

ISOLAMENTO DE MUTANTES DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 COM TOLERÂNCIA ACENTUADA AO CONGELAMENTO E EFEITO DE SUBSTÂNCIAS CRIOPROTETORAS NA SUA VIABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM

ELIANA DOS SANTOS LEANDRO *
LISIANE LOPES DA CONCEIÇÃO **
ANTÔNIO FERNANDES DE CARVALHO ***
MAURÍCIO DUTRA COSTA ****
CÉLIA ALENCAR DE MORAES *****

O objetivo deste estudo foi obter estirpes mutantes de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com tolerância acentuada ao congelamento e também avaliar o efeito de substâncias crioprotetoras na sua viabilidade durante a estocagem. A utilização dos crioprotetores sacarose, glutamato monossódico (GMS) e leite desnatado reconstituído a 10 % (LDR) aumentaram a viabilidade de estirpes mutantes durante 15 dias de estocagem a -20 °C em relação ao controle (sem crioprotetor). Os crioprotetores sacarose e LDR 10 % foram efetivos na manutenção da viabilidade da estirpe selvagem durante o período de estocagem. Embora a tolerância ao congelamento tenha sido alcançada, estudos posteriores são necessários para avaliar se outras características que qualificam *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 como probiótico foram afetadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; CRIOPROTETORES; MUTANTES; CONGELAMENTO - TOLERÂNCIA.

- * Doutora em Microbiologia Agrícola, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG (e-mail: elisanleandro@yahoo.com.br).
- ** Mestre em Microbiologia Agrícola, Departamento de Microbiologia, UFV, Viçosa, MG (e-mail: lisianelopes@yahoo.com.br).
- *** Pós-Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Professor, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa, MG (e-mail: antoniofernandes@ufv.br).
- **** Professor, Departamento de Microbiologia, UFV, Viçosa, MG (e-mail: mcosta@ufv.br).
- ***** Professora, Departamento de Microbiologia, UFV, Viçosa, MG (e-mail: camoraes@ufv.br).

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas recebem a denominação de probióticos (REID *et al.*, 2003). Tais micro-organismos devem ser seguros e capazes de sobreviver às condições de processamento industrial e estocagem, além das várias condições de estresse impostas durante o trânsito através das diferentes partes do trato gastrointestinal do consumidor até atingirem o seu sítio de ação (ANDERSON *et al.* 2010; BRON e KLEEREBEZEM, 2011).

O *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi isolado a partir de fezes de criança alimentada exclusivamente com leite materno (SANTOS, 1984). Essa estirpe é homofermentativa, catalase negativa, Gram-positiva, com temperatura de crescimento entre 15 °C e 37 °C, produtora de substâncias antimicrobianas (como o peróxido de hidrogênio) em quantidades suficientes para inibir o crescimento de patógenos e de deterioradores de alimentos (SANTOS, 1984; RIBEIRO, 1995; MONTEIRO, 1999). Essa estirpe apresenta características fisiológicas, tecnológicas, imunológicas e genéticas desejáveis à probiose em razão de sua capacidade de tolerância às condições gastrointestinais simuladas: ácido clorídrico, sais biliares, lisozima, e ao estresse oxidativo (AGOSTINHO 1988; SILVA, 2007; LEITE, 2008; FLORESTA, 2008; FERREIRA, 2011).

Dentre os aspectos tecnológicos que devem ser observados em estirpes probióticas encontra-se a resistência aos processos de liofilização e congelamento, que visam manter a viabilidade desses micro-organismos durante longo período de estocagem (MENG *et al.*, 2008). No Brasil, as culturas lácticas utilizadas na produção de queijos e iogurtes são fornecidas às indústrias de laticínios na forma liofilizada. Embora esse processo seja utilizado para conservação da viabilidade das culturas probióticas, os danos causados as células são mais acentuados que no congelamento rápido (MENG *et al.*, 2008).

Para aumentar a sobrevivência das bactérias do ácido láctico durante a liofilização ou congelamento, alguns tratamentos podem ser adotados, como a utilização de substâncias crioprotetoras com a função de proteger as células dos danos ocasionados pelo congelamento (ZHAO e ZHANG, 2005). Embora esse procedimento aumente a viabilidade das células, a estabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante o período de estocagem tem sido comprometida, fato também observado em outras estirpes probióticas. A resistência aumentada a processos de congelamento ou liofilização torna-se importante quando estirpes probióticas são utilizadas como culturas *starter*, impedindo que ocorra acidificação lenta do alimento, que pode comprometer sua qualidade sensorial e microbiológica.

Este trabalho teve como objetivo obter estirpes mutantes de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com tolerância acentuada ao congelamento e também avaliar o efeito de substâncias crioprotetoras na sua viabilidade durante a estocagem.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

Obteve-se a cultura estoque de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após crescimento em meio MRS (De MAN ROGOSA e SHARPE, 1960) a 37 °C por 12 horas. O concentrado de células obtido foi adicionado de glicerol 20 % (v/v), congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C. Todos os experimentos foram realizados a partir dessa cultura estoque.

2.2 MUTAÇÃO COM ACRIDINA LARANJA

Inoculou-se alíquota de 100 µL da cultura de *L. delbrueckii* UFV H2b20 padronizada para 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC mL⁻¹) em 3 mL de meio MRS acrescido de acridina laranja, em concentração final selecionada de 50 µg mL⁻¹. Incubou-se a cultura a 37 °C por

18 horas (ARSHAD *et al.*, 2005).

2.3 MUTAÇÃO COM ETIL METANO SULFONATO

A cultura de *L. delbrueckii* UFV H2b20 cultivada em 5 mL de meio MRS a 37 °C por 12 horas foi centrifugada (8000 *g* a 4 °C por 10 minutos) e ressuspensa em 2,5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5) e em 2,5 mL da solução estoque de etil metano sulfonato (0,1 mL de etil metano sulfonato em 2,4 mL tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5). Incubou-se essa suspensão de células à temperatura ambiente por 2 horas sob agitação (150 rpm). Após a centrifugação e ressuspensão em tampão fosfato de potássio, alíquota de 1 mL dessa suspensão foi diluída em 9 mL de caldo MRS e incubada a 37 °C por 14 horas (IBRAHIM e O'SULLIVAN, 2000).

2.4 TRIAGEM DE MUTANTES

As suspensões de células tratadas com os agentes mutagênicos foram congeladas e estocadas a -20 °C por 10 dias. Após o período de estocagem, as culturas foram descongeladas em temperatura ambiente e colocadas em placas com ágar MRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e aquelas que apresentaram colônias isoladas utilizadas para realização da triagem de mutantes com tolerância aumentada ao congelamento. Nessas placas, 10 colônias de cada tratamento com o agente mutagênico foram selecionadas para serem posteriormente caracterizadas. Os estoques desses mutantes, efetuados em caldo MRS adicionado de 20 % de glicerol, foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

2.5 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA

Os 20 mutantes de *L. delbrueckii* UFV H2b20, obtidos por diferentes agentes mutagênicos, foram cultivados em caldo MRS e incubados a 37 °C por 12 horas. As culturas de todos os mutantes foram padronizadas para 10⁸ UFC mL⁻¹ e diluídas em solução salina 0,85 % (p/v) para 10⁶ UFC mL⁻¹. Alíquotas de 150 µL das culturas padronizadas foram adicionadas em 150 µL de caldo MRS em cada pocinho da placa de microdiluição (Nunc-Immuno™ plates). Incubou-se a placa a 37 °C e acompanhou-se o crescimento das culturas pela medida de absorbância, utilizando o comprimento de onda de 600 nm (DEVIANNE e RADDI, 2002). As leituras de densidade óptica foram convertidas em valores logarítmicos neperianos e a velocidade específica de crescimento determinada a partir do coeficiente angular do melhor ajuste da regressão linear dos dados na fase de crescimento exponencial das culturas.

2.6 SELEÇÃO DE MUTANTES

Testaram-se as estirpes mutantes de *L. delbrueckii* UFV H2b20 quanto à susceptibilidade a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento. As células foram cultivadas em caldo MRS e incubadas a 37 °C por 12 horas, sendo 1 mL dessas culturas congelado a -20 °C. Após 14 horas de congelamento, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente. Determinou-se o número de células viáveis mediante contagem em placa pelo método de plaqueamento em microgota, seguida de incubação a 37 °C por 24 h. Repetidos congelamentos e descongelamentos foram realizados num total de três tempos com intervalos de 14 horas. As estirpes selecionadas após os tratamentos mutagênicos e que apresentaram maior tolerância a repetidos congelamentos e descongelamentos que a estirpe selvagem foram consideradas mutantes com tolerância aumentada ao congelamento (MONNET, BÉAL e CORRIEU, 2003).

2.7 TRATAMENTOS COM SUBSTÂNCIAS CRIOPROTETORAS

As estirpes mutantes selecionadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20, bem como a estirpe

selvagem foram cultivadas em 60 mL de caldo MRS e incubadas a 37 °C por 12 horas. Efetuou-se a padronização das suspensões de células na fase estacionária para 10⁸ UFC mL⁻¹. As culturas foram coletadas por centrifugação (10.000 g, 10 min a 4 °C) e o sedimento obtido ressuspensionado em 20 mL de caldo MRS (AGOSTINHO, 1988). As suspensões de células, divididas em alíquotas de 150 µL, foram diluídas com 150 µL dos seguintes crioprotetores nas respectivas concentrações finais: sacarose 32 % (p/v), glutamato monossódico (GMS) a 10 % (p/v) e leite desnatado reconstituído (LDR) a 10 % (p/v). Utilizou-se água destilada como controle para avaliar o efeito protetor de cada solução. As misturas foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -20 °C por 15 dias.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Adotou-se para a condução dos experimentos delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), sendo empregados os testes de médias Scott-Knott e Tukey ao nível de 5 % de significância, usando-se o programa SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética) (EUCLYDES, 1983).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO DE MUTANTES COM ACRIDINA LARANJA

Os resultados da avaliação da velocidade específica de crescimento e de sobrevivência de estirpes mutantes de *L. delbrueckii* UFV H2b20, obtidas por tratamento com acridina laranja, a ciclos de congelamento e descongelamento constam da Tabela 1.

TABELA 1 - VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA A CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO DE *L. delbrueckii* UFV H2b20 E DE SUAS ESTIRPES MUTANTES OBTIDAS POR TRATAMENTO COM ACRIDINA LARANJA

Estirpe	μ (h ⁻¹)	Sobrevivência (%)
Selvagem	0,5061 A	0,00 F
MAC 1	0,4684 C	70,00 B
MAC 2	0,4620 E	69,66 B
MAC 3	0,4680 C	64,00 D
MAC 4	0,4684 C	72,00 A
MAC 5	0,4684 C	67,50 C
MAC 6	0,4981 B	72,28 A
MAC 7	0,4684 C	67,50 C
MAC 8	0,4660 D	60,62 E
MAC 9	0,4680 C	68,86 B
MAC 10	0,4684 C	71,26 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

A velocidade de crescimento das estirpes mutantes mostrou-se significativamente menor ($p > 0,05$) que a da estirpe selvagem, sendo a velocidade específica de crescimento do mutante

MAC6 menos afetada em relação aos demais. No entanto, foram obtidas estirpes mutantes com maior tolerância a ciclos de congelamento e descongelamento que a estirpe selvagem (incapaz de sobreviver a essas condições). Dentre as estirpes mutantes, a MAC6 apresentou maior tolerância aos ciclos de congelamento e descongelamento. A acridina laranja causa a inserção ou deleção de um ou mais pares de bases (PASSAGLIA, 2003) e a alteração no DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 pode ter possibilitado maior tolerância das estirpes mutantes aos ciclos de congelamento e descongelamento. Esse mutagênico já demonstrou eficácia na obtenção de mutantes de *Bacillus* sp. A47 com melhor capacidade de sintetizar metabólitos com atividade antibiótica que a estirpe parental (BERNAL, ILLANES e CIAMPI, 2002). O mesmo resultado foi observado com mutantes de *Escherichia coli*, constatando-se maior produtividade de penicilina G acilase em comparação à estirpe parental (ARSHAD *et al.*, 2005).

3.2 OBTENÇÃO DE MUTANTES COM ETIL METANO SULFONATO

Os resultados da avaliação da velocidade específica de crescimento e de sobrevivência de estirpes mutantes de *L. delbrueckii* UFV H2b20, obtidas por tratamento com etil metano sulfonato, a ciclos de congelamento e descongelamento são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA A CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 E DE SUAS ESTIRPES MUTANTES OBTIDAS POR TRATAMENTO COM ETIL METANO SULFONATO

Estirpe	μ (h ⁻¹)	Sobrevivência (%)
Selvagem	0,5061 A	0,00 C
MEMS 1	0,4565 D	65,00 B
MEMS 2	0,4868 B	72,54 A
MEMS 3	0,4530 E	70,00 A
MEMS 4	0,4620 C	70,00 A
MEMS 5	0,4568 D	66,50 B
MEMS 6	0,4568 D	69,00 A
MEMS 7	0,4562 D	70,54 A
MEMS 8	0,4559 D	65,30 B
MEMS 9	0,4564 D	65,00 B
MEMS 10	0,4568 D	70,13 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Os resultados observados com as estirpes mutantes obtidas com acridina laranja mostraram-se semelhantes aos das estirpes mutantes tratadas com etil metil sulfonato. A estirpe mutante MEMS2 apresentou maior velocidade específica de crescimento e também maior tolerância aos ciclos de congelamento e descongelamento que os demais mutantes. O mutagênico etil metano sulfonato provoca alquilação das bases adenina e guanina resultando em bases metiladas que alteram o pareamento entre as bases, causando maior distorção na hélice (PASSAGLIA, 2003). Essa alteração na molécula de DNA mostrou-se adequada para obtenção de estirpes mais resistentes ao congelamento. Estirpes mutantes de *Bifidobactéria* e *Lactobacillus*, obtidas com esse mutagênico, passaram a apresentar produção aumentada da enzima β -galactosidade em relação à estirpe selvagem (IBRAHIM e O' SULLIVAN, 2000).

3.4 EFEITO DE SUBSTÂNCIAS CRIOPROTETORAS

As estirpes mutantes MAC6 e MEMS2, pelo fato de terem apresentado maior tolerância aos ciclos de congelamento e descongelamento, foram selecionadas para se avaliar o efeito de substâncias crioprotetoras na sua viabilidade durante o período de 15 dias de estocagem a -20 °C. A utilização de substâncias crioprotetoras acentuou a sobrevivência de estirpes mutantes durante esse período, conforme pode ser observado na Figura 1.

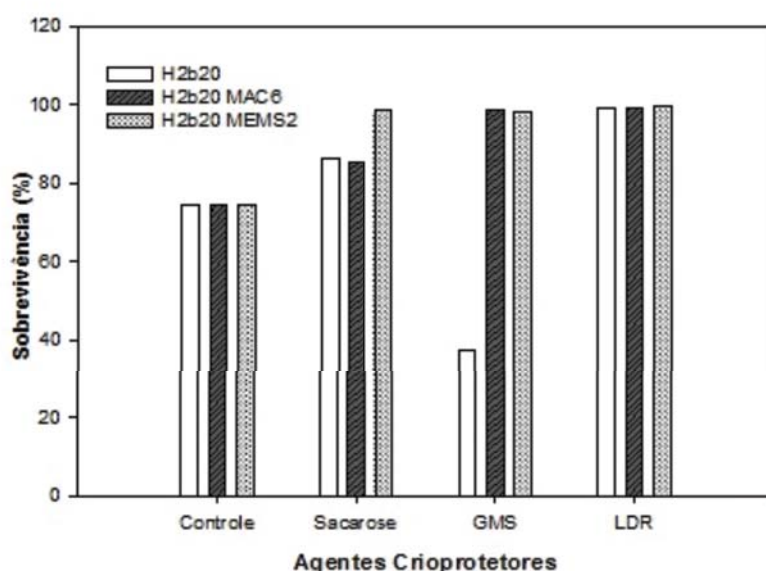


FIGURA 1 - EFEITO DE SUBSTÂNCIAS CRIOPROTETORAS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE *L. delbrueckii* UFV H2b20, *L. delbrueckii* UFV H2b20 MAC6 e *L. delbrueckii* UFV H2b20 MEMS2 DURANTE 15 DIAS A -20 °C

A sacarose conferiu, de acordo com o teste de Tukey, proteção significativamente maior ($p > 0,05$) ao mutante MEMS2, característica que permite diferenciar essa estirpe da selvagem e do mutante MAC6. Esse efeito protetor conferido pela sacarose tem sido atribuído à sua capacidade de atuar como agente antioxidante durante o período de estocagem de bactérias (SANTIVARANGKNA, HIGL e FOERST, 2008). Embora as substâncias crioprotetoras sejam utilizadas para melhorar a sobrevivência de bactérias durante o período de estocagem, o uso de concentrações que ocasionem estresse osmótico na célula podem afetar sua sobrevivência. Esse resultado foi observado com a estirpe selvagem na presença de glutamato monossódico (GMS), sendo sua sobrevivência menor que na ausência da substância crioprotetora. Deve-se salientar que tal fato não ocorreu com as estirpes mutantes. Já a utilização do leite desnatado reconstituído a 10 % (LDR) mostrou-se efetiva, tanto para as estirpes mutantes quanto para a selvagem. A proteção acentuada do LDR pode ser devida à ação dos diferentes componentes do leite na estrutura da célula, conferindo assim maior proteção.

4 CONCLUSÃO

A seleção de estirpes probióticas com maior tolerância ao congelamento torna-se importante para indústria de laticínios na obtenção de produtos lácteos com melhor qualidade sensorial e microbiológica. O uso dos agentes mutagênicos acridina laranja e etil metano sulfonato permitiu a obtenção de estirpes mutantes com maior tolerância ao congelamento. Embora o objetivo de

acentuar a tolerância ao congelamento ter sido alcançado, estudos posteriores são necessários para avaliar se outras características que qualificam *L. delbrueckii* UFV H2b20 como probiótico foram afetadas.

ABSTRACT

ISOLATION OF MUTANTS OF *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 WITH ACCENTUATED TOLERANCE TO FREEZING OF CRYOPROTECTANT SUBSTANCES EFFECT ON ITS VIABILITY DURING STORAGE

The objective of this study was to obtain mutant strains of *L. delbrueckii* UFV H2B20 with marked tolerance to freezing and also evaluate the effect of cryoprotectant substances in viability during storage. The use of cryoprotectant sucrose, monosodium glutamate and reconstituted skimmed milk (RSM) at 10 % increased the viability of mutant strains for 15 days of storage at -20 °C compared to control (without cryoprotectant). The cryoprotectants sucrose and RSM 10 % were effective in maintaining the viability of the wild type strain during storage. Although freezing tolerance was achieved, it is necessary to assess whether other characteristics that would qualify *L. delbrueckii* UFV H2B20 as probiotic were not affected.

KEY-WORDS: *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20; CRYOPROTECTANTS; MUTANTS; FREEZING.

REFERÊNCIAS

- 1 AGOSTINHO, M.M.S. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo “in vitro” e efeito de métodos de preservação de sua atividade.** 1988. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.
- 2 ANDERSON, R.C.; COOKSON, A.L.; MCNABB, W.C.; KELLY, W.J.; ROY, N.C. *Lactobacillus plantarum* DSM2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.309, n.2, p.184-192, Aug. 2010.
- 3 ARSHAD, R.; FAROOQ, S.; IQBAL, N.; ALI, S.S. Mutagenic effect of acridine orange on the expression of penicillin G acylase and β -lactamase in *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, n.2, p.94-101, Feb. 2005.
- 4 BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, LUIGI. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Journal of Biotechnology**, v.5, n.1, p.1-10, Apr. 2002.
- 5 BRON, P. A.; KLEEREBEZEM, M. Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. **Bioengineered Bugs**, v.2, n.2, p.80-87, Mar./Apr.2011.
- 6 DE MAN, J.D.; ROGOSA, M.A.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **J. Appl. Bact.**, v.23, p.130-135, 1960.
- 7 DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, p.166-168, Mar. 2002.
- 8 EUCLYDES, R.F. **Sistema para análise estatísticas e genéticas (SAEG).** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 74 p.
- 9 FERREIRA, A.B. **Respostas fisiológicas e moleculares de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 aos estresses ácido e por sais biliares.** 2011. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- 10 FLORESTA, A.F. **Características de superfície de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 probiótico.** 2008. 107 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- 11 IBRAHIM, S.A.; O’SULLIVAN, D.J. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade β -galactosidase over producing mutants of *Bifidobacteria*, Lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*. **Journal Dairy Science**, v.83, n.5, p.923-930, May 2000.
- 12 LEITE, M.C.T. **Identificação, caracterização e análise da expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** 2008. 141 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- 13 MENG, X.C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; DALY, C.; ROSS, R.P. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v.106, n.4, p.1406-1416, Feb.2008.
- 14 MONNET, C.; BÉAL, C.; CORRIEU, G. Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to freezing by natural selection. **J. Dairy Science**, v.86, p.3048-3053, 2003.

- 15 MONTEIRO, R.C.B. **Resposta ao estresse térmico em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1999. 59 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- 16 PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia molecular básica**. 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. p.149-178.
- 17 REID, G.; SANDERS, M.E.; GASKINS, H.R.; GIBSON, G.R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T.R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **J. Clinical Gastroenterol.**, v.37, n.2, p.105-118, Ago.2003.
- 18 RIBEIRO, M.A. **Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.
- 19 SANTIVARANGKNA, C.; HIGL, B.; FOERST, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. **Food Microbiology**, v.25, n.3, p.429-441, May 2008.
- 20 SANTOS, N.S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético**. 1984. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.
- 21 SILVA, D.F. **Filogenia molecular e genômica comparativa de bactérias gram-positivas do trato gastrointestinal**. 2007. 107 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- 22 ZHAO, G.; ZHANG, G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. **Journal Applied Microbiology**, v.99, p.333-338, Jan.2005.