

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados
de processos industriais de produção de etanol, com ênfase
nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico**

Vanessa Moreira Costa

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Vanessa Moreira Costa
Bacharel em Ciências Biológicas

Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico

Orientadora:

Prof. Dra. **MARÍLIA OETTERER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Costa, Vanessa Moreira

Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico / Vanessa Moreira Costa. - - Piracicaba, 2006.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Acetato 2. Ácidos 3. Álcool como combustível 4. Bactéria láctica 5. Latobacillus
I. Título

CDD 661.82

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A
Deus
Agradeço

Dedico este trabalho aos meus pais *Valter e Maria Aparecida* e meu
irmão *Rafael*

“Quando renunciamos aos nossos sonhos e encontramos a paz, temos um pequeno período de tranqüilidade. Mas os sonhos mortos começam a apodrecer dentro de nós e a infestar todo o ambiente em que vivemos. O que queríamos evitar no combate, a decepção e a derrota, passa a ser o único legado de nossa covardia.”

(Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

- À minha família maravilhosa que eu amo muito, meu pai Valter Alves Costa, minha mãe Maria Aparecida Moreira Costa e meu irmão Rafael Moreira Costa;
- À profa. Dra. Marília Oetterer pela orientação neste trabalho;
- Ao prof. Dr. Luiz Carlos Basso pela amizade e confiança;
- Ao prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim pela credibilidade;
- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização deste curso;
- Ao prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo pela amizade;
- Ao prof. Dr. Joaquim Antônio de Oliveira pela amizade;
- Às minhas amigas Aline Lazoni, Juliana Bueno, Silene Cristina de Lima Paulillo e Vivian Pietrobon pelo incentivo;
- Ao meu namorado Paulo César pela compreensão;
- À amiga Lenita que pelo pouco tempo de convivência me ensinou e me ajudou muito na fase mais difícil deste trabalho;
- Aos amigos César Augusto de Oliveira, Fernanda Sgarbosa, Luiz Lucatti (Cometinha), Luis Henrique Poletto, Mayara Quatrini e Thiago Olitta Basso, pelo grande auxílio nas análises laboratoriais;

- Mariana Dallaqua, Marta Moraes e Karime Simioni minhas grandes amigas que estiveram ao meu lado em todos os momentos, me aconselhando e me apoiando. À vocês com grande carinho agradeço e ofereço este trabalho;
- Ao Amigo Osmar Parazzi Junior pela ajuda e paciência;
- A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
1.INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	17
2.2 A LEVEDURA.....	18
2.3 A BACTÉRIA	20
2.4 BACTÉRIAS LATICAS	21
2.5 METABOLISMO DE HEXOSES POR <i>Lactobacilli</i>	24
2.6 ÁCIDO LÁTICO	26
2.7 ÁCIDO ACÉTICO	28
2.8 CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	35
3.2 REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS	36
3.3 TRANSFERÊNCIA DO INÓCULO	37
3.4 ANÁLISES QUÍMICAS	38
3.4.1 ÁCIDO LÁTICO (TOTAL), ÁCIDO ACÉTICO E ETANOL	38
3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS ISÔMEROS D(-) E L(+) DO ÁCIDO LÁTICO	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	40
4.2 ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁTICO	47
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO:.....	61

RESUMO

No presente trabalho procurou-se avaliar os tipos de metabolismo existentes em espécies e linhagens de *Lactobacillus* isoladas de ambiente de fermentação alcoólica industrial. Para tal, 17, linhagens foram crescidas por 24 horas a 32 °C, em meio de glicose e frutose (1% de cada açúcar) suplementado com extrato de levedura, minerais e tampão. O crescimento bacteriano foi estimado por plaqueamento e absorvância a 600 nm, enquanto que no meio de crescimento foram estimados, mediante cromatografia de alta eficiência, os teores de ácido láctico, ácido acético e etanol. Os isômeros óticos D(-)- e L(+)-lactato foram dosados enzimaticamente mediante espectrofotometria a 340nm, empregando-se desidrogenases estereoespecíficas. Os resultados mostraram que entre as 17 linhagens de *Lactobacillus* avaliadas foram observados os três tipos de metabolismo : homofermentativo obrigatório (8 linhagens), heterofermentativo facultativo (1 linhagem) e heterofermentativo obrigatório (8 linhagens). Observou-se também uma relação estequiométrica dos produtos formados (lactato, acetato e etanol), condizente com os passos metabólicos característicos de cada grupo. Os resultados também permitem deduzir que quanto à formação dos isômeros óticos, houve predominância das linhagens tipo DL (produção simultânea dos dois isômeros), sobre as linhagens D e L. No entanto foram encontradas linhagens produzindo 100% de um dado isômero (D e L), descartando a possibilidade de que linhagens isoladas de processo industrial de produção de etanol, possam atender demandas biotecnológicas que requeiram proporções definidas dos isômeros. Foi possível deduzir que a utilização dos teores de ácido láctico na avaliação da contaminação bacteriana deve ser considerada com ressalvas, especialmente no caso do emprego do ácido L(+)-láctico, e notadamente no caso de comunidades bacterianas complexas.

Palavras chave: *Lactobacillus*, Lactato, Estereoisômeros D e L, Acetato, Etanol

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the metabolism type of 17 *Lactobacilli* strains isolated from industrial ethanol fermentation plants. The strains were grown, at 32°C for 24 hours, on a mixture of equal amounts of glucose and fructose as the carbon source, and supplemented with yeast extract, mineral nutrients and buffer. Bacterial growth was estimated either by absorbance at 600nm and by plating. The main end products of bacterial metabolism (lactate, acetate and ethanol) were measured by high performance liquid chromatography, while the stereoisomers, D(-)- and L(+)-lactate were assayed by an enzymatic methodology using stereospecific lactate-dehydrogenases. According to the results, all the three types of metabolism were found among the bacteria investigated: obligately homofermentative (8 strains), facultative heterofermentative (1 strain) and obligately heterofermentative (8 strains). Additionally, it was observed a stoichiometric relationship between the major end products (lactate, acetate and ethanol) in agreement with the metabolic pathway proposed for the different bacterial types (homo- and heterofermentative strains). The results have showed a predominance of strains of DL type, regarding the stereoisomers production. However, it was found strains producing a single type of the isomeric form. These findings suggest the possibility to explore the *Lactobacilli* biodiversity in fuel ethanol fermentation plants for lactate production of chemically pure optical isomers. It was also observed that the use of lactate content for a chemical evaluation of bacterial contamination may be considered with some restrictions, mainly in the case of L(+)-lactate, and particularly in the case of complex bacterial communities.

Keywords: *Lactobacillus*, Lactate, Stereoisomers D and L, Acetate, Ethanol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores médios e respectivos desvios padrões das concentrações dos ácidos láctico e acético e de etanol (mM), bem como a densidade ótica (DO) após 24 horas de crescimento.....	41
Tabela 2 – Valores médios e respectivos desvios padrões das concentrações do ácido láctico total, bem como de seus isômeros L(+) e D(-)-lactato após 24 horas de crescimento	48
Tabela 3 – Formação de ac. Láctico (mM), L(+)-lactato(%), D(-)-lactato(%), ac. Acético (mM), etanol (mM), D. ^o (600nm) e UFCx10 ⁸ /mL.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Célula de levedura com suas respectivas estruturas	18
Figura 2 – Célula de bactéria com suas respectivas estruturas	19
Figura 3 – Representação simplificada esquemática das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero <i>Lactobacillus</i>	24
Figura 4 – Esquema de reativação e plaqueamento do inóculo inicial.....	36
Figura 5 – Esquema de transferência do inóculo	37
Figura 6 – Densidade ótica (DO a 600 nm) e concentrações dos ácidos láctico e acético e de etanol (mM) após 24 horas de crescimento. A: linhagens FT008B, FT059B, FT085B e FT086B, B: linhagens FT124B, FT188B, FT 209B e FT243B.....	43
Figura 7 – Densidade ótica (DO a 600 nm) e concentrações dos ácidos láctico e acético e de etanol (mM) após 24 horas de crescimento. A: linhagens FT260B, FT282B, FT292B e FT 337B, B: linhagens FT382B, FT 383B, FT401B, FT421B e FT432B	44
Figura 8 – Correlação linear entre crescimento bacteriano (DO a 600nm) e teores de ácido láctico (mM). A: bactérias homofermentativas; B: bactérias heterofermentativas	45
Figura 9 – Correlação linear entre crescimento bacteriano (DO a 600nm) e teores de ácido láctico (mM). A: ácido láctico total; B: ácido D(-)-	

Figura 11 – Formação de ácido láctico total bem como dos seus isômeros óticos D(-) e L(+) por diferentes espécies e linhagens de *Lactobacillus*, crescendo em meio de glicose e frutose por 24 horas. A: linhagens FT260B, FT282B, FT292B e FT337B. B: linhagens FT382B, FT383B, FT401B, FT421B e FT432B.....53

1 INTRODUÇÃO

A transformação de açúcar em lactato pelas bactérias lácticas pode ser considerada o mais importante processo fermentativo empregado na tecnologia de alimentos. Desde a mais remota antiguidade a humanidade vem se beneficiando da fermentação láctica espontânea, permitindo o armazenamento e melhorando o nível higiênico dos alimentos coletados. Tal processo foi gradualmente melhorado e domesticado no transcorrer da evolução de nossa sociedade. No entanto somente no transcurso do século XIX é que os fundamentos fisiológicos e bioquímicos da fermentação láctica foram estabelecidos, resultando na possibilidade de um controle científico deste processo com aplicabilidade na moderna tecnologia dos alimentos.

O conceito de “bactérias do ácido láctico” ou “bactérias lácticas” (BL), foi desenvolvido nos primeiros anos do século XX para designar as bactérias que causam fermentação e coagulação do leite. Os diferentes grupos considerados nessa classe incluíam, também, as bactérias coli-aerógenas e micrococcos aeróbios proteolíticos. Em 1907 foram excluídas as bactérias do grupo coli-aerógenas, estabelecendo o fator Gram positivo como essencial para sua caracterização. Entretanto, os micrococcos aeróbios proteolíticos ainda continuaram incluídos na classe. Em 1912 foi examinado um grande número de bactérias lácticas e verificou-se que estas apresentavam capacidade de fermentar uma grande quantidade de carboidratos, mas os micrococcos capazes de liquefazer gelatina, raramente participavam da acidificação espontânea do leite. Desde então, o interesse se voltou para a análise da fermentação de diversos açúcares, além da lactose. A utilização de temperaturas na classificação de bactérias lácticas foi feita, dividindo-se em 3 grupos: (1) crescimento positivo entre 20-50°C, bastonetes longos e produzindo ácido láctico levorrotório, raramente inativo (2) crescimento a 5-7°C e também a 45-50°C, todas em cocos, e (3) crescimento apenas entre 10-40°C envolvendo a maioria das “bactérias lácticas verdadeiras” (YOKOYA et al., 1997).

Já em 1919, uma descrição completa das “bactérias lácticas verdadeiras”, foi apresentada, definindo-as como sendo “um grande grupo natural de bactérias em bastonetes e cocos, imóveis, sem esporos, que fermentam açúcar, dando principalmente ácido láctico”. Para este trabalho foi enfatizado a fermentação da glicose e

frutose (em lugar de lactose ou galactose), e a formação de ácido láctico (em lugar de gás) nas formas D e L, e temperaturas de crescimento (32°C). Entretanto, consideram-se ainda as coli-aerógenas como “bactérias pseudo-láticas” (YOKOYA et al., 1997).

Essencialmente, o conceito acima é aceito atualmente como “bactérias láticas”, o que é considerado sinônimo de família *Lactobacillaceae*. Reconheceu-se que as bactérias láticas encontram-se em diversos *habitats*, além das isoladas inicialmente do leite. Como resultado, o núcleo das BL é composto de quatro gêneros: *Lactobacillus* (L.), *Leuconostoc* (L.), *Pediococcus* (P.), e *Streptococcus* (S.).

Durante muito tempo apenas as características fenotípicas podiam ser examinadas para avaliação da relação filogenética entre essas bactérias. Hoje, encontram-se disponíveis formas mais precisas para definir essa relação, que são as análises das macromoléculas, notadamente os ácidos nucleicos. Diferentes tipos de ácidos nucleicos são usados para estudos taxonômicos. As relações mais íntimas (entre espécies e sub-espécies) podem ser determinadas pela hibridização DNA-DNA. Para determinação filogenética entre espécies e gêneros, a comparação do RNA ribossômico (rRNA) é mais adequada, pois este contém algumas regiões da cadeia bem conservadas e outras bem diferenciadas.

A fisiologia das BL tornou-se importante quando foi descoberto que essas bactérias são responsáveis pela acidificação de produtos agrícolas. O conhecimento da fisiologia das BL, como o seu metabolismo, utilização de diferentes nutrientes, temperatura e pH de crescimento, permitem obter melhor controle do processo. Isso é usado quando se deseja estimular o processo de acidificação do material, como na fabricação de produtos fermentados (derivados do leite, carne e hortaliças), ou quando se pretende inibir a atividade metabólica, (vinho, cerveja, aguardente, etanol e outros), e na conservação de produtos alimentícios (YOKOYA et al., 1997).

O ácido láctico se constitui no produto final do metabolismo, acoplado ao crescimento bacteriano, formado a partir da redução enzimática do piruvato. As diferentes bactérias láticas produzem uma mistura dos estereoisômeros D(-)-lactato e L(+)-lactato, em diferentes proporções. Tal fato decorre da existência de desidrogenases de lactato estereoespecíficas e em alguns casos de racemases, enzimas que convertem a forma L(+) em D(-). Muitas pesquisas sobre a produção destes isômeros foram

motivadas pela possibilidade de se empregar as proporções D(+)/L(-) do ácido láctico para auxiliar na identificação dessas bactérias. Da mesma forma as atividades enzimáticas das L- e D-desidrogenases igualmente se prestam para esta finalidade taxonômica.

A produção microbiológica de ácido láctico está se configurando como uma atividade industrial em rápido crescimento, devido à sua aplicação na produção do ácido polilático, um plástico versátil e biodegradável que substituiria aquele oriundo do petróleo, tendo ainda o apelo de se utilizar como matéria prima uma fonte renovável (açúcar). Dependendo das proporções dos estereoisômeros D(-) e L(+) utilizados na manufatura, pode-se obter plásticos para atender diversas aplicações. Assim para algumas finalidades, um único isômero ótico bem como uma mistura racêmica de composição definida são desejáveis, e o conhecimento das produções pelas diferentes bactérias é de extrema importância.

Ao contrário do que ocorre com as bactérias lácticas, o isômero ótico D(-)-lactato não é metabolizado pelos tecidos animais e de plantas superiores, sendo inclusive considerado um composto não fisiológico (antínatural) na alimentação humana. Por esta razão se recomenda restringir o consumo da forma D(-) e incrementar o conteúdo da forma L(+)-lactato nos alimentos fermentados e o conhecimento do perfil de produção dos isômeros pelas diferentes linhagens se reveste de particular interesse.

As bactérias lácticas são encontradas em diversos nichos ecológicos, sendo bem resistentes a meios ácidos, especialmente os *Lactobacillus*. Entre os diversos habitats, naturais e artificiais, se destacam aqueles em que essas bactérias convivem com leveduras em condições de fermentação anaeróbica, como no caso da fermentação alcoólica. Como causam prejuízos consideráveis ao processo, essa contaminação bacteriana deve ser monitorada e os teores de ácido láctico poderiam ser utilizados para se acessar o nível dessa contaminação. No entanto uma primeira questão se apresenta: quais dos isômeros (D ou L) refletiriam melhor essa contaminação avaliada pela formação de ácido láctico?

No Brasil, a maioria das indústrias que produzem álcool combustível usam o processo batelada ou contínuo com reciclo de células, de sorte que as bactérias contaminantes igualmente são recicladas. Tal contaminação bacteriana é responsável

por vários problemas operacionais devido à floculação da levedura (YOKOYA et al., 1997; OLIVA-NETO, 1991), além de afetar o rendimento da fermentação, o crescimento e a viabilidade da levedura (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Relações antagônicas são travadas entre leveduras e bactérias no ambiente fermentativo e a produção de ácidos orgânicos por estas duas espécies desempenham papel relevante: enquanto a levedura, produzindo ácido succínico exerce uma repressão sobre o crescimento bacteriano, as bactérias por sua vez, produzindo ácido láctico e acético igualmente afetam o desempenho da levedura (OLIVA NETO; YOKOYA, 1994; BASSO et. al., 1997; MAIORELLA, et. al., 1983).

Grande contribuição ao estudo da microbiótica bacteriana no ambiente fermentativo industrial foi dada por Gallo (1990), que pode demonstrar que o gênero *Lactobacillus* representou cerca de 60% dos isolados.

Em decorrência destas considerações, se propõe neste trabalho, quantificar e avaliar o perfil de metabólitos (ácido láctico – total e isômeros óticos individualizados, ácido acético e etanol) produzidos por várias espécies e linhagens de *Lactobacillus* isoladas de ambiente de fermentação alcoólica, e ainda identificar o tipo de metabolismo bacteriano (homo ou heterofermentativo).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um fenômeno bioquímico muito complexo que provoca a transformação do açúcar em álcool etílico, gás carbônico, ácido succínico, ácidos voláteis, ésteres, etc. (Gay-Lussac)

Segundo Lehninger (2002), a fermentação produz 2 moléculas de ATP contra 38 na respiração, por molécula de glicose. Em condição de aerobiose e baixa concentração de açúcar, uma grande quantidade de ácidos orgânicos formará o chamado ciclo de Krebs, e dois desses ácidos participam da constituição de uma série de aminoácidos. Além do etanol e gás carbônico, a fermentação também pode resultar em produtos secundários como polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outros produtos, necessários à constituição da biomassa do microrganismo.

O álcool produzido durante a fermentação é dependente da quantidade de açúcares presentes no mosto. O processo se inicia por meio da atuação da exoenzima invertase, a qual, por meio da hidrólise, transforma o açúcar (sacarose) em glicose e frutose (monossacarídeos estruturais). Esses monossacarídeos serão absorvidos pela célula da levedura (aeróbio facultativo), que em condições de anaerobiose realizará a fermentação e em condições de aerobiose serão utilizados no processo de respiração da mesma.(AMORIM et al., 2005)

Pasteur verificou que ao se trabalhar em condições adequadas de fermentação (mostos sintéticos), 5% do açúcar metabolizado pela levedura é desviado para rotas metabólicas alternativas, ou seja, para gerar produtos secundários, enquanto que 95% resultam em etanol. No entanto, nas indústrias pode se verificar que de 8 a 15% do açúcar geram produtos secundários; isso se deve a diversos fatores que afetam o processo (AMORIM et al., 2005). Dentre esses fatores está a contaminação bacteriana.

A fermentação alcoólica industrial envolve reciclo de células de leveduras, pode ocorrer também reciclo de células de microrganismos contaminantes. Os principais contaminantes da fermentação são bactérias, estas acarretam ao processo alguns

problemas como: consumo de açúcar, queda da viabilidade e morte das leveduras devido a toxinas lançadas no meio (ALTHERTUM et al., 1984).

Almeida (1940), enfatiza os fatores que propiciam o aparecimento de infecções na fermentação alcoólica de caldo-de-cana e melaço, citando: más condições de armazenamento de melaço, má assepsia da sala de fermentação, má limpeza das dornas e canalizações, resfriamento insuficiente das dornas de fermentação, ausência de controle da acidez e nutrientes do mosto, funcionários despreparados e ausência de assistência técnica.

2.2 A Levedura

A célula de levedura pode possuir formas globosas, esféricas, ovóides e alongadas. As formas alongadas são as mais comuns. Podem ter sua morfologia alterada devido alguns fatores; condições em que estas são cultivadas, reprodução vegetativa, idade da cultura. Não se deve levar em consideração somente a morfologia celular, para se identificar uma linhagem de levedura. Uma mesma espécie pode apresentar mais de um tipo de morfologia, dependendo do estágio de vida em que se encontra. Quanto ao tamanho das células de leveduras podem variar de acordo com a idade da cultura, sendo uniformes em culturas jovens de algumas espécies ou heterogêneas em outras (PELCZAR et al., 1997).

No caso das leveduras industriais as células podem variar de tamanho ente 1 a 5 μm de largura e 5 a 30 μm de comprimento.

Quanto à reprodução das leveduras, podemos citar: reprodução vegetativa (formação de brotos) ou reprodução por esporos (formação de esporos sexuais) (PELCZAR et al., 1997).

Às micro-estruturas que compõem a célula de leveduras são: parede celular, membrana citoplasmática ou plasmalema, núcleo, um ou mais vacúolos e a mitocôndria. (Figura 1)

As leveduras realizam a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir energia química (molécula de ATP adenosina trifosfato) necessária para seu crescimento, manutenção e multiplicação sendo o etanol um subproduto desse

processo. A obtenção de ATP se dá através da degradação de açúcares (sacarose, glicose, frutose, lactose, etc.) por reações químicas catalisadas por enzimas que ocorrem no interior da célula. Além de fornecer energia os açúcares fornecem esqueletos carbônicos para formação do material celular. Como ocorre crescimento mesmo durante a fermentação, parte do açúcar consumido acaba sendo desviado para a produção de células, bem como para a formação dos chamados produtos secundários da fermentação (glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, etc. (AMORIM et al., 1989).

As principais leveduras empregadas na obtenção do etanol pela via fermentativa são linhagens *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces*.

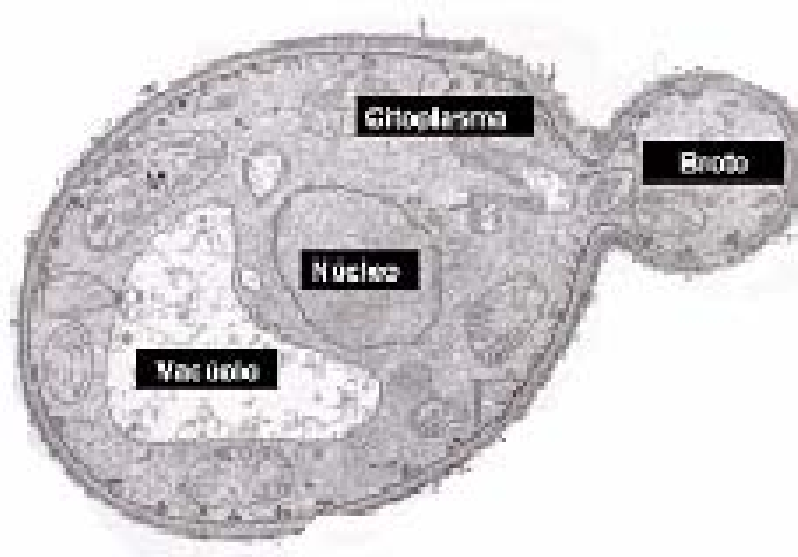


Figura 1 - Célula de levedura com suas respectivas estruturas

2.3 A Bactéria

A bactéria é um microrganismo procarionte que pode apresentar 3 formas celulares que são: elipsoidal/esférica, bastonetes e espiralada/helicoidal. As formas esféricas variam de tamanho de 0,5 μm a 1,0 μm de diâmetro sendo que bastonetes variam de 1,0 μm a 5,0 μm de comprimento e de 0,3 μm a 1,0 μm de largura. Estas características podem ser usadas para a caracterização das espécies bacterianas (PELCZAR et al., 1997). A célula bacteriana é composta por: parede celular, membrana celular, citoplasma, material nuclear e flagelo (em alguns casos). (Figura 2)

Durante o crescimento bacteriano o processo mais comum de divisão celular (multiplicação) é a fissão binária, onde uma única célula se divide em duas, após o desenvolvimento de uma parede celular transversal. O tempo de geração depende da espécie bacteriana e das condições ambientais ou seja, as bactérias são capazes de crescer numa ampla faixa de condições físicas, podendo utilizar alimentos muito diferentes, mas seu crescimento ótimo requer condições específicas para uma dada espécie (PELCZAR et al., 1997).

Outra forma de reprodução utilizada por alguns tipos de bactérias é a formação de esporos. Esses esporos são formados no interior das células e portanto são denominados endosporos. Eles contêm somente parte dos constituintes celulares e a sua forma e posição na célula são importantes critérios na classificação dos bacilos. (AMORIM et al., 1989).



Figura 2 - Célula de bactéria com suas respectivas estruturas

2.4 Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas são descritas como sendo bactérias Gram positiva, não esporogênica, catalase negativa, citocromo ausente, não aeróbia mas aerotolerante, exigente quanto a fatores nutricionais, tolerante a ácido e estritamente fermentativa com a formação de ácido láctico como principal produto da degradação de açúcar. É geralmente associada ao habitat rico em nutrientes como leite, carne e produtos vegetais, mas alguns membros são associados à pele e mucosa de mamíferos podendo ser até patogênicos ao hospedeiro (YOKOYA et al., 1997).

O fato das bactérias lácticas possuírem o caráter Gram positivo é muito importante para sua diferenciação mediante à outros microrganismos.

Uma outra característica muito importante para diferenciação desse grupo é a ausência de formação de esporos por essas bactérias.

Sporolactobacillus é agrupado no gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*). Entretanto, algumas considerações devem ser feitas quanto ao *Sporolactobacillus*. Essa bactéria, descrita inicialmente por Kitahara (1940); apud YOKOYA et al., 1997), produz esporos altamente resistentes ao calor (1 hora a 100°C). Nakayama (1980); apud YOKOYA et al., 1997) classificou-a como *Bacillus coagulans*. Bioquimicamente assemelha-se a *Lactobacillus* homofermentativo, produzindo ácido L(+) láctico. Uma linhagem isolada da ração de aves por Kitahara e Suzuki (1963); apud YOKOYA et al., 1997) é semelhante a *Lactobacillus leichmannii*, e produz esporos resistentes ao calor (10 min a 95°C), apresenta motilidade e requer menos vitaminas como fator nutricional. É importante verificar que os esporos são produzidos no meio com baixo teor de açúcar e com carbonato de cálcio como agente neutralizante do ácido. Essas condições não são normais nas técnicas usadas para estudo de bactérias lácticas, indicando que há possibilidade de haver situações em que essa bactéria seja erroneamente incluída em *Lactobacillaceae*. O *Sporolactobacillus* do grupo *casei-plantarum* e *Bacillus* foram descritas por Thornley e Sharp (1959) na carne bovina e das aves conservadas a baixa temperatura em condições de anaerobiose. Pietrobon (2005) isolou algumas bactérias de amostras de melaço de cana-de-açúcar da safra 2005/2006 em MRS e as caracterizaram por testes bioquímicos (catalase +, produtores de esporos, Gram

positivos e oxidase negativa), assegurando que as bactérias encontradas são pertencentes ao gênero *Sporolactobacillus*.

Para identificação de bactérias lácticas pode-se usar os métodos convencionais que se caracterizam pela dependência do crescimento de grandes concentrações de suspensões de células bacterianas inoculadas, que produzam metabólitos capazes de alterar o pH de uma quantidade relativamente grande o substrato (meio de cultura), além do tempo transcorrido entre a inoculação, indução da reação enzimática e o aparecimento de produtos detectáveis da sua atividade. A detecção da atividade enzimática está relacionada à mudança de cor da solução indicadora de pH adicionada ao meio.

A desvantagem desses métodos é que observações similares não são necessariamente causadas pelas mesmas enzimas. Assim duas linhagens podem dar um resultado negativo, uma porque não possui um sistema permease para transportar o substrato para dentro da célula e a outra não tem enzimas capazes de metabolizar o substrato. Da mesma forma um resultado positivo pode ser produzido por duas enzimas diferentes, por exemplo, no teste na arginina descarboxilase, e a arginina dehidrolase, ambas são capazes de mudar o pH do meio, observado pela mudança de coloração, mas não é possível saber qual delas está agindo na descarboxilação (VARIANE, 1997).

A tipagem consiste em uma caracterização fina de isolados microbianos visando a determinação de uma ou mais características de interesse para o pesquisador ou processo onde os microrganismos ocorram. Assim, a tipagem pode consistir na determinação do potencial de produção de enzimas, toxinas ou de outros metabólitos produzidos pelos microrganismos, capacidade de aglutinação ou adesão a substratos, resistência a agentes antimicrobianos, ou mesmo a determinação da diversidade de microrganismos em uma amostra. Os organismos são então agrupados de acordo com o critério de análise visando a tomada de decisões de acordo com a presença e número de isolados que apresentam a característica de interesse. A tipagem pode ser realizada tanto em nível infra-específico como supra-específico, uma vez que o objetivo é a determinação da característica de interesse e não tanto a identificação ou classificação taxonômica dos isolados (YOKOYA et al., 1997).

2.5 Metabolismo de Hexoses por *Lactobacilli*

O gênero *Lactobacillus* pode ser enquadrado em três grupos distintos quanto ao modo como realizam a degradação dos carboidratos (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986). Os três grupos assemelham-se pelo fato de degradarem apenas hexoses, no entanto, diferem pelo modo como o esqueleto carbono de tais compostos são metabolizados. No grupo formado por homofermentativos obrigatórios, as hexoses são convertidas quase que exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof. Nesse grupo, 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico e 2 moles de ATP (Figura 3). Tal metabolismo é caracterizado pela quebra de frutose 1,6-bifosfato em duas trioses fosfato (3C), as quais são posteriormente convertidas a lactato.

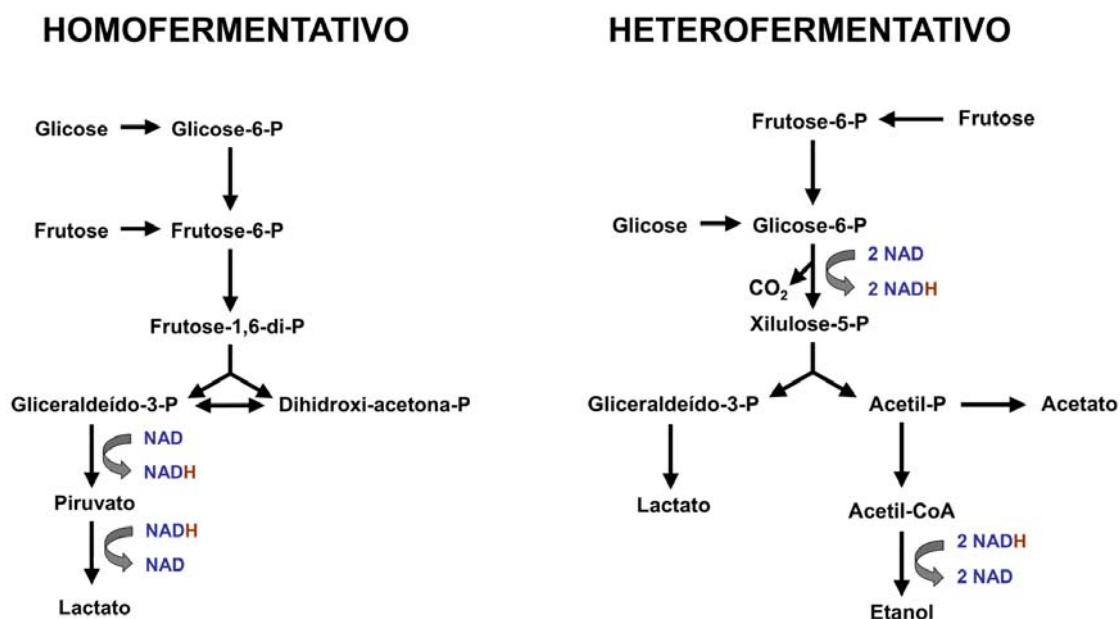


Figura 3 - Representação simplificada esquemática das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*

Modificado de: KANDLER, 1983.

No grupo formado por *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios, as bactérias utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfoacetolase para a fermentação de hexoses. Em condições de anaerobiose, hexoses são convertidas em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP. Tais bactérias realizam a oxidação de glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, o qual sofre descarboxilação (perda de uma molécula de gás carbônico) e posterior ruptura da pentose resultante (xilulose-5-fosfato) em duas moléculas de três (gliceraldeído-3-fosfato) e dois (acetil-fosfato) átomos de carbono. O gliceraldeído-3-fosfato dá origem ao lactato enquanto que o acetil-fosfato pode seguir dois caminhos distintos. Quando acetil-fosfato é convertido a acetato ao invés de etanol, 1 mol adicional de ATP pode ser produzido (Figura 3).

Por fim, no grupo dos lactobacilos heterofermentativos facultativos, as hexoses são fermentadas de forma semelhante ao grupo homofermentativo, contudo, sob condições de limitação de glicose, algumas espécies podem converter as hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol.

De acordo com tais mecanismos, os três tipos de metabolismo podem ser discriminados com base na determinação dos produtos finais da fermentação láctica (KANDLER, 1983), dentre os quais encontram-se os ácidos láctico e acético, etanol e gás carbônico. De um modo geral, fermentações que resultem na formação de ácido láctico como produto majoritário seriam conduzidas por lactobacilos do tipo homofermentativo. Por outro lado, fermentações que apresentem, além do ácido láctico, etanol e/ou ácido acético como produtos principais, estariam envolvidas com lactobacilos do tipo heterofermentativo.

2.6 Ácido Láctico

Durante o processo de fermentação do açúcar variadas quantidades de ácidos D-lático e L-lático são produzidos pelas diferentes espécies de BL. De acordo com Early (1998) *S. thermophilus* produzem L(+) lactato; *L. bulgaricus* e *L. lactis* produzem ácido láctico D(-); e *L. helveticus*, uma mistura de ambas as formas dos isômeros do ácido láctico. Garvie (1980) e Schleifer (1986), apud Yokoya et al (1997), relatam a existência de BL produzindo quantidades iguais de ácido D e L-lático e outras onde se verifica a predominância de um ou outro isômero, mas com quantidades menores, porém mensuráveis do isômero oposto. Essa diferença pode ser explicada devido a presença e atividade da enzima desidrogenase láctica (nLDH) específica, a qual é dependente da NAD^+ . A quantidade equimolar dos ácidos D e L-lático deve-se a presença de quantidades equimolares das enzimas D-nLDH e L-nLDH, respectivamente. Garvie (1980) verificou a produção da enzima racemase (por algumas espécies de bactérias) com a função de converter o ácido L-lático em D-lático e vice-versa; o substrato responsável por estimular a produção dessa enzima seria o próprio ácido L-lático produzido inicialmente no meio de cultivo.

Ao contrário dos animais e plantas superiores que produzem e metabolizam exclusivamente o L(+)- lactato, as bactérias lácticas produzem tanto o isômero L(+) ou D(-) ou mesmo a mistura de ambos. Dessa forma o D(-) lactato tem sido considerado como não fisiológico na alimentação humana e a Organização Mundial para a Saúde (FAO/WHO) sugere uma limitação da ingestão diária deste isômero a 100mg/kg de peso corpóreo e um favorecimento na formação do isômero L(+) nos alimentos fermentados (KANDLER, 1983).

Como anteriormente mencionado as bactérias lácticas podem produzir tanto o isômero L(+) como o D(-) ou mesmo uma mistura racêmica dos isômeros em proporções variáveis. Tal aspecto é decorrência da existência de enzimas desidrogenases lácticas estereoespecíficas, produzindo separadamente os isômeros D e L.

Tal constatação tem levado à utilização das presenças das D- e L-desidrogenases, bem como das proporções dos isômeros produzidos como uma ferramenta taxonômica para

a identificação e classificação das bactérias lácticas (GARVIE, 1980; KANDLER, 1983; MANOME et. al., 1998).

Ácido polilático (APA) foi desenvolvido como uma alternativa renovável para o plástico convencional obtido a partir do petróleo, incentivando a produção do mesmo por via microbiológica mediante um processo fermentativo empregando-se bactérias lácticas atuando sobre várias fontes de carbono. As propriedades físicas do APA, para atender aplicações específicas, podem ser obtidas mediante um controle na relação entre os isômeros D(-) e L(+), de sorte que o perfil de produção por parte das linhagens é de extrema importância (ZHOU et. al., 2003; HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

No processo fermentativo de produção de etanol, enquanto a levedura produz principalmente o ácido succínico, as bactérias contaminantes, mormente LAB, produzem quase que exclusivamente o ácido láctico, o qual se correlaciona com a população bacteriana na fermentação (ALVES, 1994). Tal trabalho foi o primeiro a sugerir a avaliação da contaminação bacteriana pelos teores de ácido láctico formado. Atualmente, facilidades metodológicas (mediante “kits” enzimáticos), vem sendo quantificado especificamente o isômero L(+) para se inferir o nível da contaminação bacteriana. No entanto, até o momento não existe nenhum relato sobre quais isômeros seriam produzidos pelas bactérias mais freqüentemente encontradas no ambiente da fermentação.

Tais considerações nos levam a propor um estudo de linhagens de *Lactobacillus* isoladas de processos industriais de produção de etanol, quanto à formação dos isômeros D(-) e L(+) do ácido láctico bem como de ácido acético e etanol, detalhando assim o tipo de metabolismo destes contaminantes bacterianos.

2.7 Ácido Acético

O ácido acético é o principal ácido orgânico volátil produzido durante a fermentação alcoólica (WHITING, 1976; apud ALVES, 1994) , sendo que o mesmo é produzido tanto pela levedura como por bactérias contaminantes do processo (COOTE; KIRSOP, 1974; ALVES, 1994), podendo ocorrer em concentrações suficientes para manifestar efeitos tóxicos à levedura *Saccharomyces*. Tais efeitos tóxicos se traduzem por redução no crescimento da levedura, inibição da fermentação e intensificação da morte térmica, sendo 30 vezes mais tóxico que o etanol (NORDSTROM, 1961; PAMPULHA; LOUREIRO, 1989; PINTO et. al., 1989; apud ALVES, 1994).

O ácido acético, à semelhança com outros ácidos fracos, perturba a homeostase de células microbianas, por penetrar na forma não-dissociada (protonizada) e dissociar-se no citoplasma promovendo uma acidificação intra-celular, afetando a força protomotriz dos sistemas de transporte. Tais efeitos são tanto maiores quanto menor for o pH do meio, notadamente quando inferior ao seu pK (4,74), em efeito sinérgico com o etanol (PAMPULHA, 1989; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989; LOUREIRO-DIAS 1990; apud ALVES, 1994).

A literatura também aponta para uma maior toxidez exercida pelo ácido acético quando comparada com o ácido láctico, em coerência com a natureza mais apolar do

2.8 Contaminação Bacteriana no Processo de Fermentação Alcoólica

A sacarose juntamente com a glicose e frutose nos mostos à base de cana-de-açúcar são utilizadas pelas leveduras no processo de fermentação para a produção de etanol. Porém pode-se verificar grandes interferências quando a contaminação bacteriana nas dornas de fermentação encontram-se elevadas, pois os açúcares consumidos pelas bactérias deixarão de ser transformados em álcool promovendo, assim, reduções na eficiência do processo de fermentação (OLIVEIRA et al., 1996). De acordo com Amorim et al (2005) a queda do rendimento fermentativo, devido aos efeitos da contaminação bacteriana, pode acarretar prejuízos significativos na indústria como a paralisação do processo de fermentação alcoólica.

Alguns efeitos negativos da contaminação são: maior consumo de açúcar pelas bactérias, floculação e liberação de composto tóxico (como ácidos orgânicos).

Cherubin (2003) também cita problemas encontrados em usinas como o consumo de sacarose e outros nutrientes presentes no mosto, aumento da floculação, redução da massa de fermento, deterioração da cana, redução da viabilidade da levedura, e formação de produtos indesejáveis.

Os maiores prejuízos na fermentação alcoólica são causados, freqüentemente, pelas bactérias láticas e pelas esporuladas. Estas obtêm energia na forma de ATP por meio da fermentação de carboidratos, produzindo como principal produto final o ácido lático Lima et al (1975). Na fermentação lática uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido lático evitando, assim, a conversão dessa molécula em etanol e, conseqüentemente, causando redução no rendimento fermentativo. Também é importante ressaltar que muitos nutrientes acabam sendo desviados para favorecer a multiplicação bacteriana e deixam de ser utilizados pelas células de levedura (NARENDRANATH, 1997).

A floculação é a formação de flocos compostos de células de leveduras e bactérias. Esse fenômeno ocorre porque bactérias (como *Lactobacillus* e *Bacillus*) possuem uma capa protéica, de natureza gelatinosa, que possibilita a fixação mecânica das células de leveduras (GALLO; CANHOS, 1991). Devido a presença desses contaminantes, é estimado um grande aumento no tempo de fermentação, pois além da

deposição de leveduras no fundo das dornas, ocorre redução na área de contato entre células de leveduras e mosto. Ludwig et al (2001) verificou em seus ensaios de floculação das leveduras que ao utilizar uma concentração bacteriana (*L. fermentum*) de 1,38 a 3,76 g/L de biomassa seca, a porcentagem de floculação chegou a atingir 100%. Também verificou que ao utilizar uma concentração bacteriana menor (0,434 e 0,851 g/L de biomassa seca) os índices de floculação foram 0% e 13-25%, respectivamente.

Basso et al (1997) relata a produção do ácido succínico por certas linhagens de leveduras que juntamente com o etanol presente nas dornas de fermentação, podem promover a inibição de bactérias produtoras de ácido láctico.

De acordo com Gallo (1989) e Oliva-Neto (1990) o *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são considerados os contaminantes mais freqüentes no processo de fermentação alcoólica. O gênero *Leuconostoc*, por ser mais sensível ao álcool, geralmente não persiste por longos períodos na fermentação alcoólica. No entanto, os *Lactobacillus* são mais resistentes, pois apresentam condições de adaptação ao meio presente nas dornas, caracterizado por elevado teor alcoólico e condições nutricionais favoráveis ao crescimento (KAJI, 1989; Oliva-Neto, 1994).

A relação antagônica observada entre leveduras e bactérias produtoras de ácido láctico é bem conhecida. Isso ocorre devido aos produtos metabólicos liberados pela bactéria (principalmente ácidos orgânicos), os quais são prejudiciais ao crescimento da levedura e, conseqüentemente, acabam afetando a produção alcoólica (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994). De acordo com Maiorella et al., (1983) 40 g de ácido láctico presentes em 1 L de meio sintético foi capaz de promover uma redução de 80% na população da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em experimentos realizados por Oliva-Neto e Yokoya (1994) pode-se verificar que depois do 15º ciclo de fermentação, a eficiência alcoólica sofreu uma redução quando a quantidade de ácido láctico foi superior a 6 g . L⁻¹ e a contaminação bacteriana foi superior a 1,2x10⁹ UFC . mL⁻¹.

O crescimento de vários tipos de microrganismos é favorecido durante a produção industrial do etanol por sua condição não asséptica. Entre a flora que ocorre no vinho, as bactérias lácticas são de grande importância por causar danos ao processo fermentativo (ESSIA NGANG et al., 1990). Vários autores descrevem que a fermentação

alcoólica é inibida pelas bactérias lácticas (AQUARONE 1960; BORZANI 1986) e muitas outras hipóteses tem avançado para explicar seu efeito inibidor.

De acordo com Momose e Tonoike (1968), a inibição da levedura está relacionada ao esgotamento de vitaminas e aminoácidos (especialmente ácido glutâmico) no meio, enquanto que Tani e colaboradores (1963) alegaram que *S. cerevisiae* era inibida por ácido láctico produzida por *Lactobacillus sake*. Em 1980, Noda e colaboradores usando *Pediococcus halophilus* atribuíram a inibição ao ácido acético, mesmo se a quantidade de ácido láctico fosse maior do que o ácido acético.

Amorim et al (2003) apresentaram as características de algumas bactérias relevantes em usinas de açúcar e álcool, dentre elas:

- ***Lactobacillus fermentum***: bastonetes (0,5-0,9 μm de largura e comprimento muito variável), isolados e/ou aos pares, Gram (+), não esporulados, raramente com motilidade. Anaeróbios facultativos, catalase (-), T° ótima 30-40°C (15°C (-) e 45°C (+)) pH ótimo 5,5-5,9.

- ***Lactobacillus delbruecki***: bastonetes (2,0-9,0 μm x 0,5-0,8 μm), isolados e/ou em pequenas cadeias, Gram (+) não esporulados, raramente com motilidade. Anaeróbios facultativos, catalase (-), T° ótima 40°C (15°C (-) e 45°C (+)).

- ***Lactobacillus plantarum***: bastonetes (3,0-8,0 μm x 0,9-1,2 μm), isolados, aos pares e/ou em pequenas cadeias, Gram (+), não esporulados, raramente com motilidade. Anaeróbios facultativos, catalase (-), T° ótima 30-40°C (15°C (+) e 45°C (-)), pH ótimo 5,5-5,8.

- ***Lactobacillus helveticus***: bastonetes (2,0-6,0 μm x 0,6-1,0 μm), isolados, aos pares e/ou em pequenas cadeias, Gram (+), não esporulados, raramente com motilidade. Anaeróbios facultativos, catalase (-), T° ótima 30-40°C (15°C (-) e 45°C (+)), pH ótimo 5,5-5,8.

- ***Lactobacillus brevis***: bastonetes (2,0-4,0 μm x 0,7-1,0 μm), isolados e em pequenas cadeias, Gram (+), não esporulados, raramente com motilidade Anaeróbios facultativos, catalase (-), T° ótima 30-40°C (15°C (+) e 45°C (-)), pH ótimo: 5,5-5,8.

- ***Lactobacillus yamanashiensis***: bastonetes (2,0-6,0 μm x 0,5-1,0 μm) isolados, pares e cadeias, Gram (+), não esporulados. Anaeróbios facultativos, catalase (-), T^o ótima 30-35°C (10°C (+) e 45°C (-)).

- ***Lactobacillus coryniformis***: bastonetes (1,0-3,0 μm x 0,8-1,1 μm) isolados, pares e cadeias, Gram (+), não esporulados e sem motilidade Anaeróbios facultativos catalase (-), T^o ótima 30-35°C (10°C (+) e 45°C (-)).

- ***Lactobacillus vaccinostercus***: Bastonetes (1,0-3,0 μm x 0,5-0,7 μm), pares, não esporulado, Gram (+) e sem motilidade. Anaeróbios facultativos, catalase (-), T^o ótima 30-35°C (15°C(-) e 45°C (-)).

- ***Lactobacillus viridescens***: bastonetes (0,7-0,9 μm x 2,0-5,0 μm); com extremidades arredondadas; isolados ou aos pares; não esporulados; Gram (+); sem motilidade.

- ***Lactobacillus acidophilus***: bastonetes (0,6-0,9 μm x 1,5-6,0 μm); isolados, aos pares e em pequenas cadeias; Gram (+); raramente com motilidade; não esporulados. Anaeróbios facultativos.

Sporolactobacillus sp: bastonetes (3,0-5,0 μm x 0,7-0,8 μm) isolados e aos pares, Gram (+), esporulados e com motilidade, esporos elípticos terminais. Microaerófilos, catalase (-).

- ***Leuconostoc mesenteroides***: células esféricas e freqüentemente lenticulares (0,7-1,2 μm x 0,5-0,7 μm), aos pares ou em cadeias, Gram (+), sem motilidade, não esporulados. Anaeróbios facultativos, T^o ótima: 20-30°C, (mínima 10°C e máxima 37°C), catalase (-), crescimento 10% etanol (-), crescimento em pH 4,8 (-). Formação de dextrana, pH ótimo 5,5-6,5.

- ***Leuconostoc dextranicum***: células esféricas ou lenticulares (0,7-1,2 μm x 0,5-0,7 μm); aos pares ou cadeias; Gram (+); sem motilidade; não esporuladas. Anaeróbios facultativos; crescimento a 37°C (+); catalase (-), oxidase (-); crescimento em pH 4,8(-); crescimento em 10% de etanol(-).

- ***Leuconostoc lactis***: células esféricas e freqüentemente lenticulares (0,7-1,2 μm x 0,5-0,7 μm), aos pares ou em cadeias, Gram (+), sem motilidade, não esporulados. Anaeróbios facultativos, T ótima: 25-30°C, (mínima 10°C e máxima 40°C), catalase (-), crescimento 10% etanol (-) crescimento em pH 4,8 (-), formação de dextrana, pH ótimo 5,5-6,0.

- ***Micrococcus lylae***: células esféricas (0,8-1,6 μm de \emptyset), predominante em tétrades, Gram (+), sem motilidade, não esporuladas, sem cápsula. Aeróbios (oxidativos), catalase (+), temperatura ótima: 30-37°C.

- ***Micrococcus halobius***: células esféricas (0,8-1,6 μm de \emptyset) isoladas, aos pares e ocasionalmente em tétrades e cachos, Gram (+), sem motilidade, não esporuladas, sem cápsula. Aeróbios (Oxidativos), catalase (+).

- ***Pediococcus parvulus***: cocos (0,6-1,0 μm de \emptyset), aos pares ou em tétrades, Gram (+), sem motilidade, não esporulado, sem cápsula. Anaeróbios facultativos, T^o ótima: 30°C (crescimento 35°C (+), 40°C (-)), catalase (-), pH ótimo 5,0-6,0 (pH 4,0 (+) e 8,5 (-)).

- ***Pediococcus pentosaceus***: cocos (0,8-1,0 μm de \emptyset), aos pares ou em tétrades, Gram (+), sem motilidade, não esporulado, sem cápsula. Anaeróbios Facultativos, T^o ótima: 35°C (40°C (+), 50°C (-), catalase (-), pH ótimo 5,0-6,0 (pH 4,0 (+) e 8,5 (v)).

- ***Pediococcus acidilactici***: células esféricas (0,6-1,5 μm de \emptyset); aos pares ou tétrades; isoladas são raras e nunca em cadeias; Gram (+); sem motilidade; não esporuladas. Anaeróbios facultativos; T^o ótima 40°C; crescimento a 50°C (+); catalase (-); oxidase (-); crescimento em pH 7,5 (+); ácido de sacarose (-).

- ***Lactococcus lactis***: células ovais alongadas no sentido das cadeias, com 0,5-1,0 μm de \emptyset , aos pares ou em cadeias, Gram (+), sem motilidade, não esporuladas. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, T^o ótima: 30°C (10°C(+), 45°C (-)), catalase (-), sensibilidade a penicilina, pH ótimo: 6,0-7,0 (pH 9,0(+), pH 9,6 (-)).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas utilizadas

Utilizou-se cinco linhagens de *Lactobacillus plantarum* (FT059B, FT085B, FT086B, FT337B e FT382B), três linhagens de *Lactobacillus fructosus* (FT243B, FT383B e FT432B), duas linhagens de *Lactobacillus fructivorans* (FT401B e FT421B), quatro linhagens de *Lactobacillus fermentum* (FT008B, FT124B, FT282B e FT292B), uma linhagem de *Lactobacillus buchneri* (FT188B) e uma linhagem de *Lactobacillus vaccिनostercus* (FT209B), todas obtidas da coleção de microrganismos da Fermentec (Piracicaba) e isoladas de processos industriais de produção de etanol. A maioria destas linhagens foram isoladas vinho bruto, exceções a linhagem FT124B isolada de goma do filtro prensa e, FT282B e FT292B isoladas de mosto.

3.2 Reativação das bactérias

As bactérias conservadas sob forma liofilizada, foram reativadas em 5 mL de meio de cultivo líquido MRS (1,0%, dextrose - 2,0%, TWEEN 80 - 0,1%, fosfato dibásico de potássio - 0,2%, acetato de sódio - 0,5%, citrato de amônio dibásico - 0,2%, sulfato de magnésio - 0,01%, sulfato de manganês - 0,005%) e incubado à $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Foi feito então o plaqueamento da amostra e posteriormente incubação à $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas em anaerobiose. Após o período de incubação foram feitas as contagens das placas, expressando-se o resultado em UFC/mL (Figura 4).

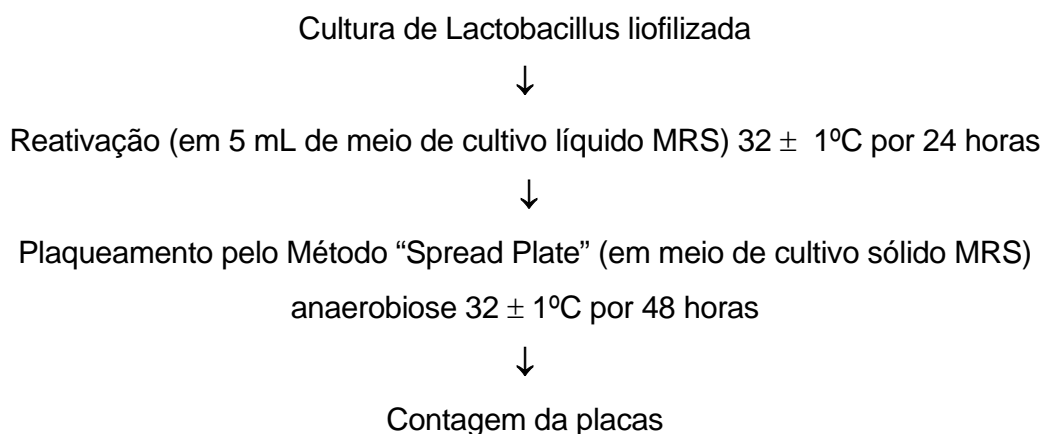


Figura 4 - Esquema de reativação e plaqueamento do inoculo inicial

3.3 Transferência do inóculo

Foi transferido 0,1 mL da suspensão de células (inóculo Inicial) para tubos contendo 5 mL (triplicata) de meio de cultivo líquido composto por 2% de açúcar e enriquecido com sais (0,5% peptona - 1% glicose - 1% frutose - 0,5% extrato de levedura - tampão: 0,2% $K_2 HPO_4$ - 0,02% $MgSO_4$ - 0,001% $MnSO_4$ e pH ajustado para 6,5) os tubos foram incubados à $32 \pm 1^\circ C$ por 24 horas. Após o período de incubação foi feito plaqueamento da suspensão, e posteriormente incubou-se em anaerobiose à $32 \pm 1^\circ C$ por 48 horas. Após o período de incubação foram feitas as contagens das placas, e resultado expresso em UFC/mL.. (Figura 5)

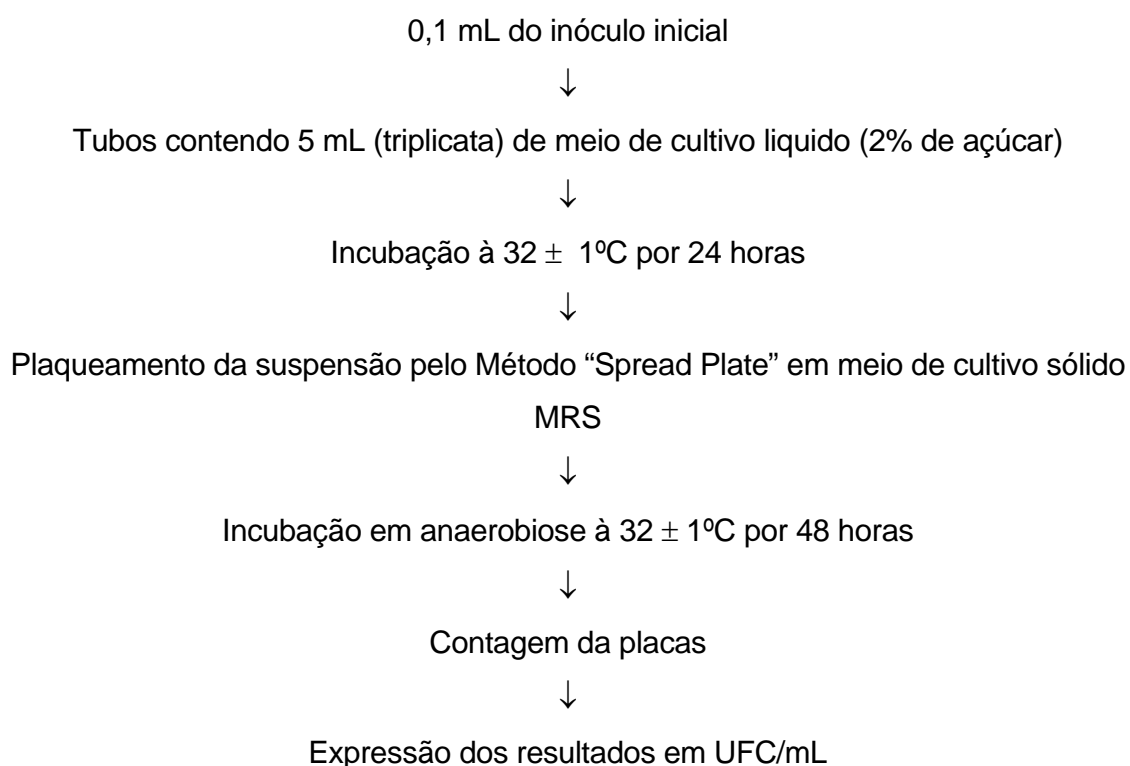


Figura 5 - Esquema de transferência do inóculo

3.4 Análises Químicas

3.4.1 Ácido Lático (total), ácido acético e etanol

As amostras foram coletadas após 24 horas de metabolização, sendo mantidas sob refrigeração (-20°C) até o momento das análises. Os metabólitos acima mencionados foram dosados mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se o Cromatógrafo CG-480C, detector de índice de refração modelo IR-410 e registrador modelo CG-200, todos da Instrumentos Científicos CG Ltda. Empregou-se também a coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 4 mm), sendo que a fase móvel foi constituída de H₂SO₄ 5mM a um fluxo de 0,6 mL/min e com padronização externa.

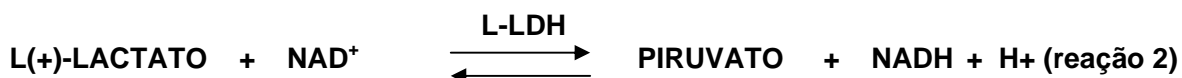
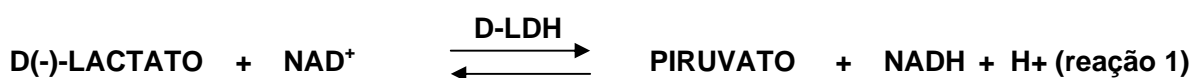
3.4.2 Quantificação dos isômeros D(-) e L(+) do ácido lático

A discriminação dos isômeros óticos foi obtida mediante reações enzimáticas empregando-se desidrogenases láctica estereoespecíficas, ou seja, com especificidade diferenciada para cada um dos isômeros D(-) e L(+). As amostras, igualmente mantidas sob refrigeração (-20°C), foram fervidas em banho de água (10 minutos) para inativação de enzimas bacterianas e centrifugadas (5.000 x g por 10 minutos). Alíquotas de 20 uL do sobrenadante foram diluídas com 300 uL de água destilada/esterilizada, acrescidas de 300 uL de tampão glicil-glicina (pH=10) contendo 4,4 mg de ácido L-glutâmico, 50 uL de solução contendo 1,75 mg de NAD⁺ e 10 uL de uma suspensão contendo 16 Unidades de glutamato-piruvato-transaminase (GPTase). Após incubação a 25°C por 5 minutos, foi medida a absorbância (A₁) a 340nm em espectrofotômetro Bausch-Lomb, modelo Spectronic 88, sendo que tal valor se consistiu na prova em branco da amostra. O valor de absorbância (A₂) referente ao isômero D(-)-lactato foi obtido após incubação (30 minutos) da mistura anterior com 10 uL de solução contendo 54 Unidades de D-lactato desidrogenase (D-LDH), conforme reação 1 a seguir. A seguir, da mesma forma e na mesma mistura de reação se obteve o valor de absorbância (A₃) relativo ao isômero L(+) após reação de 30 minutos em presença de 54 Unidades de L-lactato

desidrogenase (L-LDH) contidas em 10 uL de solução (reação 2). Todas as reações enzimáticas ocorreram a 25°C.

Paralelamente foram empregados padrões de D(-)-lactato e L(+)-lactato e as diferenças de absorbâncias A_2-A_1 e A_3-A_2 foram computadas para os cálculos das concentrações dos isômeros D(-) e L(+), respectivamente. Todos os reagentes referentes a essas análises enzimáticas foram obtidos da Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG (D-64293, Darmstadt).

Os detalhes das reações enzimáticas estão a seguir explicitadas, onde as desidrogenases reduzem o lactato produzindo NADH + H (reações 1 e 2) que absorve luz de 340nm, sendo que a reação catalizada pela transaminase (GPTase – reação 3) seqüestra o piruvato para que a produção da coenzima (NADH+H) seja estequiométrica em relação ao lactato presente na amostra:



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Metabolismo de carboidratos

De acordo com Kandler e Weiss (1986), os *Lactobacillus* se enquadram em três grupos distintos segundo a maneira como degradam os carboidratos: 1- homofermentativos obrigatórios; 2- heterofermentativos facultativos e 3- heterofermentativos obrigatórios. Os resultados obtidos permitem deduzir que entre as bactérias avaliadas no presente estudo, os três biotipos metabólicos foram encontrados.

Os três grupos se assemelham pelo fato de degradarem apenas hexoses, no entanto, diferem pelo modo como o esqueleto carbono de tais compostos são metabolizados. No grupo formado por homofermentativos obrigatórios, as hexoses são convertidas quase que exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof. Nesse grupo, 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico (KANDLER; WEISS, 1986).

As linhagens de *Lactobacillus* FT059B, FT085B, FT086B, FT243B (Figura 6), FT 260B, FT337B, FT382B e FT401B (Figura 7) podem ser consideradas do tipo metabólico homofermentativo, pois que se mostraram produtoras quase que unicamente de lactato. As produções de acetato estão no limite de detecção da metodologia empregada, de sorte que se pode afirmar, do ponto de vista prático, que o lactato foi o único produto observado nesta análise que visava também quantificação de acetato e etanol.

Neste grupo (homofermentativo) foram computadas 8 linhagens representando cerca de 50% da população avaliada e curiosamente todas as espécies de *L. plantarum* foram incluídas neste tipo metabólico, em concordância com o observado por Hofvendahl e Hahn-Hagerdal (2000) para *L. plantarum* H4.

As linhagens FT008B, FT124B, FT188B, FT282B, FT292B, FT383 B, FT421B e FT432B, que produziram além de lactato, o ácido acético e o etanol como produtos finais, podem ser classificadas como sendo do tipo heterofermentativo obrigatório (Figuras 6 e 7). Como se sabe, neste tipo de metabolismo as bactérias utilizam a via 6-

fosfogluconato/fosfoacetolase para a fermentação de hexoses, que em condições de anaerobiose são convertidas em quantidade equimoleculares de ácido láctico e etanol + acetato (KINDLER, 1983).

De fato, em conformidade com os passos metabólicos presentes no grupo heterofermentativo, se observa uma estequiometria quase que perfeita, ou seja, teores de lactato correspondendo à soma de acetato e etanol. Outro aspecto interessante vem a ser a relação estequiométrica de 1:1 entre acetato e etanol produzidos (Tabela 1). Também se observa que todas as linhagens de *L. fermentum* avaliadas se enquadraram no grupo heterofermentativo, como também observado para a linhagem *L. fermentum* NRRL-B-1932 por Weymarn et al (2002).

Tabela 1 - Valores médios e respectivos desvios padrões das concentrações dos ácidos láctico e acético e de etanol (mM), bem como a densidade ótica (DO) após 24 horas de crescimento

Código	Espécie	Ac. Láctico (mM)	Ac. Acético (mM)	Etanol (mM)	DO (600nm)
FT008B	<i>L. fermentum</i>	59,3 ± 6,32	25,4 ± 2,30	25,6 ± 2,29	2,36 ± 0,05
FT059B	<i>L. plantarum</i>	97,9 ± 6,17	2,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,97 ± 0,51
FT085B	<i>L. plantarum</i>	67,6 ± 8,02	1,7 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,60 ± 0,06
FT086B	<i>L. plantarum</i>	120,0 ± 10,7	2,7 ± 0,97	0,0 ± 0,00	2,57 ± 0,09
FT124B	<i>L. fermentum</i>	54,8 ± 6,98	23,6 ± 2,52	23,3 ± 3,13	2,30 ± 0,02
FT188B	<i>L. buchneri</i>	64,8 ± 5,48	27,1 ± 9,93	27,3 ± 2,59	2,22 ± 0,09
FT209B	<i>L. vaccinostercus</i>	67,9 ± 6,11	9,0 ± 3,09	2,37 ± 1,12	1,52 ± 0,20
FT243B	<i>L. fructosus</i>	61,4 ± 1,64	1,9 ± 0,48	0,0 ± 0,00	0,94 ± 0,03
FT260B	<i>L. coryniformis</i>	59,1 ± 9,79	1,9 ± 0,48	0,0 ± 0,00	1,13 ± 0,24
FT282B	<i>L. fermentum</i>	61,5 ± 2,03	25,9 ± 0,87	26,2 ± 0,69	2,50 ± 0,06
FT292B	<i>L. fermentum</i>	66,4 ± 2,88	28,0 ± 1,38	28,1 ± 1,55	2,46 ± 0,02
FT337B	<i>L. plantarum</i>	100,2 ± 14,8	2,2 ± 0,97	0,0 ± 0,00	1,85 ± 0,15
FT382B	<i>L. plantarum</i>	72,1 ± 4,95	3,1 ± 0,67	0,0 ± 0,00	1,02 ± 0,04
FT383B	<i>L. fructosus</i>	62,9 ± 3,40	19,8 ± 0,74	28,5 ± 2,80	1,43 ± 0,08
FT401B	<i>L. fructivorans</i>	98,7 ± 8,54	3,0 ± 0,48	0,0 ± 0,00	1,91 ± 0,09
FT421B	<i>L. fructivorans</i>	59,1 ± 3,13	23,8 ± 0,70	23,6 ± 1,50	1,44 ± 0,12
FT432B	<i>L. fructosus</i>	59,4 ± 4,31	25,3 ± 0,47	20,7 ± 2,44	1,38 ± 0,08

A linhagem FT209B produziu quantidades pequenas mas bem mensuráveis de ácido acético e etanol, valores estes dentro dos limites de detecção da metodologia empregada (Figura 6B). Assim se pode especular que tal linhagem pertença ao grupo das heterofermentativas facultativas. Segundo Kandler e Weiss (1986), tal grupo apresenta a característica de se comportar como heterofermentativa (produzindo acetato e etanol) quando em condições de limitação de glicose. Dessa forma, na fase final de crescimento, com limitação de glicose no meio, a linhagem FT209B poderia ter dirigido o seu metabolismo para a produção de acetato e etanol, conjuntamente ao lactato.

Com diferentes propósitos taxonômicos e biotecnológicos, *Lactobacilli* foram avaliados e se mostraram, dependendo da espécie e da linhagem, tanto com metabolismo homo- como heterofermentativo (KANDLER, 1983; HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000). No presente estudo, embora englobando um número restrito de linhagens, igualmente se observou os dois biótipos metabólicos e em proporções praticamente idênticas (8 linhagens de cada biótipo). Pode-se assim afirmar que no

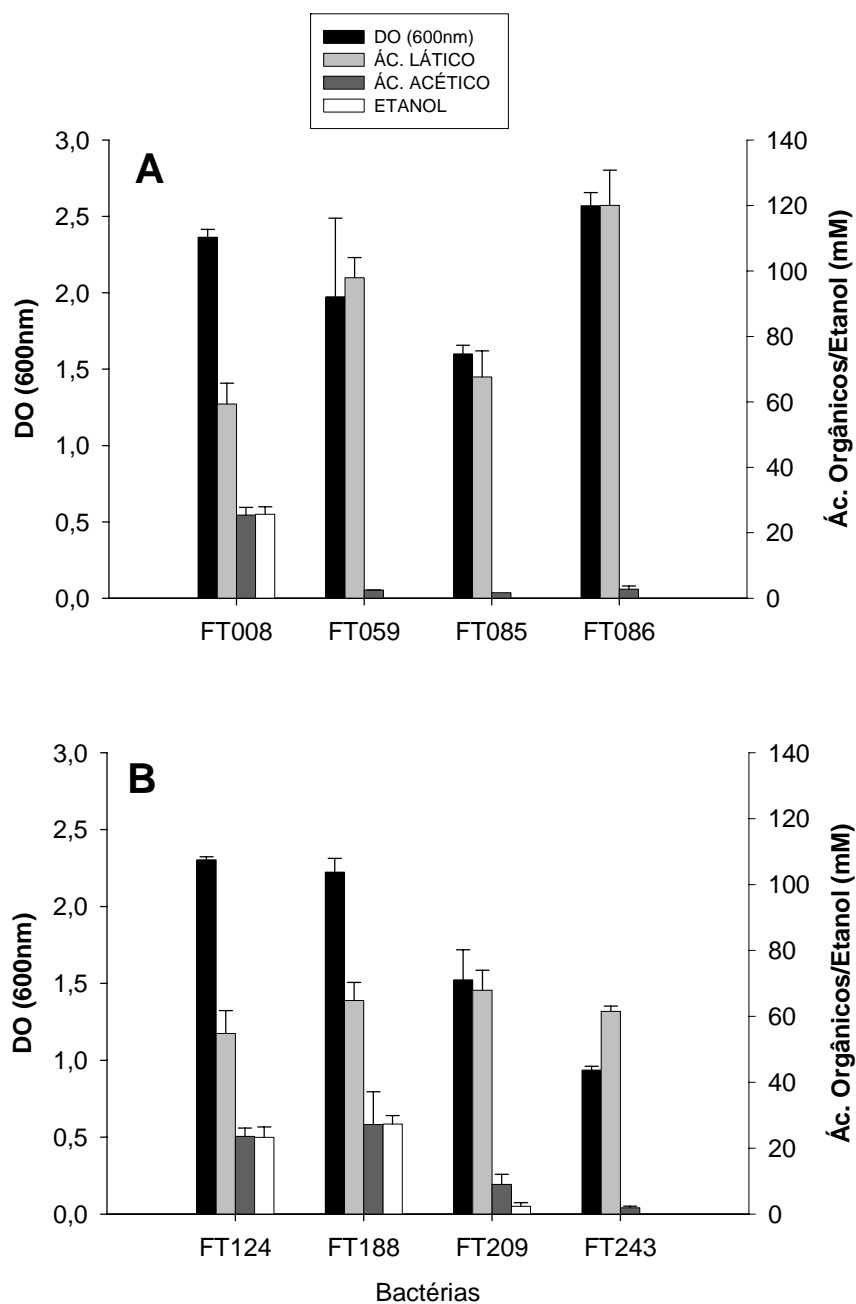


Figura 6 - Densidade ótica (DO a 600nm) e concentrações dos ácidos lático e acético e de etanol (mM) após 24 horas de crescimento. A: linhagens FT 008 B, FT 059 B, FT 085 B e FT 086 B. B: linhagens FT 124 B, FT 188 B, FT 209 B e FT 243 B

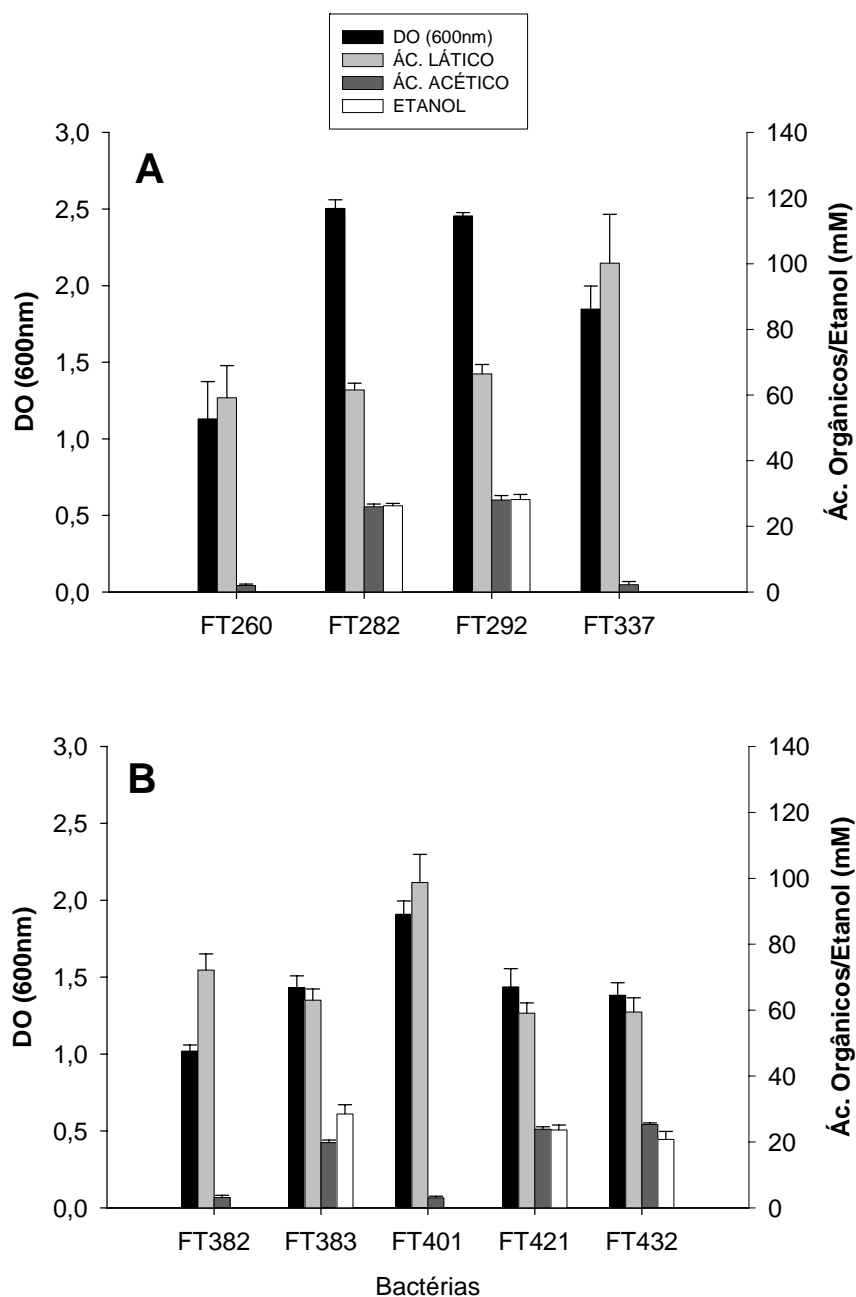


Figura 7 - Densidade ótica (DO a 600nm) e concentrações dos ácidos láctico e acético e de etanol (mM) após 24 horas de crescimento. A: linhagens FT 260 B, FT 282 B, FT 292 B e FT 337 B. B: linhagens FT 382 B, FT 383 B, FT 401B, FT 421 B e FT 432 B

Correlações entre o crescimento das diferentes linhagens avaliadas pela densidade ótica (DO) a 660 nm e os teores de ácido láctico finais produzidos mostraram resultados distintos para os dois tipos de metabolismo, homo- e heterofermentativo. Assim, enquanto entre as bactérias homofermentativas se observa uma boa correlação (Figura 8A) tal correlação é praticamente inexistente no grupo das heterofermentativas (Figura 8B).

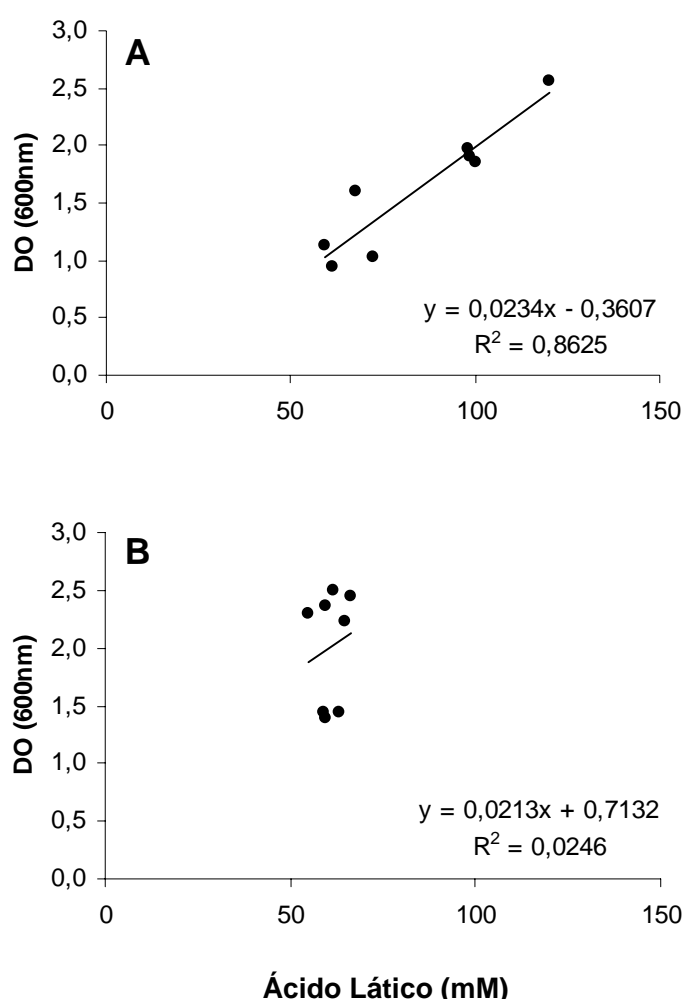


Figura 8 - Correlação linear entre crescimento bacteriano (DO a 600nm) e teores de ácido láctico (mM). A: bactérias homofermentativas; B: bactérias heterofermentativas

Como nas heterofermentativas a formação de lactato a partir da fonte de carbono é restringida pelo desvio do esqueleto carbônico para acetato e etanol, o que não ocorre com as homofermentativas, pode resultar que, para um mesmo crescimento em biomassa bacteriana tenhamos valores bem distintos de lactato produzido (comparar os dados de crescimento e lactato das linhagens FT008B e FT086B na Figura 6, hetero- e homofermentativas, respectivamente).

Os resultados demonstram, portanto, que a população heterofermentativa na dorna de fermentação, torna difícil a avaliação da contaminação bacteriana pela determinação dos teores de ácido láctico. Para melhor exemplificar tal fato, suponhamos duas dornas de fermentação com a mesma contaminação bacteriana (número de células), mas tendo uma delas uma população bacteriana unicamente de linhagens homofermentativa e outra dorna com população exclusivamente heterofermentativa. Os teores de lactato serão menores na dorna com a população heterofermentativa, a despeito de efeitos deletérios possivelmente mais severos para a levedura, devido à produção simultânea de acetato.

4.2 Isômeros do ácido láctico

Durante a metabolização dos carboidratos por bactérias lácticas, o ácido láctico é formado pela redução do ácido pirúvico, oriundo da via glicolítica. Tal conversão possibilita a regeneração de NAD a partir das coenzimas reduzidas (NADH). Nesse processo, são formados ambos os isômeros do ácido láctico, sendo que cada forma isomérica é sintetizada por uma enzima diferente, sendo que o L(+)-lactato é formado pela enzima LdhL (EC 1.1.1.27) enquanto o D(-)-lactato é formado pela enzima análoga LdhD (1.1.1.28) (GARVIE, 1980).

Por essa razão, as bactérias lácticas podem ser agrupadas de acordo com a proporção dos isômeros do ácido láctico que são produzidos durante o crescimento das mesmas em glicose (GARVIE 1980; KANDLER, 1983; MANOME et al., 1998). De acordo com tal classificação, as bactérias lácticas podem ser divididas entre aquelas que produzem mais de 75% do isômero L(+)-lactato, as quais são referidas como sendo do tipo L; as que produzem mais que 75% do isômero D(-)-lactato, referidas como tipo D; ou as bactérias que produzem os dois isômeros em proporções intermediárias, que por sua vez são classificadas como sendo do tipo DL.

No presente estudo, dentre as bactérias investigadas, foi encontrada apenas uma linhagem do tipo L (FT124B), quatro linhagens do tipo D (FT085B, FT243B, FT260B e FT382B) e 12 linhagens do tipo DL (Tabela 2). A linhagem do tipo L, a qual refere-se a uma espécie de *L. fermentum*, produziu somente o isômero L(-)-lactato. Num estudo realizado por Manome et al (1998), uma linhagem de *L. fermentum* (ATCC 14931) foi classificada como sendo do tipo DL, responsável pela produção de quantidades muito semelhantes de ambos os isômeros. No entanto, cabe ressaltar que o referido estudo foi realizado empregando-se apenas glicose no meio de crescimento, enquanto que no presente trabalho o meio foi composto de glicose e frutose.

Dentre as quatro linhagens classificadas como *Lactobacillus* do tipo D, encontram-se duas linhagens de *L. plantarum* (F085B e FT382B), sendo que uma delas produziu apenas o isômero D(-)-lactato (Tabela 2). Novamente, no estudo realizado por Manome et al (1998), uma linhagem de *L. plantarum* (ATCC 14917) foi classificada como sendo do tipo DL, em que a produção dos isômeros foi praticamente a mesma.

Tabela 2 - Valores médios e respectivos desvios padrões das concentrações do ácido láctico total, bem como de seus isômeros L(+) e D(-)-lactato após 24 horas de crescimento

Código	Espécie	Ac. Láctico (mM)	L(+)-Lactato (%)	D(-)-Lactato (%)	Tipo do Metabolismo*
FT008B	<i>L. fermentum</i>	59,3 ± 6,32	56,9 ± 1,01	43,0 ± 1,01	Hetero (DL)
FT059B	<i>L. plantarum</i>	97,9 ± 6,17	67,7 ± 2,04	32,2 ± 2,04	Homo (DL)
FT085B	<i>L. plantarum</i>	67,6 ± 8,02	2,77 ± 0,70	97,2 ± 0,70	Homo (D)
FT086B	<i>L. plantarum</i>	120,0 ± 10,7	73,7 ± 1,82	26,2 ± 1,82	Homo (DL)
FT124B	<i>L. fermentum</i>	54,8 ± 6,98	100,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	Hetero (L)
FT188B	<i>L. buchneri</i>	64,8 ± 5,48	54,3 ± 0,20	45,7 ± 0,20	Hetero (DL)
FT209B	<i>L. vaccinostercus</i>	67,9 ± 6,11	29,9 ± 14,3	70,1 ± 14,3	Hetero** (DL)
FT243B	<i>L. fructosus</i>	61,4 ± 1,64	3,43 ± 1,24	96,5 ± 1,24	Homo (D)
FT260B	<i>L. coryniformis</i>	59,1 ± 9,79	1,30 ± 1,18	98,7 ± 1,18	Homo (D)
FT282B	<i>L. fermentum</i>	61,5 ± 2,03	59,1 ± 2,55	40,8 ± 2,55	Hetero (DL)
FT292B	<i>L. fermentum</i>	66,4 ± 2,88	60,0 ± 1,18	40,0 ± 1,18	Hetero (DL)
FT337B	<i>L. plantarum</i>	100,0 ± 14,8	67,2 ± 1,57	32,8 ± 1,57	Homo (DL)
FT382B	<i>L. plantarum</i>	72,1 ± 4,95	0,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	Homo (D)
FT383B	<i>L. fructosus</i>	62,9 ± 3,40	46,3 ± 1,69	53,6 ± 1,69	Hetero (DL)
FT401B	<i>L. fructivorans</i>	98,7 ± 8,54	62,5 ± 1,82	37,4 ± 1,82	Homo (DL)
FT421B	<i>L. fructivorans</i>	59,1 ± 3,13	57,4 ± 0,95	42,6 ± 0,95	Hetero (DL)
FT432B	<i>L. fructosus</i>	59,4 ± 4,31	55,2 ± 2,65	44,8 ± 2,65	Hetero (DL)

* O tipo do metabolismo, homofermentativo (homo) ou heterofermentativo (hetero) é deduzido pelas produções de acetato e/ou etanol, no presente estudo (Tabela1). D, L e DL: tipos produtores dos isômeros óticos do ácido láctico

** Metabolismo heterofermentativo facultativo.

De acordo com Garvie (1980), a maioria dos *Lactobacillus* produz as duas formas dos isômeros, contudo em diferentes proporções, o que tem sido atribuído às diferentes atividades das enzimas LdhL e LdhD. No presente estudo, a maioria dos lactobacilos analisados (88,2%) produziu as duas formas isoméricas do ácido láctico (Figuras 10 e 11). Cabe ainda ressaltar que dentre as 17 linhagens investigadas, 12 lactobacilos foram classificados como sendo do tipo DL. Segundo Manome *et al.* (1998), 13 entre 21 lactobacilos analisados, foram classificados como lactobacilos do tipo DL.

A presença da enzima lactato racemase (EC 5.1.2.1), capaz de converter uma forma isomérica em outra, foi proposta para algumas poucas espécies do gênero *Lactobacillus*, que são *L. sakei*, *L. curvatus* e *L. paracasei* subespécie *paracasei* (GOFFIN *et al.*, 2005). Nessas espécies, apenas L(+)-lactato é inicialmente formado, cuja presença induz aumento na atividade da enzima lactato racemase, permitindo então a formação do isômero D(-)-lactato. Segundo Garvie (1980), o resultado final dessa conversão engloba uma mistura de proporções semelhantes entre os dois isômeros. De acordo com Goffin *et al.* (2005), poucos trabalhos em relação aos aspectos bioquímicos da enzima lactato racemase têm sido publicados. Assim, os resultados apresentados permitem especular que apenas as linhagens FT008B, FT188B, FT383B, FT421B e FT432B poderiam apresentar a racemase, não descartando a possibilidade de que estas linhagens também apresentassem os dois tipos de desidrogenases (LdhL e LdhD), com iguais atividades, de modo a formarem os dois estereoisômeros em iguais quantidades (Tabela 2).

Diferentemente dos animais superiores e das plantas, os quais produzem exclusivamente o L(+)-lactato, muitas bactérias lácticas são capazes de produzir as duas formas isoméricas. Como o D(-)-lactato não é prontamente utilizado pelo homem e pelos animais, existe uma tendência em favorecer a presença do isômero L nos alimentos fermentados (KANDLER, 1983). Dessa forma o presente estudo mostra que dentre as linhagens estudadas, algumas se prestariam para a produção do isômero L(+)-lactato em elevada proporção (FT085B, FT243B, FT260B e FT382B), conforme dados da Tabela 2.

Particularmente interessante foi a correlação entre o crescimento bacteriano (DO a 600nm) e a formação de ácido láctico, considerando-se todas as linhagens bacterianas. Correlações positivas foram observadas tendo como parâmetros a produção de ácido láctico total (considerando-se a soma dos dois isômeros óticos) e ácido D(-)-láctico (Figuras 10A e 10B), sendo que a melhor correlação foi estabelecida com o estereoisômero D(-)-lactato. Ao contrário, a correlação com o isômero L(+) se mostrou negativa, sugerindo ser um parâmetro de difícil interpretação (Figura 9).

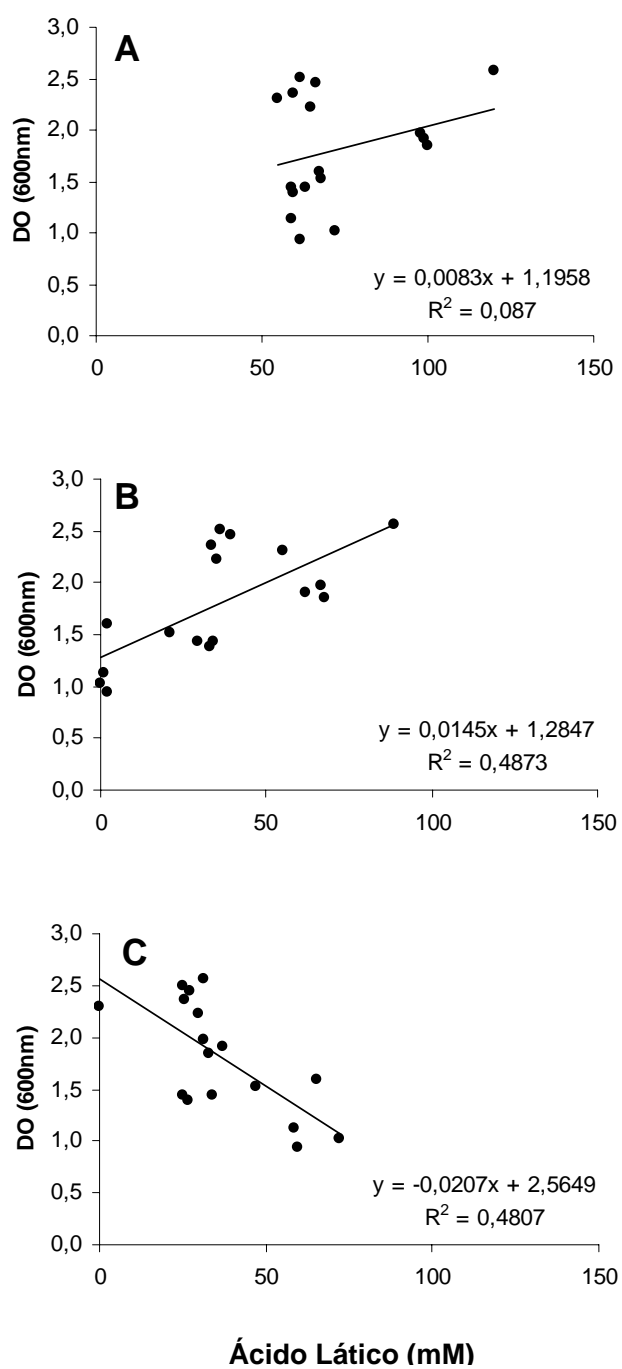


Figura 9 - Correlação linear entre crescimento bacteriano (DO a 600nm) e teores de ácido lático (mM). A: ácido lático total; B: ácido D(-)-lático; C: ácido L(+)-lático

Assim, a utilização do ácido L(+)-lático como parâmetro para se avaliar a contaminação bacteriana é bastante dependente das espécies/linhagens bacterianas que se instalam na dorna. Da mesma forma como anteriormente colocado, para uma população bacteriana bem definida, a correlação entre crescimento e produção de quaisquer forma de ácido lático pode ser obtida, mas se ocorrer flutuações na população bacteriana a avaliação através do ácido L(+)-lático pode não refletir a intensidade da contaminação.

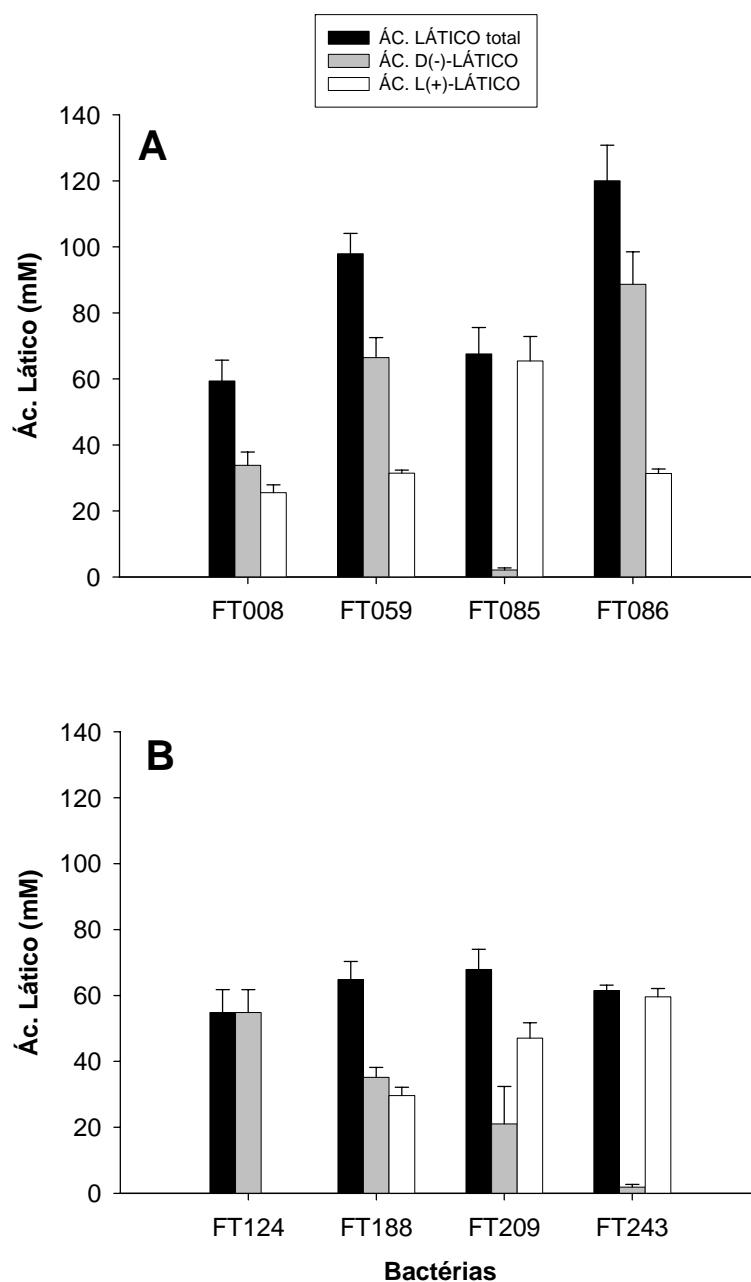


Figura 10 - Formação de ácido láctico total bem como dos seus isômeros óticos D(-) e L(+) por diferentes espécies e linhagens de *Lactobacillus*, crescendo em meio de glicose e frutose por 24 horas. A: linhagens FT008B, FT059B, FT085B e FT086B. B: linhagens FT124B, FT188B, FT209B e FT243B

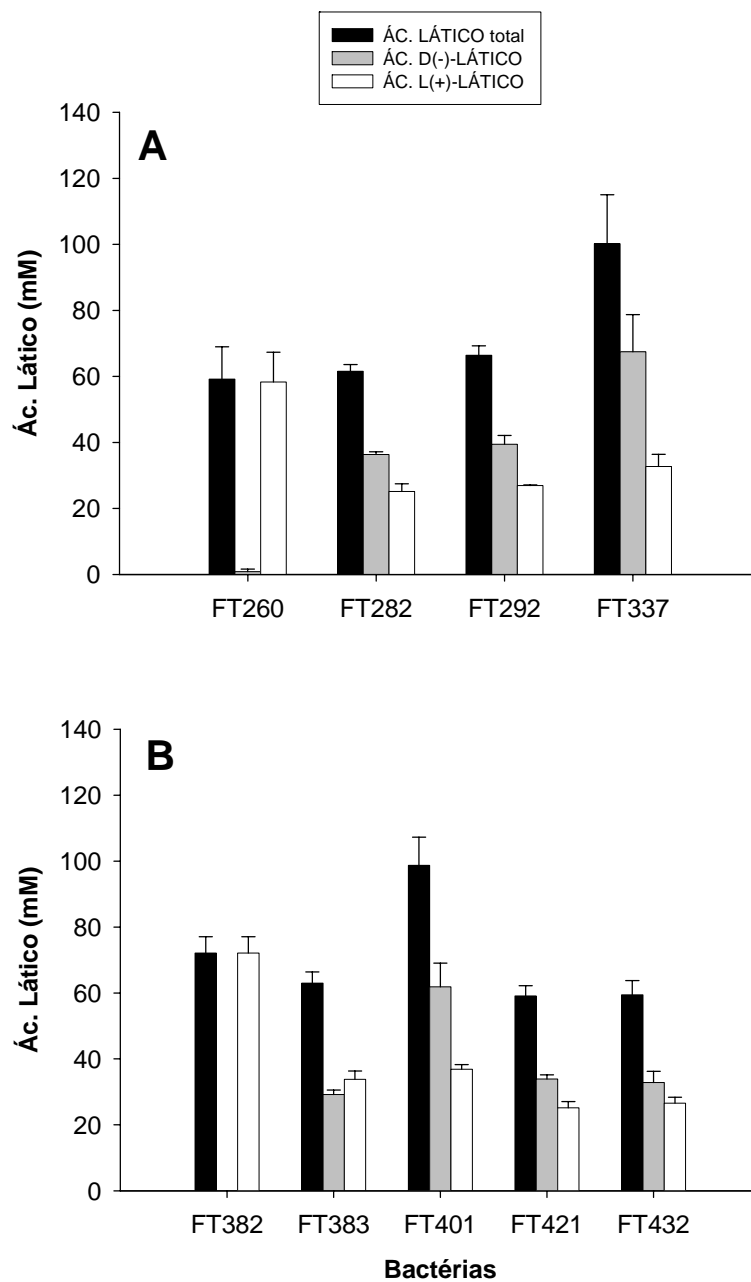


Figura 11 - Formação de ácido láctico total bem como dos seus isômeros óticos D(-) e L(+) por diferentes espécies e linhagens de *Lactobacillus*, crescendo em meio de glicose e frutose por 24 horas. A: linhagens FT260B, FT282B, FT292B e FT337B. B: linhagens FT382B, FT383B, FT401B, FT421B e FT432B

5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem concluir o que se segue:

1. Espécies e linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus* isoladas de processos industriais de produção de etanol apresentam tipos metabólicos diversos, ou seja, homofermentativo obrigatório e heterofermentativos facultativo e obrigatório.
2. As proporções entre os tipos homo- e heterofermentativo obrigatórios se mostram idênticas.
3. A coexistência destes dois tipos de bactérias no ambiente de fermentação faz com que a dosagem de ácido láctico como indicadora da contaminação seja considerada com reservas.
4. A utilização dos teores do isômero ótico L(+) do ácido láctico para a indicação da contaminação é a mais limitada quando da presença de uma diversidade bacteriana.
5. Entre os *Lactobacillus* avaliados predominou aqueles qualificados como DL, ou seja, formadores dos dois isômeros óticos, L(+) e D(-) lactato.
6. Linhagens de *Lactobacillus* isolados de processos industriais podem se prestar para produções de isômeros óticamente puros para outras finalidades biotecnológicas.

6 REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes na fermentação alcoólica em microdestilarias. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.3, p.42-49, 1984.

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1994.

AMORIM, H.V. de. **Fermentação alcoólica – ciência e tecnologia**. Pesquisa de R.M. LEÃO. Piracicaba: Fermentec, 2005. 1v.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v.2, n.5, p.12-18, 1982.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E. A.; BASSO, L.C.; GALLO, C. R. **Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento**, Piracicaba: FERMENTEC; ESALQ, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1989. 145p.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C. R.; GARCIA, C.E.; GODOY, A.; DALLAQUA, M.; CHERUBIN, R.A. **Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica – Microscopia**. Piracicaba: FERMENTEC, 2003. 74p.

AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Applied Microbiology**, New York, v. 8, p. 263-268, 1960.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.77-88, 1997.

BORZANI, W. Control of contamination level in repeated batch ethanol fermentation of unsterilized molasses media. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 8, p. 187-190, 1986.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** 2003. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

EARLY, R. **Tecnología de los productos lácteos.** Zaragoza: Acríbia, 459p. 1998.

ESSIA NGANG, J.J.; LETOURNEAU, F. WOLNIEWICZ, E.; VILLA, P. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.33, p.490-493, 1990.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1989. 338p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1990. 338p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica, **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.9, p.45-55, 1991.

GARVIE, E.I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.44, p.106-139, 1980.

GOFFIN, P.; DEGHOAIN, M.; MAINARDI, J.; TYGAT, I.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M.; KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P. Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.187, p.6750-6761, 2005.

HOJVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 26, p. 87-107, 2000.

KAJI, D.A. **Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica.** 1989. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.49, p.209-224, 1983.

KANDLER, O.;WEISS, N. Lactobacillus. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. 2, p. 1209-1234, 1986.

KITAHARA, K. Wild lactobacilli. **Journal of Agricultural Chemistry Society in Japan**, Osaka, v.16, p.819-825, 1940.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI,W. **Biotechnologia**: Tecnologia das fermentações. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v.1. 286p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger – Princípios de bioquímica**. 3.ed., São Paulo: Sarvier, 2002. 1v. 975p.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS de, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, p.63-68, 2001.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.25, p.103-121, 1983

MANOME, A.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, Curitiba, v. 44, p.371–374, 1998.

MOMOSE, H.; TONOIKE, T. Studies on the putrefactive fermentation of sake mash (XIII). On endogenous respiration of sake yeast cultured with putrefactive lactic acid bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v.46, p.765-771, 1968.

NARENDRANATH. N.V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, n.11, p.4158-4163, 1997.

NODA, F. HAYASHI, K.; MIZUNUMA, T. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeast in brine fermentation of soy sauce. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.40, p.452-457, 1980.

OLIVA-NETO, P. de. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 1990, 200p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

OLIVA-NETO, P. de; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.10, p.697–699, 1994.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**; Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1996, 89p.

PELCZAR-JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, NR. **Microbiologia – Conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 524p.

PENNA, C. Lactobacillus acidophilus e a indústria de laticínios. **Revista leite & Derivados**, São Paulo, n. 66, p.125-127, 2002.

PIETROBON, V.C. **Avaliação da microbiota do melaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Genética, 2005. 32p.

SCHLEIFER, K.H. Gram-positive cocci. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, v.2, p. 999-1103, 1986.

TANI, Y.; SCHIMOIDE, M.; SUMINO, K.; FUKUI, S. Influence of culture condition on coagulation of *Saccharomyces sake* occurring in media containing lactic acid. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v.41, p.445-450, 1963.

WEYMARN, N.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, London, v.37, p.1207-1213, 2002.

WHITTENBURRY, J.R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, Curitiba, v.35, p.13-26, 1964.

YOKOYA, F.; MANFIO, G.P.; VARIANE, S.F. **Curso de Treinamento: Bactérias Lácticas na Fermentação Alcoólica**, Campinas: FUNDAÇÃO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA "ANDRÉ TOSELLO", 1997. 167p.

ZHOU, S; SHANMUGAM, K.T. E INGRAM, L.O. Functional replacement of the *Escherichia coli* D(-)-lactate dehydrogenase gene (ldhA) with the L(+)-lactate dehydrogenase gene (ldhL) from *Pediococcus acidilactici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, n. 4, p.2237-2244, 2003.

ANEXO

Tabela 3 - Formação de ác. láctico(mM), L(+)-lactato(%), D(-)-lactato(%), ác. acético (mM), etanol(mM), D.O. (600nm) e UFCx10⁸/mL

Continua

Código	Espécie	Ác. Láctico (mM)	L(+)-lactato (%)	D(-)-lactato (%)	Ac. Acético (mM)	Etanol (mM)	D.O. (600nm)	(UFC x 10 ⁸ /mL)
FT008B1	<i>L. fermentum</i>	52,3	43,6	56,4	22,8	23,1	2,35	0,80
FT008B2		61,3	43,7	56,3	26,6	26,3	2,32	0,80
FT008B3		64,5	41,9	58,1	26,9	27,6	2,42	1,10
MÉDIA		59,4	43,1	56,9	25,4	25,7	2,36	0,90
DESVPAD		6,32	1,01	1,01	2,30	2,29	0,05	0,17
FT059B1	<i>L. plantarum</i>	105,0	30,0	70,0	2,5	0,0	1,81	1,80
FT059B2		93,5	32,7	67,3	2,5	0,0	2,55	2,70
FT059B3		95,2	34,0	66,0	2,5	0,0	1,56	3,70
MÉDIA		97,9	32,2	67,8	2,5	0,0	1,97	2,73
DESVPAD		6,17	2,04	2,04	0,00	0,0	0,51	0,95
FT085B1	<i>L. plantarum</i>	67,6	97,9	2,1	1,7	0,0	1,60	0,79
FT085B2		61,9	97,3	2,7	1,7	0,0	1,64	0,38
FT085B3		73,2	96,5	3,5	1,7	0,0	1,56	0,42
MÉDIA		67,6	97,2	2,8	1,7	0,0	1,60	0,53
DESVPAD		8,02	0,70	0,70	0,00	0,0	0,06	0,23
FT086B1	<i>L. plantarum</i>	107,6	28,2	71,8	1,7	0,0	2,48	9,10
FT086B2		125,4	24,6	75,4	3,3	0,0	2,58	13,00
FT086B3		127,0	25,9	74,1	3,3	0,0	2,65	11,90
MÉDIA		120,0	26,2	73,8	2,8	0,0	2,57	11,33
DESVPAD		10,76	1,82	1,82	0,97	0,0	0,09	2,01

Tabela 3 - Formação de ác. láctico(mM), L(+)-lactato(%), D(-)-lactato(%), ác. acético (mM), etanol(mM), D.O. (600nm) e UFCx10⁸/mL

Continuação

Código	Espécie	Ác. Láctico (mM)	L(+)-lactato (%)	D(-)-lactato (%)	Ac. Acético (mM)	Etanol (mM)	D.O. (600nm)	(UFC/mL)
FT124B1	<i>L. fermentum</i>	52,5	0	100	22,5	21,0	2,28	0,28
FT124B2		49,3	0	100	21,9	22,0	2,31	0,31
FT124B3		62,7	0	100	26,5	26,9	2,32	0,39
MÉDIA		54,8	0,0	100,0	23,6	23,3	2,30	0,33
DESVPAD		6,98	0,00	0,00	2,52	3,13	0,02	0,06
FT188B1	<i>L. buchneri</i>	61,4	45,9	54,1	27,3	26,1	2,27	1,60
FT188B2		61,9	45,5	54,5	27,1	25,5	2,12	1,80
FT188B3		71,2	45,7	54,3	44,4	30,3	2,28	1,70
MÉDIA		64,8	45,7	54,3	27,2	27,3	2,22	1,70
DESVPAD		5,48	0,20	0,20	9,93	2,59	0,09	0,10
FT209B1	<i>L. vaccinostercus</i>	60,2	86,7	13,3	5,6	0,0	1,34	7,10
FT209B2		69,1	62,3	37,7	10,0	1,6	1,50	6,70
FT209B3		75,0	61,3	38,7	11,5	3,2	1,73	9,20
MÉDIA		67,9	70,1	29,9	9,0	2,4	1,52	7,67
DESVPAD		6,11	14,38	14,38	3,09	1,12	0,20	1,34
FT243B1	<i>L. fructosus</i>	85,4	95,8	4,2	1,7	0,0	0,94	4,70
FT243B2		62,6	98,0	2,0	1,7	0,0	0,96	3,60
FT243B3		60,3	95,9	4,1	2,5	0,0	0,91	2,90
MÉDIA		61,5	96,6	3,4	2,0	0,0	0,94	3,73
DESVPAD		1,64	1,24	1,24	0,48	0,0	0,03	0,91

Tabela 3 - Formação de ác. láctico(mM), L(+)-lactato(%), D(-)-lactato(%), ác. acético (mM), etanol(mM), D.O. (600nm) e UFCx10⁸/mL

Continuação

Código	Espécie	Ác. Láctico (mM)	L(+)-lactato (%)	D(-)-lactato (%)	Ac. Acético (mM)	Etanol (mM)	D.O. (600nm)	(UFC/mL)
FT260B1	<i>L. coryniformis</i>	48,9	100,0	0,0	2,5	0,0	0,93	1,10
FT260B2		60,2	98,4	1,6	1,7	0,0	1,06	1,30
FT260B3		68,4	97,7	2,3	1,7	0,0	1,40	1,20
MÉDIA		59,2	98,7	1,3	2,0	0,0	1,13	1,20
DESVPAD		9,80	1,18	1,18	0,5	0,0	0,24	0,10
FT282B1	<i>L. fermentum</i>	59,3	38,8	61,2	25,3	25,5	2,55	1,20
FT282B2		62,1	40,0	60,0	26,9	26,8	2,52	1,00
FT282B3		63,2	43,7	56,3	25,7	26,5	2,44	1,10
MÉDIA		61,6	40,8	59,2	26,0	26,3	2,50	1,10
DESVPAD		2,03	2,55	2,55	0,87	0,69	0,06	0,10
FT292B1	<i>L. fermentum</i>	66,4	38,8	61,2	28,0	28,1	2,46	2,75
FT292B2		64,4	41,6	58,4	27,0	27,1	2,47	2,90
FT292B3		68,4	39,6	60,4	29,0	29,2	2,44	2,60
MÉDIA		66,4	40,0	60,0	28,0	28,1	2,46	2,75
DESVPAD		2,88	1,18	1,18	1,38	1,55	0,02	0,21
FT337B1	<i>L. plantarum</i>	83,2	34,5	65,5	1,7	0,0	2,02	7,80
FT337B2		106,9	31,4	68,6	1,7	0,0	1,75	7,10
FT337B3		110,5	32,5	67,5	3,3	0,0	1,77	8,60
MÉDIA		100,2	32,8	67,2	2,2	0,0	1,85	7,83
DESVPAD		14,86	1,57	1,57	0,97	0,0	0,15	0,75

Tabela 3 - Formação de ác. láctico(mM), L(+)-lactato(%), D(-)-lactato(%), ác. acético (mM), etanol(mM), D.O. (600nm) e UFCx10⁸/mL) Continuação

Código	Espécie	Ác. Láctico (mM)	L(+)-lactato (%)	D(-)-lactato (%)	Ac. Acético (mM)	Etanol (mM)	D.O. (600nm)	(UFC/mL)
FT382B1	<i>L. plantarum</i>	73,5	100,0	0,0	2,79	0,0	1,06	2,30
FT382B2		76,3	100,0	0,0	3,90	0,0	1,02	1,90
FT382B3		66,6	100,0	0,0	2,69	0,0	0,98	1,90
MÉDIA		72,1	100,0	0,0	3,1	0,0	1,02	2,03
DESVPAD		4,9	0,00	0,00	0,7	0,0	0,04	0,23
FT383B1	<i>L. fructosus</i>	66,8	54,1	45,9	19,0	25,8	1,51	4,80
FT383B2		62,1	55,1	44,9	20,1	28,4	1,43	5,00
FT383B3		60,2	51,8	48,2	20,4	31,4	1,36	4,90
MÉDIA		63,0	53,7	46,3	19,8	28,5	1,43	4,90
DESVPAD		3,40	1,69	1,69	0,74	2,80	0,08	0,10
FT401B1	<i>L. fructivorans</i>	90,9	38,9	61,1	3,3	0,0	1,82	9,10
FT401B2		97,5	38,0	62,0	3,3	0,0	1,92	7,50
FT401B3		107,8	35,4	64,6	2,5	0,0	1,99	8,70
MÉDIA		98,7	37,4	62,6	3,1	0,0	1,91	8,43
DESVPAD		8,54	1,82	1,82	0,48	0,0	0,09	0,83
FT421B1	<i>L. fructivorans</i>	55,6	41,7	58,3	23,2	22,7	1,34	8,20
FT421B2		61,7	43,6	56,4	23,9	25,4	1,40	9,80
FT421B3		60,0	42,5	57,5	24,6	22,9	1,57	7,10
MÉDIA		59,1	42,6	57,4	23,9	23,6	1,44	8,37
DESVPAD		3,13	0,95	0,95	0,70	1,50	0,12	1,36

Tabela 3 - Formação de ác. láctico(mM), L(+)-lactato(%), D(-)-lactato(%), ác. acético (mM), etanol(mM), D.O. (600nm) e UFCx10⁸/mL) Conclusão

Código	Espécie	Ác. Láctico (mM)	L(+)-lactato (%)	D(-)-lactato (%)	Ac. Acético (mM)	Etanol (mM)	D.O. (600nm)	(UFC/mL)
FT432B1	L. fructosus	55,2	47,5	52,5	24,9	20,3	1,30	9,80
FT432B2		63,8	44,7	55,3	25,8	18,6	1,46	1,10
FT432B3		59,3	42,2	57,8	25,3	23,4	1,39	8,70
MÉDIA		59,4	44,8	55,2	25,3	20,8	1,38	6,53
DESVPAD		4,31	2,65	2,65	0,47	2,44	0,08	4,74

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)