermenti* to Lisozime, *Journal of Bacteriology*, vol. 116, N° 2, p. 694-698

**Powell, C, Van Zandycke, S. and Degré, R.** (2006) La Microbiologia della Fermentazione Malolattica, *La Fermentazione Malolattica del Vino, Selezionati dalla natura, Lallemand*, 5:1

**Prescott, Lansing M., Harley, John P., Klein and Donald A.** (1996) *Microbiology*, third edition, WCB, E.U.A.

**Rankine, B.C. and Bridson, D.A.** (1971) Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malolactic fermentation. *Australian Wine, Brewing and Spirit Review*. 20:44-51

**Rosa, C.M. and Franco, B.D.G.M.** (2002) Bacteriocinas de bactérias lácticas, *ConSCIENTIAE saúde*, v.1:09-15

**Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C.** (2002) Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16

**Ruiz-Larrea, F., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Diéz, L., Portugal, C.B., Zarazaga, M. and Torres, C.** (2007) Bacteriocins for wine microbiological control and reduction of SO<sub>2</sub> levels, *Le Bulletin de l'OIV*, 80 (917-919), pp. 445-457

**Schär-Zammaretti, P. and Ubbink, J.** (2003) The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations, *Biophysical Journal*, v. 85, 4076–4092

**Schlegel, H. G.** (1993) *General Microbiology*, 7th edition. Cambridge University Press

**Schulz, D., Pereira, M.A., Bonelli, R.R., Nunes, M.M. and Batista, C.R.V.** (2003) Bacteriocinas: Mecanismo de acção e uso na conservação de alimentos, *Alim. Nutr.*, v. 14, n.2, p. 229-235.

**Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D. and Schuster, B.** (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers, *Progress in Surface Science*, 68, 231-278

**Sobrinho-López, A. and Martín-Belloso, O.** (2008) Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products, *International Dairy Journal*, 18, 329-343

**Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H.J., van der Mei, H. C., Vries, J. and Norde, W.** (2005) Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41, 33-41

**Yasui, T., Yoda, K. and Kamyia, T.** (1995) Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*, *FEMS Microbiology Letters*, 133, pp. 185-186.