
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM MATRIZ AMBIENTAL

ÂNGELA ROMERO LOPES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de Concentração : Microbiologia Aplicada.

Julho - 2013

ÂNGELA ROMERO LOPES

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM MATRIZ AMBIENTAL

Orientadora: Prof. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Co – orientador: Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Microbiologia
Aplicada.

Rio Claro - 2013

ÂNGELA ROMERO LOPES

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM MATRIZ AMBIENTAL

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Microbiologia
Aplicada.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezzi

Prof. Dr. Clóvis Parazzi

Prof. Dr. Jonas Contiero

Prof. Dr. Jorge Horii

Prof. Dra. Luciana Fontes Coelho

Rio Claro, 12 de Julho de 2013.

*Aos meus pais: João e
Ana Maria
Com Carinho, Dedico...*

AGRADECIMENTOS

- À Deus em primeiro lugar por me dar força e perseverança para enfrentar os desafios da área científica.
- Aos meus pais João Batista Simões Lopes e Ana Maria Romero Lopes por me darem apoio, carinho, incentivo e oportunidade de estudo.
- À minha orientadora Prof. Dra. Dejanira Franceschi de Angelis por sua amizade, admirável paciência, exemplo incansável de luta, dedicação e compromisso com a Ciência.
- Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi pela confiança, amizade, exemplo de dedicação e profissionalismo. Muito obrigada pela ajuda e incentivo.
- À Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte por sua dedicação, carinho, sempre presente para ajudar no que fosse preciso em todos os momentos.
- A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Instituto de Biociências para desenvolver esta pesquisa.
- Ao CPQBA (DMB) em especial a todos os meus amigos: Renata, Valéria, Brunno, Beatriz, Aline; aos técnicos do laboratório: Camila e Márcio; Adilson, Laura, Carol, Alessandra, pelo apoio e incentivo.
- Ao Laboratório de Bioaromas (FEA-UNICAMP) em especial a minha amiga Ana Paula Simiqueli pela valiosa ajuda nos ensaios realizados no biorreator.
- Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Bioquímica da UNESP campus de Rio Claro em especial: Inês; Beto; Fátima; Maria Luisa e Carmen.
- Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia de Rio Claro: Kate, Luciana, Adriano, Weilan, Roberta, Cesar, Bill, Grazy, Burnes, Fabrício, pelo apoio e incentivo.
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e melhoria deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a produção de ácido láctico por bactérias isoladas de alimentos deteriorados e da agroindústria. As cepas foram isoladas e purificadas pela técnica de diluição seriada e plaqueamento por superfície, utilizando solução salina e meio MRS sólido com adição de actidiona 0,5% e CaCO_3 0,3%, respectivamente. As fermentações foram conduzidas em frascos do tipo Schott, em meios MRS e MRS modificado com 40% de glicose, com e sem ajuste do pH, a temperatura de $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 96h. O inoculo foi padronizado a O.D. de 0,08 a 0,1, 625nm. Durante as fermentações foram avaliados o consumo da glicose (g.L^{-1}), o crescimento microbiano (UFC.mL^{-1}), a produção de ácido láctico (g.L^{-1}), o rendimento ($Y_{P/S}$) % e a produtividade (g/L.h^{-1}). As análises de quantificação do ácido láctico foram realizadas por Lactímetro® e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A maior produção de ácido láctico ($15,60 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida pela Cepa 22 em MRS modificado com um rendimento ($Y_{P/S}$) de 39,0 % e produtividade de $0,41 \text{ g/L.h}^{-1}$. Nas fermentações em biorreator a maior produção de ácido láctico ($18,23 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida pela Cepa 16 em MRS com um rendimento ($Y_{P/S}$) de 91,13 % e produtividade de $3,31 \text{ g/L.h}^{-1}$. As cepas 16 e 22 foram identificadas como gênero *Enterococcus*.

Palavras-chave: ácido láctico, fermentação láctica, lactobacilos, isômeros.

ABSTRACT

This work evaluated lactic acid production by isolated bacteria from spoiled food and agroindustry. Strains were isolated and purified by serial dilution in sterile saline solution and platings in MRS agar with 0.5% actidione and 0.3% of CaCO₃. Fermentations were performed in MRS media and MRS modified media with glucose 40%, with and without pH adjustment at temperature 35°C ± 2°C for 96h. The inoculum was standardized OD 0.08 to 0.1 at 625nm. The consumption of glucose (g.L⁻¹), microbial growth (CFU. mL⁻¹), lactic acid production (g.L⁻¹), yield (Y_{P/S})% and productivity (g/L.h⁻¹) were determined during fermentations. Lactic acid quantification were performed by Lactimeter® and high performance liquid chromatography (HPLC). The higher lactic acid content observed was (15.60 g.L⁻¹) strain 22 in MRS modified media with a yield (Y_{P/S}) of 39.0 % and productivity of 0.41 g/L.h⁻¹. In fermentations by bioreactor the higher lactic acid content observed was (18.23 g.L⁻¹) strain 16 in MRS media with a yield (Y_{P/S}) of 91.13% and productivity of 3.31 g/L.h⁻¹. The strains 16 and 22 were identified like genus *Enterococcus*.

Key words: lactic acid, lactic fermentation, lactobacilli, isomers.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Principais grupos filogenéticos das bactérias lácticas Gram positivas. | 15 |
| Figura 2. Vias catabólicas das bactérias lácticas. Metabolismos homofermentativo (A) e heterofermentativo (B). | 17 |
| Figura 3. Enantiômeros do ácido láctico. | 26 |
| Figura 4. Principais diferenças entre os métodos de obtenção do ácido láctico. | 29 |
| Figura 5. Esquema de preparo do pré - inóculo e inóculo nas fermentações lácticas. | 40 |
| Figura 6. Curva padrão da glicose. | 42 |
| Figura 7. Sistema operacional para verificar a produção de ácido láctico pelas cepas 16, 17, 18, 19, 22 e 24, nos meios MRS e MRS modificado, temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, mantido durante 96h de fermentação. | 50 |
| Figura 8. Quantificação da produção de ácido láctico e glicose residual em meio MRS modificado após 96h de fermentação, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, cepas 16; 17; 18; 19; 22 e 24. | 53 |
| Figura 9. Quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFC.mL ⁻¹) em meio MRS modificado após 96h de fermentação, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ | 53 |
| Figura 10. Representação da cinética de crescimento, produção de ácido láctico e consumo da glicose no cultivo da cepa 22, pH $5,3 \pm 0,2$ em meio MRS modificado, temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96h de fermentação. | 55 |
| Figura 11. Biorreator empregado para avaliar a produção de ácido láctico pelas cepas 16 e 22, em meio MRS após 26h de fermentação, temperatura de 36°C , 120 rpm. | 57 |
| Figura 12. Cinética de crescimento avaliada em Unidades Formadoras de colônias/mL (UFC.mL ⁻¹), produção de ácido láctico (gL ⁻¹) e consumo da glicose (gL ⁻¹) no cultivo da bactéria 16, em meio MRS, pH $5,3 \pm 0,1$, temperatura de 36°C em período de 26h. | 57 |
| Figura 13. Cinética de crescimento avaliada em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC.mL ⁻¹), produção de ácido láctico (gL ⁻¹) e consumo da glicose (gL ⁻¹) no cultivo da bactéria 22, em meio MRS, pH $5,3 \pm 0,1$, temperatura de 36°C em período de 26h. | 58 |
| Figura 14. Cromatograma padrão de ácido láctico. | 60 |
| Figura 15. Perfil cromatográfico do caldo fermentativo da Cepa 22 cultivada em meio MRS, após 26h de fermentação, temperatura de 36°C , 120 rpm, pH $5,3 \pm 0,1$ | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Perfil cromatográfico do caldo fermentativo da Cepa 16, cultivada em meio MRS, após 26h de fermentação, temperatura de 36°C, 120 rpm, pH 5,3 ± 0,1. | 61 |
| Figura 17. Cromatograma do padrão de ácido acético. | 62 |
| Figura 18. Metabolismo de ácidos mistos. Enzimas que catalisam as reações: 1- Lactato desidrogenase (LDH); 2- Piruvato Formiato Liase (PFL); 3- Piruvato Desidrogenase; 4- Acetaldeído desidrogenase (ACDH); 5- Álcool desidrogenase (ADHE); 6- Fosfotransacetilase (PTA); 7- Acetato quinase (ACK). | 63 |
| Figura 19. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais do gene rRNA 16S das cepas 16 e 22 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank. | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Divisões do gênero <i>Lactobacillus</i> em relação às características metabólicas e fenotípicas. | 19 |
| Tabela 2. Fonte dos isolados produtores de ácido láctico (produção de $5,0 \text{ gL}^{-1}$), procedências e principais características morfológicas das linhagens numeradas. | 46 |
| Tabela 3. Produção, rendimento e produtividade em ácido láctico pelas bactérias selecionadas, em meio MRS e MRS modificado sem ajuste do pH, após 96h. | 48 |
| Tabela 4. Quantificação da produção, rendimento e produtividade de ácido láctico dos isolados selecionados com controle do pH em meios MRS e MRS modificado após 96 horas de fermentação, $\text{pH } 5,3 \pm 0,2$ a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ | 50 |
| Tabela 5. Quantificação de ácido láctico (gL^{-1}), rendimento ($Y_{P/S}$) % e produtividade (g/L.h^{-1}) produzidos pelas cepas 16 e 22 em biorreator de 5L, em meio MRS, temperatura de 36°C , 120 rpm, $\text{pH} = 5,3 \pm 0,1$ período de 26 horas..... | 56 |
| Tabela 6. Quantificação do L (+) ácido láctico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e lactímetro para as cepas 16 e 22. | 59 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 2.1 Bioprospecção de bactérias lácticas..... | 13 |
| 2.2 Características gerais..... | 14 |
| 2.2.1 Gênero Lactobacillus..... | 17 |
| 2.2.2 Gênero Streptococcus..... | 20 |
| 2.2.3 Gênero Leuconostoc..... | 20 |
| 2.2.4 Gênero Pediococcus | 21 |
| 2.2.5 Gênero Enterococcus..... | 22 |
| 2.2.6 Gênero Lactococcus | 22 |
| 2.2.7 Outras bactérias lácticas | 23 |
| 2.3 Usos industriais e aplicações das bactérias lácticas..... | 24 |
| 2.4. Ácido láctico..... | 26 |
| 2.4.1. Propriedades (químicas e moleculares) | 26 |
| 2.4.2 Obtenção | 28 |
| 2.4.3 Parâmetros da fermentação láctica..... | 32 |
| 2.4.4 Aplicações do ácido láctico | 35 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 38 |
| 3.1 Bioprospecção de bactérias lácticas..... | 38 |
| 3.1.1 Coleta de amostras | 38 |
| 3.2 Meios de cultivo..... | 38 |
| 3.3 Isolamento e seleção das bactérias..... | 39 |
| 3.4 Fermentação láctica | 39 |
| 3.5 Métodos analíticos | 41 |
| 3.5.1 Quantificação enzimática do ácido láctico (lactímetro)..... | 41 |
| 3.5.2 Quantificação do ácido láctico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).. | 41 |
| 3.5.2.1 Validação do lactímetro por CLAE..... | 41 |
| 3.5.3 Determinação da concentração da glicose pelo método do ADNS (ácido 3-5 dinitro-salicílico) | 42 |
| 3.6 Método de análise molecular | 43 |
| 3.6.1 Caracterização dos isolados | 43 |
| 3.6.2 Extração e quantificação de DNA genômico..... | 43 |
| 3.6.3 Amplificação do DNA genômico..... | 44 |
| 3.6.4 Sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S | 45 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 46 |
| 4.1 Isolamento e seleção de bactérias lácticas..... | 46 |
| 4.2 Produção de ácido láctico..... | 47 |
| 4.3 Produção de ácido láctico com controle do pH..... | 49 |
| 4.4 Avaliação da produção de ácido láctico em biorreator de 5L | 55 |
| 4.5 Validação do lactímetro..... | 58 |

| | |
|--|----|
| 4.6 Avaliação da isomeria do ácido lático produzido durante as fermentações | 59 |
| 4.7 Avaliação do produto final de fermentação | 60 |
| 4.8 Identificação molecular das bactérias | 65 |
| 5. CONCLUSÕES | 66 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 67 |
| 7. APÊNDICE | 80 |
| 7.1 Apêndice A - Sequências parciais do operon RNA ribossomal dos isolados. | 80 |
| 7.2 Apêndice B - Aspectos morfológicos das colônias dos isolados de acordo com as procedências. | 82 |

1. INTRODUÇÃO

O grupo das bactérias lácticas é encontrado em ambientes naturais, tais como: efluentes, esgotos, água, laticínios, carnes e derivados, cerveja, vinho, vegetais, frutas, suco de frutas, entre outros. Estão presentes nos diferentes ecossistemas, contribuindo para manter o equilíbrio e funcionamento do mesmo, através da sua atividade biológica (BUCHANAN et al., 1974; HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000).

Tais bactérias desempenham um papel fundamental nos processos fermentativos industriais, sendo capazes de produzir substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas e os exopolissacarídeos; polímeros, compostos aromáticos, vitaminas, enzimas úteis e algumas exibem atividade probiótica (LEROY e VUYST, 2004).

Sua principal função nos alimentos é impedir o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (contaminantes), mediante a síntese de ácidos orgânicos, como o ácido láctico, que diminui o pH do meio, fazendo com que o período de conservação dos produtos fermentados seja prolongado (PIARD et al., 2005).

As bactérias lácticas podem ser utilizadas como inoculantes (aditivo) na produção de silagem tendo efeito positivo, bem como possível efeito probiótico, devido ao aumento dos níveis de ácido láctico, resultando na diminuição dos valores do pH e dos ácidos acético e butírico (AKSU et al., 2004).

Os polissacarídeos microbianos conferem maior textura e consistência aos alimentos, enquanto que a formação de compostos aromáticos por essas bactérias promovem a aceleração do processo de maturação na fabricação de queijos e a intensificação do sabor. Nesse processo são gerados aminoácidos livres, ácidos graxos e peptídeos, devido às atividades lipolíticas, proteolíticas e glicolíticas das enzimas produzidas pelas bactérias lácticas (AKSU et al., 2004).

Há necessidade de mais estudos sobre a diversidade de bactérias lácticas existentes nos diferentes nichos, em relação a sua localização, número de espécies desconhecidas e outras ainda não catalogadas, a função dessas comunidades bacterianas no ambiente e a relação com outros indivíduos (OLIVEIRA et al., 2006).

Empregando métodos de seleção, isolamento, cultivo de micro-organismos e a prospecção de novas linhagens é possível explorar e preservar essa fonte de recursos genéticos e empregá-los na melhoria dos processos biotecnológicos.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi à avaliação do potencial de produção de ácido láctico por bactérias isoladas de amostras ambientais provenientes de diferentes substratos, bem como sua caracterização taxonômica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioprospecção de bactérias lácticas

As comunidades de bactérias lácticas presentes no ambiente natural apresentam grande diversidade metabólica, sendo capazes de sintetizar ácidos orgânicos, ácidos graxos, peptídeos, polímeros, enzimas, substâncias antimicrobianas, sendo compostos bioativos decorrentes do seu metabolismo primário e, ou secundário. Sabe-se que vários ambientes precisam ser explorados para recuperar e isolar novas linhagens de bactérias lácticas e outros micro-organismos (OLIVEIRA et al., 2006).

A diversidade microbiana ainda é pouco conhecida; e o inventário atual da biodiversidade mundial ainda é muito incompleto para micro-organismos. Existe 1,7 milhões de espécies vivas no planeta, 5000 espécies de procariotos foram identificadas isso representa apenas de 1 a 12% de todas as espécies de bactérias existentes; temos pequena ideia da nossa real diversidade microbiana (BULL et al., 1992; WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE, 1992).

De acordo com Whitman et al., (1998) o número total estimado de bactérias pode ser tão elevado quanto 4 a 6 x 10³⁰, com maior proporção de células bacterianas possivelmente residentes na superfície oceânica e terrestre. Ainda, Dykhuizen et al., (1998) especulou que poderia haver aproximadamente 10 bilhões de espécies de bactérias no ambiente natural.

Em seus estudos, Torsvik et al., (2002) determinaram a abundância e diversidade de procariotos existentes. A abundância foi determinada por microscopia de fluorescência e a diversidade estimada por amostras de DNA coletadas e isoladas de diversos tipos de ambientes. A abundância (células/cm³) encontrada em solos de floresta foi estimada em 4,8 x 10⁹, solo de pastagem 1,8 x 10¹⁰, solo destinado ao plantio 2,1 x 10¹⁰ e sedimento marinho 3,1 x 10⁹.

As razões para pouco conhecimento sobre a diversidade microbiana baseiam-se nas limitações dos métodos de cultivo empregados, ambientes pouco ou nunca explorados (loais inóspitos de difícil acesso), identificações incorretas dos isolados depositados em coleções de culturas (BULL et al., 1992).

Alguns métodos e procedimentos são comumente utilizados para isolar e cultivar bactérias de interesse, sendo a cultura de enriquecimento a mais usual. Nesse caso, é possível obter em laboratório culturas de bactérias a partir de amostras ambientais, empregando meios de cultivo altamente seletivos objetivando triagem para produtos de interesse econômico (MADIGAN et al., 2008).

Entende-se por meios seletivos àqueles que possuem substâncias que inibem o crescimento de certas bactérias (indesejáveis), porém permitem o crescimento de outras de interesse biotecnológico (SOARES; RIBEIRO, 2002).

Em seu estudo, Rosales (1989) utilizou cinco meios de cultivo para isolar bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Elegeu o meio Multidiferencial de Lee (LMDA) (CASEY; INGLEDEW, 1981) mais rico nutricionalmente, para a detecção das bactérias lácticas presentes na amostra, enquanto que os outros quatro tratavam-se de meios seletivos para outras espécies de bactérias.

Ainda Rosales (1989), constatou que todos os diferentes grupos de bactérias cresceram vigorosamente no LMDA, não observando o mesmo quando as mesmas foram inoculadas em meios seletivos. Notou-se que os meios seletivos avaliados inibiram o crescimento das outras culturas que não aquelas a que se destinam.

2.2 Características gerais

Antes do século XX, o termo bactérias lácticas (BAL'S) não era comum e esses micro-organismos ficaram conhecidos pelos cientistas como “organismos que azedavam o leite”. A primeira cultura pura foi obtida por J. Lister em 1873 que provavelmente isolou um *Lactococcus lactis* (“lactis bactéria”) (AXELSSON, 2004).

Progresso importante foi alcançado na classificação dessas bactérias, a partir do estudo de Orla Jensen (1919). Características morfológicas, metabólicas (modo de fermentação da glicose) e fisiológicas (crescimento em temperaturas diferentes, configuração do ácido láctico produzido, tolerância a altas concentrações de sal, ácido ou base), serviram para agrupar gêneros diferentes que pertencem a um mesmo grupo. Os gêneros que incluem essas bactérias são: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Oenococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (AXELSSON, 2004) (Figura 1).

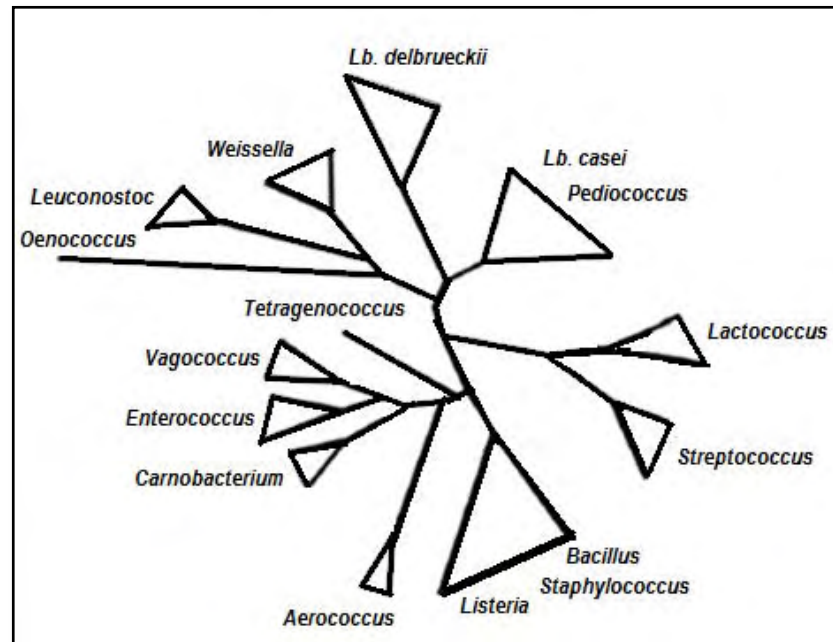


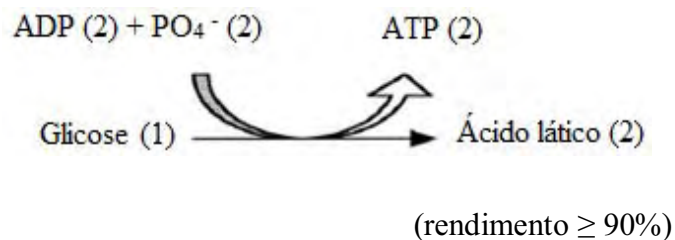
Figura 1. Principais grupos filogenéticos das bactérias lácticas Gram positivas (COLLINS et al., 1991)

De um modo geral, as BAL'S constituem um grupo de bactérias Gram positivas, podem ocorrer na forma de cocos ou bacilos, em cadeia ou isoladamente, motilidade ausente, não formam esporos, não são patogênicas (reconhecidas como "GRAS"– Generally Recognised As Safe), anaeróbias facultativas, quimioheterotróficas, desprovidas de citocromos, incapazes de sintetizar ATP mediante respiração, catalase negativa, não produzem indol e ácido sulfídrico, ácido-tolerantes, fastidiosas, estritamente fermentativas. O ácido láctico é o principal produto final obtido durante a fermentação de carboidratos (AXELSSON, 2004; BUCHANAN et al., 1974; HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000,).

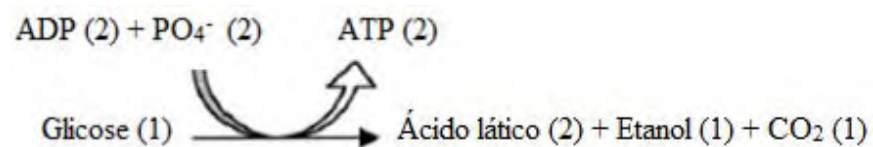
Por meio da fosforilação de substratos (fermentação) degradam a glicose anaerobicamente obtendo energia para manutenção de células e síntese de macromoléculas. Duas vias podem ser utilizadas na conversão da glicose, a mais usual é a glicólise conhecida

como via Embden – Meyerhof - Parnas (EMP), enquanto que a via pentose fosfato também é utilizada por esses gêneros de bactérias (AXELSSON, 2004).

O produto final da glicólise resulta exclusivamente em ácido láctico e o metabolismo é referido como fermentação homolática, na qual o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico pela ação da enzima lactato desidrogenase. Nesse tipo de metabolismo as bactérias convertem 1 molécula de glicose em 2 moléculas de ácido láctico (Figura 2). A equação 1 descreve o equilíbrio geral da via EMP para bactérias homoláticas:



A equação 2 descreve o equilíbrio geral do catabolismo heterofermentativo, com geração de subprodutos:



Fonte: Bogaert e Naidu (2010).

Entretanto na fermentação heterolática quantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono e etanol ou acetato são formados a partir da glicose pela fosforilação oxidativa das pentoses sendo que o ácido pirúvico e o acetaldeído são substâncias intermediárias dessa via para formar o etanol (Figura 2).

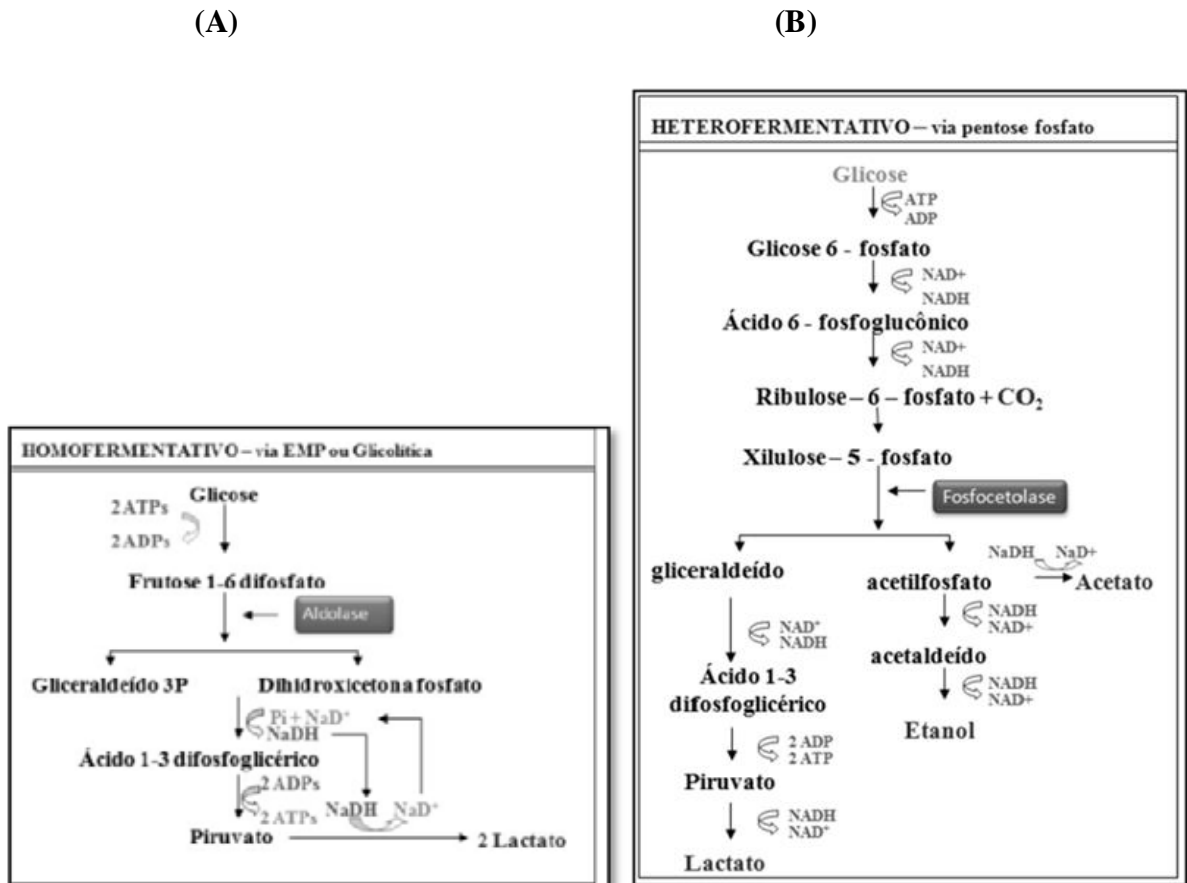


Figura 2. Vias catabólicas das bactérias lácticas. Metabolismos homofermentativo (A) e heterofermentativo (B) (COELHO, 2011).

Geralmente essas bactérias estão associadas a ambientes ricos em nutrientes como: produtos de alimentos (leite, carnes, bebidas, frutas, vegetais, plantas, picles), efluentes, esgoto, solo; alguns membros desse grupo compõe a flora normal da boca, trato intestinal, bem como a vagina de animais homeotérmicos (BUCHANAN et al., 1974; HOFVENDAHL; HÄGERDAL, 2000).

2.2.1 Gênero *Lactobacillus*

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* dispõem de características semelhantes àquelas anteriormente descritas para bactérias lácticas: bacilos ou cocos Gram positivos, são incapazes de formar esporos, são estritamente fermentativas, anaeróbias ou aerotolerantes, acidófilas, requerimento nutricional complexo, C + G no DNA abaixo de 50% mol. Os lactobacilos são encontrados na mucosa de homens e animais, plantas, em substratos

ricos contendo carboidratos disponíveis, em alimentos fermentados. Vários compostos como: citrato, malato, ácido tartárico, quinolato, nitrato, nitrito, são metabolizados e utilizados como fonte de energia por uma força próton motora ou aceptores de elétrons (HAMMES; VOGEL, 1995).

De acordo com Hammes e Vogel (1995), os lactobacilos podem ser classificados em três grupos quanto ao tipo de fermentação da hexose:

Grupo 1. Homofermentativos obrigatórios: as hexoses são quase que exclusivamente fermentadas (>85%) a lactato pela via Embden - Meyerhof - Parnas (EMP). Esses microorganismos possuem a enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase. A ausência da enzima fosfocetolase faz com que as pentoses ou o gluconato não sejam fermentados.

Grupo 2. Heterofermentativos obrigatórios: as hexoses são fermentadas pela via fosfogluconato produzindo lactato, etanol, ácido acético e dióxido de carbono em quantidades equimolares. As pentoses entram nesta via e devem ser fermentadas.

Grupo 3. Heterofermentativos facultativos: as hexoses são quase exclusivamente fermentadas em ácido láctico pela via EMP. Os microorganismos possuem a aldolase e a fosfocetolase, não somente a hexose é fermentada, mas também pentoses (frequentemente o gluconato). Na presença da glicose, as enzimas da via fosfogluconato são reprimidas. Em baixas concentrações de substrato e condições estritamente anaeróbias, algumas espécies heterofermentativas facultativas devem produzir acetato, etanol e formato no lugar do lactato (partindo-se do piruvato).

A classificação taxonômica referente às características metabólicas e fenotípicas do gênero *Lactobacillus* é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Divisões do gênero *Lactobacillus* em relação às características metabólicas e fenotípicas.

| Caráter | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | Homofermentativos obrigatórios | Heterofermentativos facultativos | Heterofermentativos obrigatórios |
| Fermentação pentose | - | + | + |
| CO ₂ da glicose | - | - | + |
| CO ₂ do gluconato | - | + ^a | + ^a |
| Presença da FDP aldolase | + | + | - |
| Presença da fosfoctetolase | - | + ^b | + |
| | <i>Lb. acidophilus</i> | <i>Lb. acetolerans</i> | <i>Lb. brevis</i> |
| | <i>Lb. amylophilus</i> | <i>Lb. agilis</i> | <i>Lb. buchneri</i> |
| | <i>Lb. amylovorus</i> | <i>Lb. alimentarius</i> | <i>Lb. collinoides</i> |
| | <i>Lb. aviarius</i> | <i>Lb. bifementans</i> | <i>Lb. fermentum</i> |
| | subsp. <i>araffinosus</i> | | |
| | subsp. <i>aviarius</i> | | |
| | <i>Lb. crispatus</i> | <i>Lb. casei</i> | <i>Lb. fructivorans</i> |
| | <i>Lb. delbrueckii</i> | <i>Lb. coryniformis</i> | <i>Lb. fructosus</i> |
| | subsp. <i>bulgaricus</i> | subsp. <i>coryniformis</i> | |
| | subsp. <i>delbrueckii</i> | subsp. <i>torquens</i> | |
| | subsp. <i>lactis</i> | | |
| | <i>Lb. farciminis</i> | <i>Lb. curvatus</i> | <i>Lb. hilgardii</i> |
| | <i>Lb. gallinarum</i> | <i>Lb. graminis</i> | <i>Lb. kefir</i> |
| | <i>Lb. gasseri</i> | <i>Lb. hamsteri</i> | <i>Lb. malefermentans</i> |
| | <i>Lb. helveticus</i> | <i>Lb. homohiochii</i> | <i>Lb. oris</i> |
| | <i>Lb. jensenii</i> | <i>Lb. intestinalis</i> | <i>Lb. panis</i> |
| | <i>Lb. johnsonii</i> | <i>Lb. murinus</i> | <i>Lb. parabuchneri</i> |
| | <i>Lb. kefiranoferens</i> | <i>Lb. paracasei</i> | <i>Lb. parakefir</i> |
| | | subsp. <i>paracasei</i> | |
| | | subsp. <i>tolerans</i> | |
| | <i>Lb. Kefirgranum</i> | <i>Lb. paraplantarum</i> | <i>Lb. pontis</i> |
| | <i>Lb. Mali</i> | <i>Lb. pentosus</i> | <i>Lb. reuteri</i> |
| | <i>Lb. ruminis</i> | <i>Lb. plantarum</i> | <i>Lb. sanfrancisco</i> |
| | <i>Lb. salivarius</i> | <i>Lb. rhamnosus</i> | <i>Lb. suebicus</i> |
| | subsp. <i>salicinus</i> | | |
| | subsp. <i>salivarius</i> | | |
| | <i>Lb. sharpeae</i> | <i>Lb. Sake</i> | <i>Lb. vaccinostercus</i> |
| | | | <i>Lb. vaginalis</i> |

^a Quando fermentado,

^b Induzido por pentoses.

Fonte: Axelsson (2004); Stiles et al., (1997) modificado.

2.2.2 Gênero *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* possui grande variedade de espécies homofermentativas, alguns membros são patogênicos ao homem e animais. Apresentam-se na forma de cocos em corrente sendo responsáveis por infecções em fermentos (STILES et al., 1997).

Anaeróbios estritos, são nutricionalmente exigentes, requerem fontes ricas em carboidratos e proteínas podendo se desenvolver em tecidos, trato intestinal de animais, no leite, produtos de laticínios, material vegetal entre outros (JONES, 1978). Certos estreptococos desempenham papel importante na produção de manteiga, silagem e produtos fermentados; enquanto que outras espécies como *S. salivarius* e *S. vestibularis* estão associadas à formação de carie dental (MADIGAN et al., 2008; STILES et al., 1997).

S. thermophilus é utilizado juntamente com *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. lactis* e *Lb. helveticus* como culturas iniciadoras mistas, a uma temperatura ótima de crescimento acima de 40°C, na fabricação de leites fermentados, iogurtes bem como em queijos tipo italiano e suíço. Existe uma relação associativa entre essas espécies, em que a estirpe de *Streptococcus* produz ácido fórmico, que estimula o crescimento de *Lactobacillus*, que em troca realiza atividade proteolítica e produção de substância como o acetaldeído, que mantêm *Streptococcus* crescendo no leite (STILES et al., 1997).

2.2.3 Gênero *Leuconostoc*

O gênero *Leuconostoc* é composto por cocos heterofermentativos que ocorrem em pares ou em cadeias, muitos são produtores de polissacarídeo (dextrana extracelular) formam uma capa densa na superfície da colônia. Todos necessitam de meio de cultivo rico suplementado com fatores de crescimento e aminoácidos numa atmosfera anaeróbia; preferencialmente o pH inicial do meio deve ser de 6,5 e a temperatura ótima de crescimento variando entre 20 e 30°C. Suas células não apresentam motilidade, ausência de citocromos, catalase negativa, a arginina não é hidrolisada, não reduzem o nitrato, não são hemolíticos ou proteolíticos (MADIGAN, et al., 2008).

A glicose é fermentada em quantidades iguais de D (-) ácido láctico, CO₂ e etanol ou acetato por esses micro-organismos. Isto se deve a três rotas alternativas de conversão do piruvato pela ação das enzimas: lactato desidrogenase, piruvato desidrogenase e α -sintase acetolactato (HUYS; LEISNER; BJÖRKROTH, 2012).

Leuconostoc é o gênero predominante de bactérias lácticas em plantas (*L. mesenteroides*), principalmente nas raízes, material vegetal em decomposição; em produtos vegetais fermentados como pepino, repolho, azeitona, em laticínios; sendo responsável por alterações no odor, cor de alimentos deteriorados (HEMME; SCHEUNEMANN, 2004; KIM; CHUN, 2005; MÄKI, 2004).

Linhagens de *Leuconostoc* produzem os compostos aromatizantes diacetil e acetoína a partir da degradação do citrato; sendo empregadas como culturas iniciadoras na fermentação de laticínios. *Leuconostoc oenos* são empregados na produção de vinhos sendo responsáveis pela fermentação malolática, na qual o L - malato é convertido a L (+) lactato e CO₂. Trata-se de bactérias acidófilas, toleram pH ≤ 3,5, crescem naturalmente em mostos de uva e vinho; não são inibidas pela presença do etanol e altas concentrações de SO₂. Ao contrário de *Leuconostoc oenos*, todos os *Leuconostoc* sp são produtores do isômero D (-) lactato a partir da glicose (VERSARI et al., 1999).

2.2.4 Gênero *Pediococcus*

Foram os primeiros micro-organismos estudados por Louis Pasteur, estão relacionados à deterioração de cerveja. Os membros desse grupo são Gram positivos, homofermentadores, utilizam a via EMP; como produto final da degradação da glicose todas as espécies produzem o isômero DL (racêmico) - ácido láctico; exceto *P. dextrinicus* que produz o L (+) ácido láctico (WEISS, 1992).

Necessitam de requerimento complexo de carboidratos fermentescíveis para um bom crescimento; a lactose não é facilmente metabolizada por esses micro-organismos dificultando o seu crescimento no leite. Todas as espécies deste grupo fermentam: frutose, manose, celobiose, galactose maltose e sacarose. Como exceção as espécies *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceuse* e *P. clausenii* não fermentam a sacarose (DOBSON, et al., 2002).

Como características gerais não apresentam motilidade, são catalase negativos, apresentam-se como células esféricas uniformes, organizadas em tétrades e ao contrário de outros cocos, não formam cadeias de células. Em meios de cultivo com baixa concentração de carboidratos, a pseudocatalase de algumas linhagens pode exibir atividade (WEISS, 1992).

Normalmente são encontrados em baixo número junto com *leuconostoc* e *lactobacilos* em materiais vegetais, em vários tipos de alimentos, são agentes deteriorantes de bebidas alcoólicas principalmente de cervejas; empregados em culturas iniciadoras na fermentação de

salsicha (*P. acidilactici* e *P. pentosaceus* produtores de bacteriocinas) (HOLZAPFEL et al., 2006).

Inicialmente pediococos presentes em plantas e cerveja foram incluídos em uma única espécie *P. cerevisiae*, mas devido a características metabólicas foram reclassificados em *P. damnosus* e *P. pentosaceus* (RACCACH, 1987).

Algumas estirpes exibem tolerância extrema a altas temperaturas, valores de pH baixos e alta concentração de NaCl. *P. acidilactici* cresce a 50°C, enquanto que *P. damnosus* são acidófilos e crescem em temperaturas mais baixas; *P. halophilus* crescem em 18% de NaCl (STILES, et al., 1997).

2.2.5 Gênero *Enterococcus*

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* apresentam células na forma de cocos, podendo ser únicas, formar pares ou cadeias; são Gram positivos, não formadores de esporos, catalase negativos, sendo que algumas linhagens exibem pseudocatalase ativa. São anaeróbios facultativos, metabolismo do tipo homofermentativo, sendo o produto final da fermentação da glicose o L (+) ácido láctico. Necessitam de muitas vitaminas e aminoácidos para se desenvolver, crescem entre 10°C a 45°C, em meio com 6,5% de NaCl, pH 9,6, suportam aquecimento a 60°C por 30 min., resistindo bem a condições hostis. Ocorrem naturalmente no solo, material vegetal, em insetos, na microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais, em alimentos crus e processados, no leite pasteurizado, queijos, contaminantes de carnes. Empregados na fabricação de queijos podem ser utilizados como probióticos, além de produzirem bacteriocinas. *Enterococcus* sp apresentam atividade proteolítica sobre as proteínas do leite: caseína, α – lactalbumina, β – lactoglobulina e soro albumina bovina (GARCÍA, 2011).

2.2.6 Gênero *Lactococcus*

Trata-se de cocos Gram positivos de cadeia curta, com 5,0 a 1,5 μ m de tamanho, mesófilos, homofermentativos. Produzem L (+) lactato em temperatura ótima de crescimento de 30°C, necessitam de meios de cultivo nutricionalmente ricos e complexos para um bom

desenvolvimento. Tem sido isolados de materiais vegetais (CAI et al., 2011), leite, outras fontes animais, intestino humano (KUBOTA et al., 2010), lodo (CHO et al., 2008).

Espécies de *L. lactis* são frequentemente encontrados no leite “in natura”, de modo não processado, enquanto que *L. garvieae* foram isolados de casos de mastite em gado leiteiro (COLLINS et al., 1983), em produtos de laticínios e peixe. Os isolados de laticínios fermentaram lactose enquanto que os de peixe foram incapazes de fermentar o mesmo açúcar (FORTINA et al., 2003).

De grande importância na indústria de laticínios *L. lactis* subespécie *lactis* e *cremoris* juntamente com *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *cremoris* são largamente empregados na produção de leites fermentados e queijos; funcionam como culturas iniciadoras mesofílicas. *L. lactis* subespécie *lactis* toleram ambientes salobros (altas % de NaCl), hidrolisam a arginina, bem como, produzem diacetil, substância que confere sabor amanteigado aos alimentos. Os lactococos produtores de aroma utilizam uma via secundária a partir do citrato presente no leite, para gerar diacetil; isso é possível devido à ação da citrato permease (HUGENHOLZ, 1993).

2.2.7 Outras bactérias lácticas

O gênero *Carnobacterium* compreende bacilos Gram positivos, que ocorrem únicos ou em pares (algumas vezes cadeias curtas), catalase ausente, tolerante a baixas temperaturas (COLLINS et al., 1987). A maioria das estirpes de carnobactéria são produtoras do L (+) ácido láctico pela via glicolítica. Outros subprodutos como: ácidos acético e fórmico são formados anaerobicamente e a acetoína aerobicamente com liberação de CO₂ a partir da descarboxilação do ácido pirúvico. Uma característica que as difere das demais bactérias lácticas, é ter seu crescimento inibido em meio de cultivo contendo acetato (BORCH; MOLIN, 1989).

Membros do gênero *Tetragenococcus* são cocos formadores de tétrades, homofermentativos aeróbicos facultativos, halófilos que crescem de 6,5% a 25% de NaCl, são produtores do L (+) ácido láctico. Largamente empregados em processos de fermentação halófila, na produção de pasta de soja, molho de soja, pasta de anchovas, mostarda fermentada (JUSTÉ et al., 2008).

Weissellas são micro-organismos quimio-organotróficos anaeróbicos facultativos, bacilos curtos ou ovoides, ocorrem em pares ou cadeias curtas; catalase negativos, não

possuem citocromos (BJÖRKROTH et al., 2009; COLLINS et al., 1993). Os carboidratos são fermentados via hexose e via fosfoacetolase, são heterofermentativos. Os produtos finais da fermentação da glicose são: CO₂, acetato ou etanol e isômeros D (-) ou DL - ácido lático (dependendo da espécie). O crescimento é favorecido a 15°C e para algumas espécies varia de 42°C a 45°C (HOLZAPFEL; VAN WYK, 1982).

2.3 Usos industriais e aplicações das bactérias lácticas

O grupo das bactérias lácticas desempenha papel importante nos processos fermentativos industriais. São capazes de produzir polímeros, vitaminas, enzimas de extrema importância, substâncias antimicrobianas, exopolissacarídeos, bacteriocinas, ácidos orgânicos (ácido lático, acético, etanol, propiônico) e algumas espécies exibem atividade probiótica (LEROY; VUYST, 2004).

A principal função das bactérias lácticas nos alimentos é promover a acidificação, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos. Isso faz com que o período de conservação dos produtos fermentados seja muito maior se comparados naqueles onde a matéria-prima não passou pela fermentação láctica. O ácido acético produzido pelo metabolismo heterofermentativo da glicose atua como inibidor de crescimento de leveduras, fungos e bactérias; enquanto que o ácido propiônico age preferencialmente contra fungos e leveduras, funcionando como agentes antimicrobianos (PIARD et al., 2005).

Os ácidos fracos na sua forma não dissociada (neutro) são tóxicos para as células; como são lipossolúveis permeiam pela membrana plasmática e entram no citoplasma. Uma vez dentro do citoplasma que possui pH interno próximo do neutro, serão dissociados e a liberação desses prótons leva a acidificação. A acumulação de ânions diminui a síntese de macromoléculas e afetam o transporte dentro da membrana inibindo o crescimento. (HOFVENDAHL; HAGERDAL, 1997).

A produção de bacteriocinas é comum entre as bactérias lácticas, trata-se de peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos, que promovem a supressão de microorganismos associados a sabores desagradáveis em alimentos, patógenos e produtores de esporos. São atuantes contra algumas espécies de bactérias: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (LEROY; VUYST, 2004).

A bacteriocina nisina (lantibiótico – classe I) tem sido extensivamente estudada e investigada, sendo seu uso nos alimentos aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) da União Europeia. É comumente empregada em queijos processados, produtos de laticínio pasteurizado podendo ser incorporada diretamente no alimento, na forma imobilizada, útil no tratamento e prevenção de infecções humanas e aplicada em produtos veterinários (DELVES et al., 1996 ; GUINANE et al., 2005).

Algumas estirpes de bactérias lácticas exibem atividade probiótica ao serem ingeridas vivas por um hospedeiro, promovendo um efeito benéfico. A ingestão de iogurte é recomendada em casos de indivíduos intolerantes a lactose; devido à deficiência na produção da lactase (PIARD et al., 2005).

É comum o aparecimento de sintomas tais como: diarreias, cólicas abdominais ou flatulência; problemas que podem ser minimizados pela suplementação com enzimas produzidas por micro-organismos encontrados em produtos fermentados. As enzimas lactase e β - galactosidase promovem a hidrólise parcial da lactose aumentando a sua digestibilidade; outra atividade probiótica é a presença dessas bactérias na flora do hospedeiro formando uma barreira protetora contra patógenos (DE VRESE et al., 2001; PIARD et al., 2005).

Além das atividades probióticas, a biossíntese de riboflavina tem sido descrita por alguns gêneros de estreptococos e enterococos (KEUTH; BISPING, 1993), bem como *Lactobacillus reuteri* CRL 1098, que é capaz de metabolizar o glicerol para produzir outro tipo de vitamina B₁₂ (TARANTO et al., 2003).

Lactococcus lactis, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus plantarum* são capazes de sintetizar o folato, vitamina com propriedades antioxidantes que protege o genoma contra o ataque de radicais livres. *L. acidophilus* é capaz de aumentar a concentração dessa vitamina em leites fermentados (LIN; YOUNG, 2000; SYBESMA et al., 2003).

Como inoculantes as bactérias lácticas exercem um efeito positivo (probióticos) na silagem, com aumento da acidez nesse ambiente, previne o crescimento de *Clostridium tyrobutyricum* evitando produção dos ácidos: acético e butírico que diminuem a patabilidade da silagem (AKSU et al., 2004).

2.4. Ácido láctico

2.4.1. Propriedades (químicas e moleculares)

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico), $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ é um ácido orgânico fraco possui um α - carbono assimétrico (centro quiral) que apresenta dois grupos funcionais principais: - COOH, - OH. Devido à presença desses dois grupos exibe uma reatividade variável podendo atuar como ácido ou álcool.

Isso permite sua existência como duas formas enantioméricas L (+) e D (-) (Figura 3), que diferem na sua interação com a luz plano polarizada.

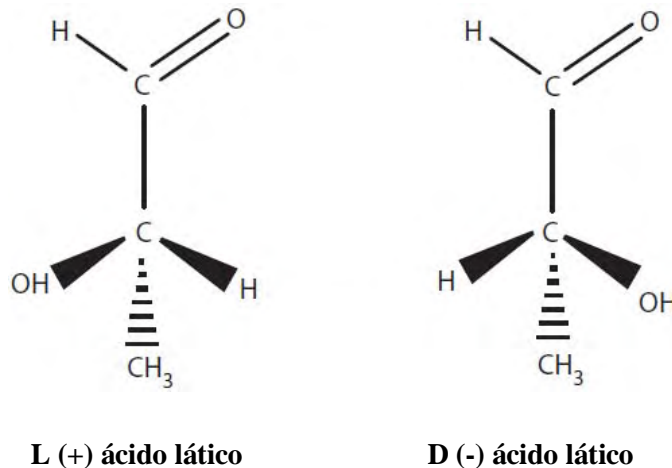


Figura 3. Enantiômeros do ácido láctico (HO et al., 2010).

O enantiômero L (+) ácido láctico gira o plano da luz polarizada no sentido horário (para a esquerda, efeito levro-rotatório), enquanto que o enantiômero D (-) ácido láctico gira no sentido anti-horário (para a direita, efeito destro-rotatório). Quando há uma mistura racêmica (DL - ácido láctico), ou seja, quantidades equimolares dos dois enantiômeros; estes não apresentam rotação óptica (GUPTA et al., 2007; LENINGHER, et al., 2010).

Durante a fermentação de carboidratos, diferentes espécies de bactérias lácticas produzem exclusivamente L (+) ácido láctico ou D (-) ácido láctico, quantidades aproximadamente iguais de ambos, ou predominantemente uma única forma sobre a outra.

Isto vai depender da presença de uma enzima NAD⁺ dependente específica conhecida como lactato desidrogenase (nLDH) e sua respectiva atividade (AXELSSON, 2004).

Quando D e L ácido láctico são formados ocorre a presença de duas enzimas a D (-) nLDH e a L (+) nLDH respectivamente. Somente poucas espécies, como por exemplo: *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sake* produzem uma enzima racemase capaz de converter L (+) ácido láctico em D (-) ácido láctico. Neste caso o L (+) ácido láctico inicialmente produzido induz a ação da racemase o qual resulta em uma mistura de DL - ácido láctico. Geralmente a concentração do L (+) ácido láctico é maior na fase inicial de crescimento dos micro-organismos, enquanto que o isômero D (-) é formado na fase estacionária (GARVIE, 1980 apud AXELSSON, 2004).

Manome et al., (1998) relataram que é possível identificar e classificar as bactérias lácticas a partir do tipo de isômero produzido. O tipo de isômero parece ser específico das linhagens e estável; sendo que nenhuma produz 100% de qualquer isômero.

Bactérias lácticas que produzem mais de 75% do isômero L (+) são classificadas como produtoras do tipo L, o mesmo sendo considerado para o isômero D (-) e os dois sendo produzidos em proporções intermediárias as classificam como produtoras do DL ácido láctico (racêmico) (KANDLER, 1983; VIANA et al., 2005).

Membros do gênero *Lactobacillus* podem produzir os dois tipos de isômeros, *Lb. maltaromicus*, *Lb. agilis*, *Lb. sharpae*, *Lb. amylophilus* e *Lb. murinus* produzem somente a forma L (+) ácido láctico, enquanto que *Lb. delbrueckii*, *Lb. vitulinus*, *Lb. coryniformis* produzem exclusivamente o D (-) ácido láctico, sendo as espécies *Lb. plantarum* e *Lb. helveticus* produtoras de DL – ácido láctico (racêmico). As condições do pH do meio e a idade das culturas deve influenciar a proporção dos isômeros D (-) / L (+) (GARVIE, 1967).

O ácido láctico está presente em várias formas de vida incluindo animais, plantas e micro-organismos; funcionando como um intermediário no metabolismo de carboidratos e aminoácidos.

Nos seres humanos o ácido láctico é encontrado em todos os tipos de tecidos, órgãos (rim, fígado), fluidos (líquido amniótico) e secreções biológicas. No sangue ($1.4 \mu\text{mol.ml}^{-1}$), espermatozoide ($4.1 \mu\text{mol.ml}^{-1}$), no suor ($4.0 - 40.0 \mu\text{mol.ml}^{-1}$), no fluido cérebro-espinhal ($1.6 \mu\text{mol.ml}^{-1}$) e na urina ($0.3 \mu\text{mol.ml}^{-1}$) (GEIGY, 1968; WINDHOLZ, et al., 1976).

Quantitativamente o enantiômero L (+) ácido lático é a forma mais comum (predominante) na natureza e nos seres humanos; sendo metabolizado pela enzima lactato - desidrogenase, tendo seus valores aumentados após a prática de atividades físicas intensas. Entretanto o D (-) ácido lático também é prevalente na natureza; pode formar sais unindo-se a metais, sendo detectado na urina de seres humanos e metabolizado no fígado. A forma DL ácido lático (racêmico) está presente no leite azedo, como resultado da fermentação das bactérias lácticas. Também é encontrado em melaços devido à conversão parcial de açúcares, em maçãs e outras frutas, em várias plantas superiores, principalmente no período da germinação, suco de tomate, cerveja, vinhos, entre outros (WINDHOLZ, et al.,1976).

2.4.2 Obtenção

O ácido lático pode ser obtido de três modos diferentes: no metabolismo animal, por síntese química e nos processos fermentativos microbianos.

Em condições aeróbias a energia requerida pelas células musculares é suprida pela degradação oxidativa da glicose, gerando molécula de alta energia, a adenosina trifosfato (ATP). Durante o estado de anaerobiose ou alta demanda de energia (esforço físico intenso), a maior parte do ácido pirúvico decorrente da glicólise é convertida em ácido lático, que fica acumulado nos tecidos musculares. O excesso de ácido na corrente sanguínea é absorvido pelo fígado e serve como precursor da glicose na gliconeogênese (LENINGHER, 2010).

Após a glicose ser re-sintetizada a partir da degradação oxidativa do lactato, passa para a corrente sanguínea, alcança as células musculares onde é transformada em energia fechando o “ciclo de Cori” (ALPERT, 1965; BRECHT, 1967).

A síntese química do ácido lático está baseada principalmente na hidrólise da lactonitrila por ácidos fortes, que resulta unicamente na mistura racêmica (DL) ácido lático. O ácido cianídrico é adicionado ao acetaldeído na presença de uma base para produzir a lactonitrila, sendo que esta reação ocorre em fase líquida à alta pressão atmosférica. A lactonitrila é recuperada e purificada por destilação sendo hidrolisada a ácido lático pela ação do ácido clorídrico ou ácido sulfúrico (MADHAVAN et al, 2010; NARAYANAN et al., 2004; VIJAYAKUMAR et al., 2008).

A Figura 4 mostra o esquema simplificado das duas formas de obtenção do ácido láctico: (A) Síntese química e (B) fermentação microbiana.

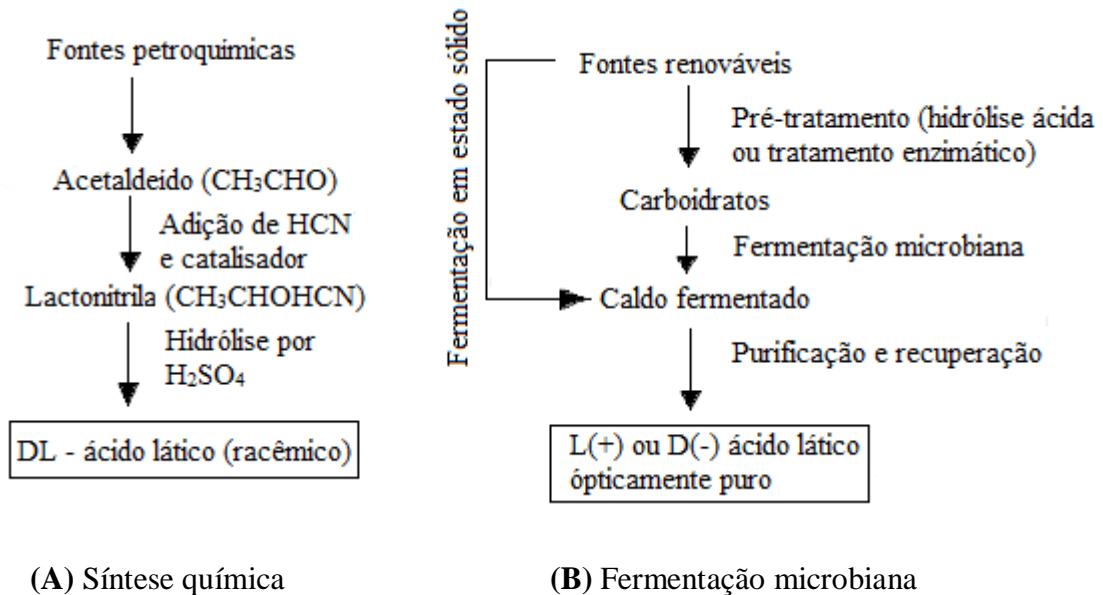


Figura 4. Principais diferenças entre os métodos de obtenção do ácido láctico. Fonte: Vijayakumar et al., (2008).

Nos processos fermentativos microbianos, cada tipo de isômero seja o L (+) ácido láctico ou D (-) ácido láctico opticamente puro, pode ser produzido individualmente ou misturado dependendo da estirpe empregada no processo (estéreo-especificidade da lactato - desidrogenase / LdhL ou LdhD), substrato utilizado, bem como, condições adequadas que favoreçam o crescimento.

O ácido láctico é produzido preferencialmente pela ação fermentativa de bactérias lácticas; entretanto fungos e leveduras também podem ser utilizados nos processos industriais, mas apresentam baixos rendimentos quando comparados às bactérias lácticas.

Algumas espécies de fungos filamentosos como *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus arrhizus* possuem enzimas com atividade amilolítica capazes de converter o amido diretamente em L (+) ácido láctico, em condições de aeração vigorosa, devido ao metabolismo aeróbio obrigatório. A baixa produtividade ($P = 3 \text{ g/L.h}^{-1}$) observada na fermentação por fungos pode

ser atribuída a limitada transferência de nutrientes e baixos rendimentos associados a formação de subprodutos como o ácido fumárico e o etanol (TAY; YANG, 2002).

Em suas pesquisas Porro et al., (1999) utilizaram a levedura *Kluyveromyces lactics* geneticamente modificada, para atua como um homofermentador. No final da fermentação o micro-organismo produziu apenas 30 gL^{-1} de ácido lático, um rendimento de 0,7 a 0,9 mol de ácido lático para cada mol de glicose; o que na teoria representa um aproveitamento de 35 a 45% do processo, sendo portanto inviável.

As bactérias lácticas são exigentes quanto às condições de crescimento. Os açúcares representam a principal fonte de carbono, mas também há necessidade de suplementação de aminoácidos, autolisado de levedura, vitaminas e sais minerais, para garantir boa produção do ácido (AMRANE, 2000).

O emprego de açúcares com alto teor de pureza (glicose, sacarose e lactose) na fermentação láctica encarece o processo. Uma alternativa para minimizar os altos custos é utilizar substratos economicamente mais viáveis tais como: melão, melão de beterraba, caldo de cana de açúcar, bagaço de cana, soro de queijo, trigo, tapioca, manipueira, amido de batata, bem como, aproveitar resíduos agroindustriais como matéria-prima (DATTA; HENRY, 2006; VIJAYAKUMAR et al., 2008).

Alguns substratos como a celulose e a hemicelulose necessitam de um pré-tratamento físico seguido de hidrólise química ou enzimática, enquanto que o amido de milho, a mandioca, o trigo, a cevada e a batata precisam de um tratamento moderado para solubilização e hidrólise.

O ácido lático tem sido produzido por vários tipos de fermentações, tais como: fermentação em estado sólido (SSF) ou semi-sólido, em estado líquido, processo de fermentação contínuo com sacarificação simultânea, processos contínuos com recirculação celular, descontínuos, fermentação por batelada, batelada alimentada entre outros (HOFVENDAHL; HÄGERDAL, 2000 ; NARAYANAN et al., 2004).

A produção de ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-445 foi estudada por Parajó et al., (1997) na qual utilizaram pedaços de madeira de *Eucalyptus globulus* como substrato. O material lignocelulósico foi hidrolisado por celulasas, submetido à sacarificação

simultânea e fermentação. De acordo com Parajó et al., (1997) a produtividade máxima alcançada foi de 0,89-1,48 g/L.h⁻¹ de ácido lático produzido.

Soccol et al., (1994) descreveram a produção de L (+) ácido lático por *Rhizopus oryzae* NRRL 395 em meio sólido usando o bagaço de cana-de-açúcar como suporte na fermentação, impregnado com uma solução nutriente de glicose e carbonato de cálcio. A concentração ideal da glicose foi de 180 gL⁻¹, resultando numa produção de 137 gL⁻¹ de L (+) ácido lático e produtividade de 1,43 g/L.h⁻¹.

Tanaka et al., (2005) estudaram a produção de D (-) ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 utilizando o farelo de arroz como substrato, empregando processos de fermentação, sacarificação simultânea dos polissacarídeos amido e celulose e hidrólise enzimática mediante a ação da amilase e celulase. Os resultados demonstraram produção de 28 kg.m³ de ácido lático a partir de 100 kg.m³ de farelo de arroz após 36 h de fermentação a 37°C.

Um estudo realizado por Timbuntam e colaboradores (2006), utilizaram garapa 13% (125 gL⁻¹ de sacarose, 8 gL⁻¹ de glicose e 6 gL⁻¹ de frutose) como fonte alternativa de carbono. Uma nova linhagem de *Lactobacillus* sp (FCP2) foi isolada, cultivada nesse substrato produzindo 104 gL⁻¹ de ácido lático, em 120 h de fermentação, com 90% de rendimento e 0,9 g/L.h⁻¹ de produtividade. Para substituir o extrato de levedura outras fontes residuais de nitrogênio foram adicionadas ao meio de cultivo, com o objetivo de elevar a produção de ácido lático, como: larvas do bicho da seda, lêvedo de cerveja e restos de camarão.

Coelho et al., (2010) avaliaram o efeito da manipueira suplementada com água de maceração de milho, acetato de sódio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, citrato de amônio, fosfato de potássio e Tween 80 utilizada como substrato na produção de L (+) ácido lático por *Lactobacillus rhamnosus* B103. Por meio do planejamento tipo Plackett-Burman determinaram que a água de maceração de milho e Tween 80 tiveram efeito significativo na produção de ácido lático. A concentração máxima de ácido lático alcançada pelos autores foi de 41,58 gL⁻¹ utilizando 65,4 mL.L⁻¹ de água de maceração de milho e 1,27 mL.L⁻¹ de Tween 80, respectivamente.

Os resultados obtidos por Ghaly et al., (2004) indicaram efeito inibitório utilizando altas concentrações de lactose, acarretando aumento da fase lag e do tempo de fermentação; ocorreu ainda diminuição da proporção de crescimento específico, do número máximo de

células, da utilização de lactose e quantidade de ácido láctico produzido. A concentração ótima de lactose para uma produção eficiente de ácido láctico (75,8%) foi de 75 gL⁻¹. Em contrapartida, usando extrato de levedura e/ou microaeração aumentou o número de células para 3,2 x 10⁶ células . mL⁻¹.

2.4.3 Parâmetros da fermentação láctica

A eficiência de um processo de fermentação láctica pode ser medida pela concentração do ácido láctico produzido, baseado no consumo de substrato, valores de rendimento $Y_{P/S}$ (%) e produtividade (g/L.h⁻¹) (HOFVENDAHL; HÄGERDAL, 2000).

Muitos parâmetros influenciam na eficiência de processos fermentativos microbianos. Em relação às estirpes de bactérias empregadas no processo, devem ser avaliados: fonte de carbono, fontes de nitrogênio mais adequadas; concentração de nutrientes disponíveis, variação do pH e temperatura e pressão parcial de oxigênio (BOUDRANT et al., 2005).

Várias fontes de carbono são utilizadas na produção de ácido láctico, o emprego de açúcares com alto teor de pureza (glicose, sacarose e lactose) como substrato diminuem os custos na purificação, gerando um produto de alta qualidade. Entretanto esses açúcares são muito caros e o ácido láctico é um produto barato.

Diferentes produtos alimentícios ou resíduos agroindustriais são alternativas economicamente mais viáveis na produção de ácido láctico, tais como: soro de leite, melão, melão de beterraba, caldo de cana de açúcar, amido.

Uma alternativa apontada por Bustos et al., (2004) foi a utilização da água de maceração de milho que apresenta-se com baixo custo e pode ser utilizada na otimização do processo. Os pesquisadores utilizaram um modelo matemático para estudar os efeitos causados pelo tempo e a composição do meio para otimizar a produção de D (-) ácido láctico, a partir da glicose por *Lactobacillus coryniformis*, baseado no seu principal componente, a água de maceração de milho. Com os dados experimentais obtidos e o desenvolvimento de um modelo matemático empírico, os autores definiram que para atingir a concentração máxima do produto final (58,9 gL⁻¹), deve-se usar 5 gL⁻¹ de água de maceração de milho, 3,6 gL⁻¹ de extrato de levedura e 10 gL⁻¹ de peptona e 100 gL⁻¹ de glicose em 96h de fermentação.

O extrato de levedura, o autolisado de peptona ou de levedura, a peptona de carne são fontes de nitrogênio essenciais para o crescimento de bactérias lácticas. Estudos demonstraram que o extrato de levedura empregado sozinho em altas concentrações favorece a produção de maior quantidade do ácido que quando se utiliza extrato de levedura e peptona em menor concentração no meio de cultivo.

Mussatto et al., (2008) suplementaram a polpa da celulose hidrolisada na fermentação por *Lactobacillus delbrueckii* adicionando 5 gL⁻¹ de extrato de levedura; essa suplementação aumentou a produtividade do ácido láctico que atingiu 0,53 g/L.h⁻¹, valor 18% mais alto do que sem o extrato de levedura.

A inibição da atividade biossintética devido à alta ou baixa concentração de substratos, o excesso de subprodutos formados e a alta concentração celular (biomassa) são fatores importantes nas fermentações (BOUDRANT et al., 2005).

Liew et al., (2005) utilizaram técnicas de simulação estatísticas para otimizar a produção da biomassa de *Lactobacillus rhamnosus*, variando as concentrações de extrato de levedura, glicose e vitaminas em diferentes valores de pH, estudando os efeitos individuais ou interativos desses parâmetros, a fim de alcançar uma condição ótima. Segundo os pesquisadores, as condições ótimas de crescimento para *Lactobacillus rhamnosus* são: pH = 6,9, solução de vitamina = 1,28% , glicose = 5,01% e extrato de levedura a 6%.

Naveena et al., (2005) relataram o efeito da peptona, extrato de levedura, tri-amônio citrato, extrato de carne, água de maceração de milho, hidrolisado de caseína, pH, tamanho do inoculo, período de incubação, tampão de carbonato de cálcio, o surfactante “Tween 80”, os seguintes minerais: sulfato de magnésio, sulfato de manganês, fosfato de sódio monobásico e o acetato de sódio na produção de ácido láctico. Segundo esses autores o extrato de levedura, a peptona, o tri-amônio citrato, o fosfato de sódio monobásico e o surfactante “Tween 80” podem melhorar a produção de ácido láctico, se seus níveis forem aumentados.

Outro fator crucial para o bom desempenho das fermentações é o controle do pH, uma vez que o ácido na sua forma dissociada dentro da célula bacteriana, promove acidificação do citoplasma provocando o colapso da força próton motora e inibição do transporte de nutrientes, tendo que ser neutralizado a medida que é produzido (MCDONALD, et al.,1990).

Alguns agentes neutralizantes como carbonato de cálcio e de sódio e hidróxido de sódio, são comumente utilizados para manter o controle do pH durante as fermentações (YEN et al., 2010).

Em seus estudos, Mussato et al., (2008) constataram que com ajuste do pH, empregando MRS suplementado com cevada hidrolisada alcançou produção máxima de 35,54 gL⁻¹ de ácido lático, enquanto que o mesmo meio sem controle de pH atingiu 13,02 gL⁻¹. Além da queda na produção, ocorreu menor consumo do substrato e menor crescimento bacteriano.

O efeito da temperatura na produção de ácido lático está diretamente relacionado com o gênero do micro-organismo utilizado nos processos fermentativos. Todos possuem uma temperatura ótima de crescimento, se não forem oferecidas condições adequadas no meio de cultivo, temperaturas muito altas ou muito baixas vão inibir o crescimento, promovendo a morte das células. No caso de *Lactobacillus amylophilus* teoricamente sabe-se que é capaz de crescer a 15°C, mas não a 45°C; no entanto temperaturas ótimas de crescimento foram observadas em 25°C e 35°C, para valores máximos de rendimento e produtividade (YUMOTO; IKEDA, 1995). De acordo com observações prévias de Akerberg et al., (1998), Hujanen e Linko (1996), *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus rhamnosus* exibiram maior rendimento e produtividade na faixa de temperatura de 33 a 35°C e de 41 a 45°C respectivamente.

A forma mais usual de produção do ácido lático é em batelada, porém existem outros tipos de processos como batelada alimentada e processos contínuos. O processo em batelada gera maior concentração de ácido lático, quase todo substrato é consumido enquanto que nos processos contínuos permanece uma concentração residual de açúcar, porém com maior produtividade. As bactérias lácticas são capazes de produzir subprodutos como ácido acético, ácido fórmico, CO₂ e etanol além do ácido lático dependendo do seu perfil metabólico. Para garantir a eficiência do processo industrial para obtenção do ácido lático a formação de subprodutos deve ser evitada ou minimizada. Os processos em batelada garantem maior eficiência que os demais, principalmente em condições anaeróbias (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

2.4.4 Aplicações do ácido lático

Nos últimos anos, a demanda por ácido lático e seus derivados tem aumentado significativamente devido a grande versatilidade desse composto e os processos biotecnológicos sustentáveis envolvidos na sua produção, minimizando impactos ambientais e geração de resíduos. Trata-se de um ácido amplamente utilizado em vários tipos de indústrias: alimentos, farmacêutica, química; destacando-se na produção de polímeros biodegradáveis de ácido lático (PLA'S), um substituto em potencial dos plásticos de origem petroquímica; além dos solventes verdes (ésteres de lactato) (PEREIRA et al., 2011; VIJAYAKUMAR et al., 2008).

Na indústria de alimentos é empregado como acidulante, flavorizante, aromatizante, regulador do pH, emulsificador na fabricação de pães e derivados, doces, balas, aumenta o tempo de vida útil de alimentos armazenados, inibindo a esporulação de bactérias patogênicas em alimentos processados (HOFVENDAHL; HÄGERDAL, 2000; LI et al., 2004; NARAYANAN et al., 2004; NAVEENA et al., 2005).

O ácido lático é amplamente utilizado em produtos de carne, funciona como agente antimicrobiano para evitar contaminação e infecção por *Salmonella* sp em matadouros. Em salsichas o lactato de sódio é empregado para diminuir a atividade de água no alimento e garantir tempo de vida útil mais longo (VIJAYAKUMAR et al., 2008).

Na indústria farmacêutica está associado à formulação de cremes, loções e pomadas; usado como eletrólito em soluções intravenosas em seções de hemodiálise, funciona como agente no combate a carie e na deficiência de cálcio (sais de lactato) (HOFVENDAHL; HÄGERDAL, 2000; LI et al., 2004; NARAYANAN et al., 2004; NAVEENA et al., 2005; VIJAYAKUMAR et al., 2008).

Promove uma boa hidratação da pele devido à capacidade de reter água, geralmente é aplicado em tratamentos de remoção de manchas (clareamento da pele), apresenta atividade antimicrobiana. Os sais de lactato (cálcio, sódio e ferro) podem ser aproveitados em várias formulações farmacêuticas, apresenta maior absorção, maior solubilidade sendo facilmente metabolizados.

Estudos recentes têm demonstrado o grande potencial dos polímeros do ácido lático na área médica. Esses materiais biorreabsorvíveis têm sido utilizados na regeneração de tecidos,

suturas, fixação de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, reparo do menisco, fixação de ligamentos e implantes; podendo ser empregado na forma de parafusos, pinos, grampos e placas nas aplicações ortopédicas e cirurgias orais em humanos e animais (SAKATA et al., 2004).

A utilização de polímeros de PLA biodegradáveis em implantes elimina a necessidade de realizar uma segunda cirurgia para sua remoção. Após o defeito ser corrigido permanece temporariamente no corpo e desaparece sendo degradado (DURSELEN et al., 2001).

Segundo Tan et al., (2010) o poli L - ácido lático (PLLA) na forma de microesferas injetáveis tem sido utilizado em cirurgias de reconstrução facial; nas formas de microcápsulas e microesferas é empregado no sistema de transporte de drogas (fármacos) de efeito prolongado como contraceptivos, anestesia local e vacinas.

O ácido lático pode ser convertido em uma grande variedade de produtos químicos potencialmente úteis utilizando diferentes vias, tais como: óxido de propileno (via hidrogenação), acetaldeído (via descarboxilação), ácido acrílico (desidratação), ácido propanoico (via redução), 2,3-pentadiona (via condensação) e o dilactídeo (via esterificação). Devido à alta solvência e solubilidade do ácido lático é um excelente removedor de polímeros e resinas (VIJAYAKUMAR et al., 2008).

Um dos campos mais promissores da aplicação do ácido lático é o desenvolvimento de polímeros renováveis e biodegradáveis na indústria (BOUDRANT et al., 2005; MIN-TIAN et al., 2003).

O polímero derivado do ácido lático (PLA) é usado na manufatura de produtos, tais como: embalagens de alimentos, copos, pratos e talheres descartáveis, garrafas de refrigerante, sacos de adubo, sacolas de supermercado, fibras, revestimentos, entre outros (BUSTOS et al., 2004, MIN-TIAN et al., 2003; NAVEENA et al., 2005).

O tempo de vida útil destes polímeros é menor se comparado com os provenientes dos hidrocarbonetos, podem ser totalmente degradados no meio ambiente quando expostos a altas temperaturas e umidade, bem como, em condições de aerobiose ou anaerobiose (AURAS et al., 2003; TUOMINEN, 2003).

Segundo Ghorpade et al., (2001) o PLA é decomposto em água e dióxido de carbono em menos de 90 dias em ambientes de compostagem. Os produtos gerados da degradação do

PLA (hidrólise) podem ser totalmente assimilados por fungos ou bactérias. A biodegradação do PLA e seus co-polímeros deve-se a ação das lipases, esterases e proteases produzidas por micro-organismos (TSUJI; IKADA, 2002; LI et al., 2000; HOSHINO et al., 2003).

Uma mistura de lipases produzidas por *Rhizopus arrhizus* e *Candida cylindracea* foram capazes de hidrolisar o polímero DL - ácido lático (amorfo) (ODA et al., 2000).

Actinomicetos associados à degradação do PLA estão incluídos nos gêneros: *Pseudonocardia*, *Lentzea*, *Streptoalloteichus*, *Kibdelosporangium* e *Saccharothrix* (TOKIWA; JARERAT, 2004).

Os oligômeros de lactato com baixo peso molecular foram totalmente degradados por *Fusarium moniliforme* e *Pseudomonas putida*, mas são incapazes de degradar formas poliméricas de alto peso molecular (TORRES et al., 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bioprospecção de bactérias lácticas

3.1.1 Coleta de amostras

Para a bioprospecção de bactérias lácticas foram coletadas amostras com potencial de contaminação por este gênero de micro-organismos a partir dos seguintes produtos:

- alimentícios como queijos, iogurtes e derivados, carnes, produtos embutidos (salame industrializado e artesanal, presunto, salsicha) obtidos em supermercados locais;

- grãos de Keffir foram cedidos pela professora Dejanira de Franceschi de Angelis da Unesp Campus de Rio Claro – SP;

- amostras de iogurtes provenientes de soro de leite e de resíduo da fabricação de iogurte fornecidas pela empresa Nestlé situada na cidade de Araras-SP;

- amostras de leite bovino, resíduos da produção de iogurte e queijo tipo mussarela (água de lavagem) e soro de leite foram fornecidos pela Jamava® laticínios, localizada na cidade de Pirassununga SP;

- amostras de usina sucro-alcooleira proveniente de dorna contaminada da fermentação alcoólica, foi cedida pela Usina São João, localizada no município de Araras-SP.

3.2 Meios de cultivo

O meio MRS recomendado pela “American Type Culture Collection” (ATCC) foi utilizado no isolamento e cultivo de bactérias lácticas. Trata-se de um meio seletivo que possui nutrientes complexos: aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos, vitaminas, sais e ácidos graxos, favorecendo o desenvolvimento desse grupo de micro-organismos exigentes.

O meio de cultivo MRS (Man Rogosa e Sharpe, 1960) constituído em (gL⁻¹) de: peptona (10,0), extrato de carne (10,0), extrato de levedura (5,0), dextrose (20,0) complexo sorbitana (1,0), citrato de amônio (2,0) acetato de sódio (5,0), sulfato de manganês (0,05), fosfato dissódico (2,0) foi utilizado para o isolamento e MRS modificado composto por

glicose (40,0) extrato de levedura (10,0) sulfato de manganês (0,05), sulfato de magnésio (0,2) utilizado nos processos fermentativos (meio alternativo).

3.3 Isolamento e seleção das bactérias

As cepas foram isoladas e purificadas por diluições seriadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e plaqueamentos em meio MRS sólido, com adição de actidiona 0,5%, para inibir o crescimento de fungos filamentosos e leveduras e adição de 0,3% de CaCO_3 , que reage com o ácido láctico produzido formando um halo transparente ao redor da colônia indicando sua presença (ONDA et al., 2002).

Quando necessário foi empregada técnica de esgotamento por estrias após os plaqueamentos, assegurando que as culturas de bactérias estavam puras. A coloração de Gram foi utilizada para ajudar na confirmação da morfologia e do grupo das bactérias isoladas. Foi observada após esta etapa a presença de cocos e bacilos.

Os micro-organismos isolados foram transferidos para tubos contendo 3 mL de MRS estéril e mantidos em estufa (aerobiose) à $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h, após esse período foi realizada a dosagem do ácido láctico por Lactímetro (Accutrend Lactate da Roche®) para todos os isolados.

Como critério adotado as bactérias que apresentaram baixa produção em ácido láctico (menos de 5g.L^{-1}) foram desprezadas e as demais foram preservadas em MRS contendo glicerol a 10% e mantidas à -80°C em ultrafreezer.

3.4 Fermentação láctica

As fermentações foram conduzidas em duas etapas: a) as bactérias que apresentaram rendimentos superiores a 5g.L^{-1} em ácido láctico, na etapa de seleção foram cultivadas em frascos do tipo Schott com volume de 800 mL dos meios MRS e MRS modificado a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 96h; com aeração (injeção de ar comprimido), com e sem ajuste do pH. Nos ensaios com controle do pH, este foi mantido aproximadamente a $5,3 \pm 0,2$ com a adição de NaOH

(3M), enquanto que nos ensaios sem ajuste do pH as condições acima descritas foram mantidas sem adição de NaOH.

b) As bactérias que apresentaram maior rendimento em ácido lático na etapa anterior foram cultivadas em biorreator de 5L em condições controladas, no qual o pH foi ajustado continuamente para $5,3 \pm 0,1$ utilizando NaOH (5M), a uma vazão de aproximadamente $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a 36°C por 26h, sob agitação de 120 rpm.

Nas duas etapas, o inóculo 10% foi padronizado com o auxílio de espectrofotômetro, densidade óptica (O.D) de 0,08 a 0,1 a 625nm, de modo a obter suspensões bacterianas contendo aproximadamente de $1,0$ a $2,0 \times 10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ que corresponde a escala 0,5 de McFarland. O inóculo foi feito em duas etapas sendo a primeira 1,5mL de cultura estoque adicionados em 50 mL de meio MRS e na segunda 20 mL da bactéria crescida foram transferidos para 80 mL do mesmo meio e reincubados por 24h a 36°C .

Todas as fermentações foram padronizadas e iniciadas com 10% (v.v⁻¹) de volume de inóculo contendo 20% de concentração celular. A Figura 5 mostra o esquema ilustrativo do preparo do pré-inóculo e inóculo, bem como, as condições das fermentações lácticas no decorrer dos ensaios.

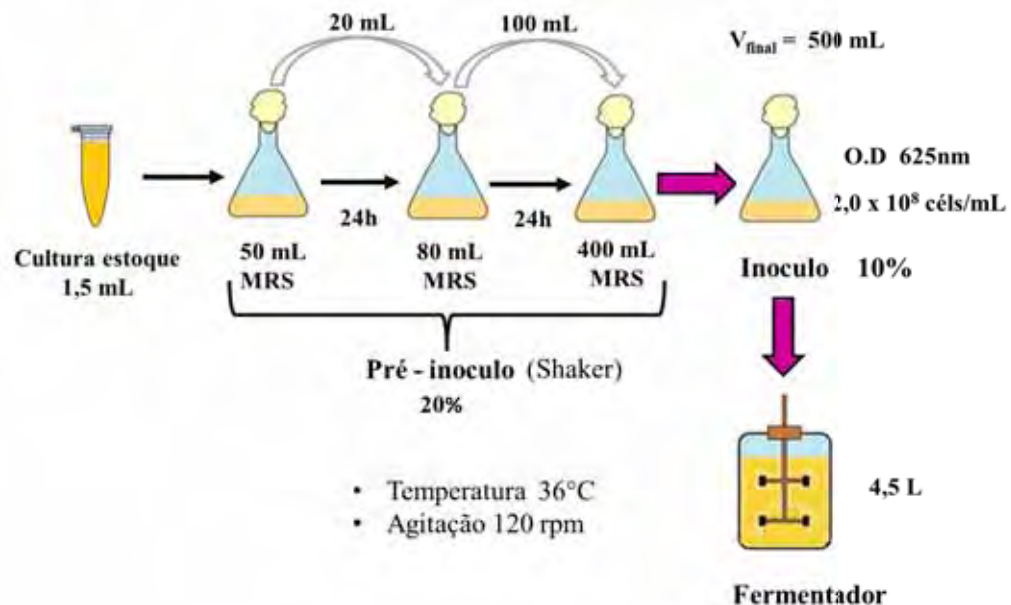


Figura 5. Esquema de preparo do pré - inóculo e inóculo nas fermentações lácticas.

Durante as fermentações foram avaliados os parâmetros de produção de ácido láctico (gL^{-1}), consumo da glicose (gL^{-1}), contagem de UFC.mL^{-1} e controle do pH.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Quantificação enzimática do ácido láctico (lactímetro)

A concentração do ácido láctico produzido foi determinada enzimaticamente em lactímetro da marca Accutrend Lactate da Roche[®]. As amostras foram lidas diretamente no equipamento através de fitas individuais com enzima imobilizada, lactato - oxidase. A faixa de trabalho do equipamento varia de 0,1 a 26 mmol.L^{-1} , amostras que ultrapassaram o valor máximo foram diluídas.

Para calcular a concentração de ácido láctico em gL^{-1} levou-se em consideração sua massa molar de 90 gL^{-1} ; logo, 1 mmol.L^{-1} do ácido equivale a 0,09 gL^{-1} .

O lactímetro só quantifica o estereoisômero do tipo L (+) ácido láctico.

3.5.2 Quantificação do ácido láctico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O ácido láctico produzido foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), num sistema constituído por LC - DAD Alliance Waters, bomba Waters 2695, detector Waters 2996 e software Empower. Equipado com uma coluna para ácidos orgânicos Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), padrão de ácido láctico (SIGMA - Aldrich): 29,0 mg / 25 mL de H_2O = 1160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A estereoisomeria do ácido láctico foi determinada em coluna ASTEC CHIROBIOTIC TAG (100 X 2,1 mm, 5 μ).

3.5.2.1 Validação do lactímetro por CLAE

Para verificar e validar os resultados de produção de ácido láctico obtidos pelo lactímetro, foi elaborada uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de L (+)

ácido láctico ($29,0 \text{ mg} / 25 \text{ mL de H}_2\text{O} = 1160 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$). As concentrações do padrão na curva variaram de $58,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (mínimo) até $812,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (máximo), sendo os valores da área do pico correspondente: 45.308 (mínimo) e 659.305 (máximo).

3.5.3 Determinação da concentração da glicose pelo método do ADNS (ácido 3-5 dinitrosalicílico)

A concentração da glicose foi determinada pelo método do açúcar redutor (MILLER, 1959) nos diferentes tempos da fermentação. A partir de uma solução estoque de glicose (10 mg.mL^{-1}) foi construída uma curva de calibração com 7 pontos associada a densidade óptica (espectrofotômetro). As concentrações variaram de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (mínimo) até $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (máximo) de glicose. Os valores de absorvância obtidos no comprimento de 540 nm foram utilizados para os cálculos (Figura 6).

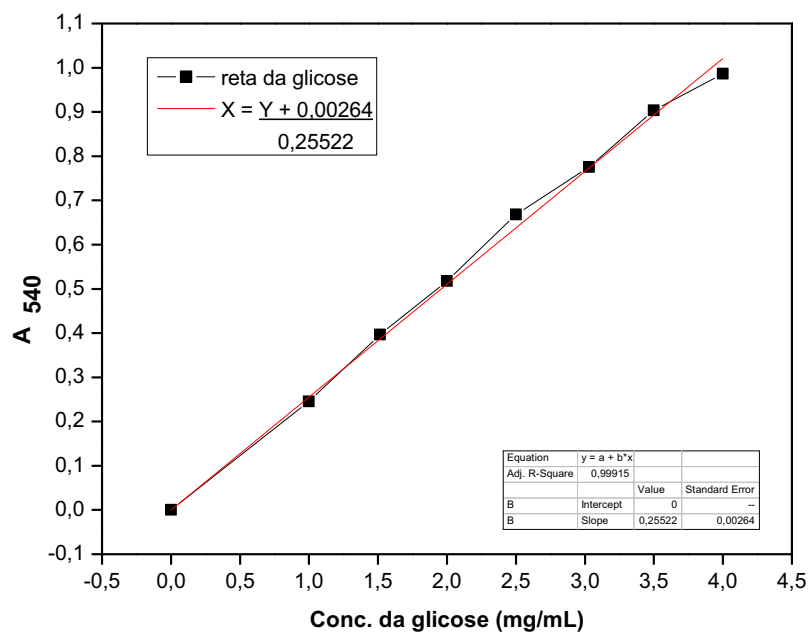


Figura 6. Curva padrão da glicose.

3.6 Método de análise molecular

3.6.1 Caracterização dos isolados

A caracterização taxonômica foi realizada pela Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do CPQBA/UNICAMP – que mantém o CBMAI (Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria).

A identificação em nível de gênero das bactérias foi baseada na análise filogenética de sequências do gene RNA ribossomal 16S, após amplificação e sequenciamento parcial do gene.

3.6.2 Extração e quantificação de DNA genômico

A extração do DNA genômico dos isolados bacterianos foi realizada segundo o método descrito por Pospiech e Neumann (1995), com algumas modificações. Cerca de 100 mg de biomassa de cada isolado foram cultivados no meio Nutriente Broth e utilizadas para extração do DNA genômico. As células foram recuperadas em 1 mL de tampão SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 20 mM em pH 7,5) e centrifugadas a $10.576 \times g$ por 5 min, o sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL do mesmo tampão. Adicionou-se 5 μ L de solução de lisozima numa concentração final de 1 mg.mL⁻¹ e, em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 60 min. Posteriormente, foi adicionado 1/10 de volume de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 0,5 mg.mL⁻¹ de proteinase K (solução estoque 10 mg.mL⁻¹), sendo os tubos incubados a 55°C por 2 h e homogeneizados.

Foi adicionado 1/3 do volume de NaCl 5 M e 1 volume de clorofórmio. Em seguida, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 30 min, tendo sido homogeneizados ocasionalmente. Os tubos foram, então, centrifugados a $10.576 \times g$ por 10 min e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol e os tubos foram homogeneizados várias vezes a fim de misturar as soluções ou até visualizar um precipitado fibroso branco. Os tubos foram centrifugados a $3.103 \times g$ por 3 min.

O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com 1,0 mL de etanol 70% (v.v⁻¹) e, em seguida os tubos foram centrifugados a $3.103 \times g$ por 3 min entre as lavagens. O DNA precipitado foi mantido a temperatura ambiente ou em estufa a 37°C até secar. Em seguida, o DNA foi

dissolvido em 200 μL de TE pH 8,0 e 10 μL de RNase ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram adicionados a suspensão. Os tubos foram incubados por 1 h a 37°C . Após este período, foram adicionados 20 μL de cloreto de lítio 4M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), a fim de remover as proteínas da suspensão. Os tubos foram agitados manualmente e centrifugados a $10.576 \times g$ por 10 min.

O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado e os tubos foram centrifugados a $3.103 \times g$ por 3 min. O sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70%, conforme descrito anteriormente. O DNA precipitado foi seco nas mesmas condições já mencionadas e, em seguida, foi suspenso em 20 a 50 μL de água Milli-Q e estocado a 4°C .

O DNA extraído foi quantificado através da comparação com o DNA λ em diferentes concentrações em gel de agarose a 0,8 % submetido à eletroforese por 30 min em condição de 5V por cm. Após sua quantificação, o DNA extraído foi, então, armazenado em tubos de polipropileno e mantido a temperatura de 4°C .

3.6.3 Amplificação do dna genômico

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S foi feita por meio de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando os *primers* 10f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'), e p1100r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3'), homólogos a regiões conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias (LANE et al., 1985).

As condições utilizadas na reação de amplificação foram: 5 μL de tampão 10X (sem Mg^{+2}); 1 μL de MgCl_2 (2,5 mM); 0,4 μL de dNTP (2,5 mM cada); 0,75 μL de cada *primer* (20 μM); DNA para uma concentração final de 50-100 ng; 4 U de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen); e água Milli-Q esterilizada completando o volume para 50 μL de reação. Para a amplificação foi realizada uma desnaturação inicial de 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos sendo: 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 3 min, extensão final de 3 min a 72°C , em termociclador *Eppendorf*®.

3.6.4 sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16s

Os produtos da amplificação dos isolados foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA & gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem) utilizando os *primers* 10f e o 1100r na reação de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies) conforme descrito pelo fabricante.

As sequências parciais de DNAr 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), RDP Release 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e EzTaxon-e server (KIM et al., 2011). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo desconhecido foram selecionadas para alinhamento no programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994) e análises filogenéticas utilizando o programa MEGA versão 5.0 (TAMURA et al., 2011). A matriz de distância evolutiva foi calculada de acordo com o modelo de Kimura et al., (1980) e a árvore filogenética construída a partir das distâncias evolutivas calculadas pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; MASATOSHI, 1987), com valores de *bootstrap* a partir de 1000 re-amostragens.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e seleção de bactérias lácticas

Um total de 192 bactérias foram isoladas e apresentaram capacidade de produzir ácido láctico em meio seletivo MRS/CaCO₃. Destas, 75 apresentaram morfologia de cocos, 77 de bastonetes e 40 de bastonetes com endósporos; todos Gram (+), fermentadores, capazes de diminuir o pH do meio e produzir ácido láctico.

Das 192 bactérias mencionadas acima apenas 24 apresentaram produção em ácido láctico de 5,0 gL⁻¹. As 24 bactérias foram numeradas sequencialmente de acordo com seu isolamento o que é mostrado na Tabela 2.

Para dar continuidade aos ensaios somente 6 bactérias que apresentaram produção em ácido láctico superior a 5,0 gL⁻¹ foram selecionadas.

Tabela 2. Fonte dos isolados produtores de ácido láctico (produção de 5,0 gL⁻¹), procedências e principais características morfológicas das linhagens numeradas.

| Fonte | Número de isolados | Morfologia/coloração | Identificação das bactérias |
|-----------------------|--------------------|---|-----------------------------|
| Leite de vaca | 2 | Cocos Gram (+) | 3, 15 |
| Keffir | 1 | Bastonete Gram (+) | 14 |
| Queijo Minas | 3 | Bastonete Gram (+) | 2, 4, 10 |
| Queijo Ricota | 1 | Cocos Gram (+) | 18 |
| Resíduo queijo | 2 | Bastonete com endósporo Gram (+) | 6, 11 |
| Resíduo iogurte | 1 | Bastonete com endósporo Gram (+) | 9 |
| Soro de leite | 1 | Bastonete com endósporo Gram (+) | 7 |
| Usina sucroalcooleira | 3 | Cocos Gram (+) | 16, 21, 24 |
| Carne bovina | 5 | (4)Cocos (1)Bastonete c/ endósporo Gram (+) | 8, 17, 19, 20, 25 |
| Carne de peixe | 1 | Bastonete c/ endósporo Gram (+) | 13 |
| Pele de salame | 1 | Cocos Gram (+) | 22 |
| Pele de suíno | 2 | Cocos e Bastonete c/ endósporo Gram (+) | 12, 23 |
| Maçã | 1 | Bastonete Gram (+) | 5 |

4.2 Produção de ácido láctico

As fermentações para a produção de ácido láctico a partir dos isolados selecionados na etapa anterior foram conduzidas em meio MRS e MRS modificado. A intenção de utilizar o meio MRS modificado foi de suplementar o meio com maior quantidade de glicose e manter os sais necessários para o desenvolvimento celular (sulfato de magnésio e sulfato de manganês) e extrato de levedura como fonte primária de nitrogênio.

O magnésio é um macronutriente e tem papel importante na estabilização dos ribossomos, das membranas celulares e dos ácidos nucleicos. Os íons de magnésio atuam como cofatores, podendo ajudar a catalisar uma reação formando uma ponte entre a enzima e um substrato; são requeridos por enzimas que participam das reações de fosforilação, nas quais o grupo fosfato do ATP é transferido para outro substrato (TORTORA et al., 2010).

O manganês é um micronutriente (elemento traço) e seus íons funcionam como um ativador de enzimas (cofator); está presente em certas superóxido dismutases e na enzima que cliva a água nos micro-organismos fototróficos oxigênicos (MADIGAN et al., 2008).

Os sais fosfato dissódico, acetato de sódio e citrato de amônio (tampões) foram suprimidos do meio MRS modificado uma vez que o controle do pH foi ajustado a intervalos de tempos regulares, conforme necessário para manter em 5,3 o pH da fermentação.

Comparando a produção de ácido láctico nos dois meios utilizados sem controle do pH, os resultados mostram que não houve diferença significativa na produção (Tabela 3). Após 96 horas, a concentração de ácido láctico foi em média de 7,33 e 6,63 gL⁻¹, com rendimentos médios de 36,67% e 16,58% respectivamente, nos meios MRS e MRS modificado. Dentre os isolados estudados, o de número 22 apresentou produção de 11,93 gL⁻¹ de ácido láctico e rendimento de 59,63% no meio MRS e 9,11 gL⁻¹ e 22,78% em MRS modificado, mostrando capacidade superior de produção em relação aos demais isolados (Tabela 3). Os resultados indicam que as maiores concentrações de ácido láctico foram obtidas quando a manutenção do pH do meio foi de 5,3.

Tabela 3. Produção, rendimento e produtividade em ácido lático pelas bactérias selecionadas, em meio MRS e MRS modificado sem ajuste do pH, após 96h.

| Bactérias | MRS | | | MRS 40 gL ⁻¹ de glicose | | |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| | Ácido lático (gL ⁻¹) | Rendimento (Y _{P/S}) % | Produtividade (g/L.h ⁻¹) | Ácido lático (gL ⁻¹) | Rendimento (Y _{P/S}) % | Produtividade (g/L.h ⁻¹) |
| 16 | 5,73 ± 1,11 | 28,68 ± 5,55 | 0,30 ± 0,06 | 7,51 ± 0,19 | 18,79 ± 0,48 | 0,2 ± 0,005 |
| 17 | 5,85 ± 0,13 | 29,25 ± 0,64 | 0,30 ± 0,01 | 9,5 ± 0,32 | 23,74 ± 0,8 | 0,25 ± 0,008 |
| 18 | 9,45 ± 0,13 | 47,25 ± 0,64 | 0,49 ± 0,01 | 3,91 ± 0,45 | 9,79 ± 1,11 | 0,1 ± 0,012 |
| 19 | 8,44 ± 0,67 | 42,18 ± 3,36 | 0,44 ± 0,03 | 2,9 ± 0,03 | 7,25 ± 0,07 | 0,08 ± 0,001 |
| 22 | 11,93 ± 0,83 | 59,63 ± 4,14 | 0,62 ± 0,04 | 9,11 ± 0,61 | 22,78 ± 1,52 | 0,24 ± 0,016 |
| 24 | 7,20 ± 0,76 | 36,0 ± 3,82 | 0,38 ± 0,04 | 9,33 ± 0,29 | 23,34 ± 0,72 | 0,24 ± 0,008 |

± de experimentos realizados em duplicata.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 3, algumas cepas destacaram-se como potencialmente promissoras para permitir a continuidade dos ensaios. No meio MRS além da cepa 22 pode-se destacar os isolados 18 e 19 e no meio MRS modificado os isolados 17 e 24.

Quanto ao rendimento (Y_{P/S}), os valores de ácido lático obtidos no meio MRS foram superiores 56,6% em média, em relação aos obtidos do meio MRS modificado. Esses valores foram considerados em função do teor de glicose do meio MRS modificado.

Em relação à cinética de conversão de glicose em ácido lático (1:2), os isolados ficaram aquém do esperado. A baixa conversão pode estar associada ao metabolismo heterofermentativo desses isolados, conforme será discutido no item 4.7.

Durante a glicólise ou degradação anaeróbia da glicose para formação de ácido lático caracterizam-se dois processos: homolático e heterolático. Na fermentação homolática uma molécula de glicose é oxidada em duas moléculas de ácido pirúvico, essa oxidação gera energia na forma de dois ATP. Na etapa seguinte duas moléculas de ácido pirúvico são reduzidas a dois NADH para formar duas moléculas de ácido lático. Este perfil metabólico caracteriza o grupo de bactérias lácticas homofermentativas que possuem a enzima aldolase, capaz de clivar a frutose bifosfato em triose fosfato seguindo a rota do piruvato gerando um único produto de fermentação, o ácido lático (LEHNINGER, et al, 2010; TORTORA, et al, 2010).

Na fermentação heterolática as bactérias heterofermentadoras utilizam uma rota diferente, a cadeia das pentoses fosfato onde, oxidam a glicose 6-fosfato a 6- fosfogliconato que é descarboxilado (produção de CO₂), gerando pentose fosfato que pela ação de outra enzima fosfocetolase origina a triose fosfato e acetilfosfato. A triose fosfato é convertida em 1 mol de ácido lático, com a geração de 1 ATP e o acetilfosfato é convertido em etanol. Neste caso outros produtos da fermentação são gerados: 1 mol de ácido lático, 1 de etanol e 1 de CO₂ (MADIGAN et al., 2008). Também neste processo pode ser observado a formação de outros ácidos tais como: acético, fórmico, succínico (ciclo do ácido cítrico), bem como, o etanol e CO₂, com isso o rendimento em ácido lático é prejudicado.

4.3 Produção de ácido lático com controle do pH

Autores como Silva e Mancilha (1991); Mussato et al., (2008) mencionaram que o controle de pH durante o processo fermentativo colabora para o aumento da produção de ácido lático.

Para avaliar o efeito do controle do pH na produção de ácido lático foram realizados ensaios nos quais o pH foi ajustado para valores próximos a $5,3 \pm 0,2$, para ambos os meios. No sistema utilizado foram empregados 800 mL de meio e 10% (v.v⁻¹) de inóculo. Os frascos foram mantidos em Banho Maria à temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ controlado por termostato, com injeção de ar comprimido suficiente para homogeneização onde ocorreram as fermentações (Figura 7).

Injeção de ar comprimido



Figura 7. Sistema operacional para verificar a produção de ácido láctico pelas cepas 16, 17, 18, 19, 22 e 24, nos meios MRS e MRS modificado, temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, mantido durante 96h de fermentação.

A Tabela 4 apresenta os valores de produção de ácido láctico, rendimento e produtividade durante os ensaios fermentativos obtidos no sistema indicado na Figura 7.

Tabela 4. Quantificação da produção, rendimento e produtividade de ácido láctico dos isolados selecionados com controle do pH em meios MRS e MRS modificado após 96 horas de fermentação, $\text{pH } 5,3 \pm 0,2$ a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

| Bactérias | MRS | | | MRS 40 gL ⁻¹ de glicose | | |
|-----------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------------|---|
| | Ácido láctico (gL ⁻¹) | Rendimento (Y _{P/S}) % | Produtividade (g/L.h ⁻¹) | Ácido láctico (gL ⁻¹) | Rendimento (Y _{P/S}) % | Produtividade (g/L.h ⁻¹) |
| 16 | 10,53 ± 0,60 | 52,65 ± 3,15 | 0,55 ± 0,03 | 14,62 ± 1,50 | 36,55 ± 3,74 | 0,38 ± 0,039 |
| 17 | 10,75 ± 1,17 | 53,75 ± 5,85 | 0,56 ± 0,06 | 14,09 ± 1,54 | 35,23 ± 3,85 | 0,37 ± 0,04 |
| 18 | 10,64 ± 0,55 | 53,20 ± 2,75 | 0,55 ± 0,03 | 12,71 ± 3,20 | 31,78 ± 8,10 | 0,33 ± 0,08 |
| 19 | 10,75 ± 0,60 | 53,75 ± 3,03 | 0,56 ± 0,032 | 14,51 ± 2,60 | 36,28 ± 6,50 | 0,38 ± 0,07 |
| 22 | 10,91 ± 0,21 | 54,55 ± 1,07 | 0,57 ± 0,01 | 15,60 ± 1,42 | 39,0 ± 3,55 | 0,41 ± 0,037 |
| 24 | 10,64 ± 1,45 | 53,20 ± 7,25 | 0,55 ± 0,08 | 13,38 ± 3,90 | 33,45 ± 9,75 | 0,35 ± 0,10 |

± de experimentos realizados em duplicata.

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstraram que a concentração de ácido láctico aumentou quando o pH do meio manteve-se próximo ao pH de ajuste para ambos os meios.

Comparando os ajustes de pH nos meios MRS e MRS modificado pode-se verificar que a produção de ácido láctico aumentou em 24% no meio MRS em relação aos experimentos sem controle de pH (Tabela 3), com valores médios de $10,7 \text{ gL}^{-1}$. O aumento da produção de ácido láctico em meio MRS modificado também foi observado, sendo este de 49% em relação ao sem controle de pH com produção média de $13,82 \text{ gL}^{-1}$.

De acordo com Silva e Mancilha (1991), o pH é um dos principais fatores que influencia a produção de ácido láctico, devido a atividade catalítica das enzimas e atividade metabólica dos micro-organismos dependentes do pH extra celular. O ácido láctico inibe o crescimento bacteriano, com a diminuição do pH externo à célula, o ácido é protonado e expulso para o meio. Uma vez desprotonado o ácido volta para dentro da célula e dissocia-se devido ao pH intracelular ser superior. A célula consome ATP para bombear prótons para o meio isto interfere no crescimento e induz a morte das bactérias.

Em seus estudos, Mussato et al., (2008) constataram que com ajuste do pH, empregando MRS suplementado com cevada hidrolisada alcançou produção máxima de $35,54 \text{ gL}^{-1}$ de ácido láctico, enquanto que o mesmo meio sem controle de pH atingiu $13,02 \text{ gL}^{-1}$. Além da diminuição na produção, ocorreu menor consumo do substrato e menor crescimento bacteriano.

Em relação aos rendimentos, a diferença da concentração de glicose dos meios MRS e MRS modificado mostrou ser significativa para esses parâmetros com diferença média de 35,4% entre eles.

Com ajuste do pH a produção de ácido láctico no meio MRS foi favorecido, sendo este em média de 31,0% maior que o rendimento observado sem controle. O mesmo pode ser observado em meio MRS modificado onde o valor médio aumentou em 52%. Durante a realização destes ensaios a cepa 22 apresentou desempenho superior às demais com produção de ácido láctico de $15,60 \text{ gL}^{-1}$, rendimento de 39% em meio MRS modificado.

Neste estudo, as interações existentes entre consumo da glicose, crescimento microbiano e produção de ácido láctico foram investigadas. A Figura 8 indica que a glicose

não foi totalmente consumida após 96h de ensaio por nenhuma das linhagens de bactérias estudadas.

Nem sempre o substrato é exaurido completamente do meio de cultivo quando a concentração celular bacteriana atinge seu valor máximo; podendo ainda existir uma concentração residual do mesmo ao término da fermentação (HISS et al., 2001).

Isto se deve em parte pelo caráter metabólico do micro-organismo empregado; em alguns casos, bactérias lácticas heterofermentativas podem não utilizar todo o substrato para sintetizar seus metabólitos e multiplicar-se.

Observou-se mediante os ensaios que o crescimento exponencial das células de todas as linhagens das bactérias estudadas, para ambos os meios MRS e MRS modificado atingiu a ordem de 10^{10} UFC.mL⁻¹ após 96h de fermentação, porém apresentaram perfil de crescimento semelhante. Este fato confirma que a glicose não foi utilizada apenas para o crescimento celular. As médias dos valores de crescimento exponencial obtidos em meio MRS modificado para todas as cepas estudadas são mostradas na Figura 9.

A energia obtida pela oxidação do substrato não é destinada apenas para o crescimento celular, mas também para fins de manutenção. O aumento proporcional da biomassa deve-se exclusivamente ao consumo de substrato, porém uma parcela desse consumo é destinada para manter o equilíbrio osmótico da célula, modificação de estruturas celulares que necessitem de energia (ATP), renovação de macromoléculas como proteínas, síntese de RNA, excreção de metabólitos tóxicos, bem como a manutenção de gradientes eletroquímicos e do pH intracelular em níveis ótimos (HISS et al., 2001).

Os menores valores de glicose residual foram observados para as cepas 18, 19 e 22 com diferença de aproximadamente 2,24 gL⁻¹ entre elas (Figura 8).

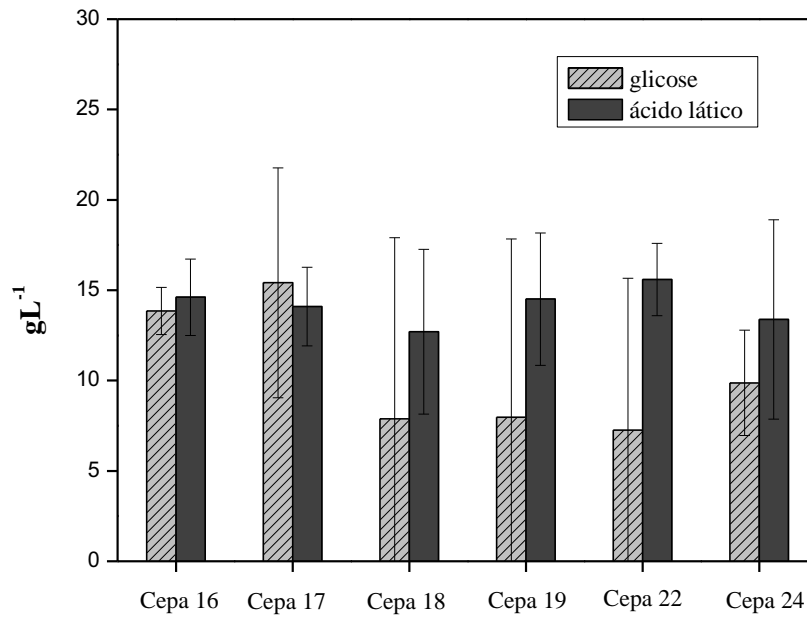


Figura 8. Quantificação da produção de ácido láctico e glicose residual em meio MRS modificado após 96h de fermentação, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, cepas 16; 17; 18; 19; 22 e 24.

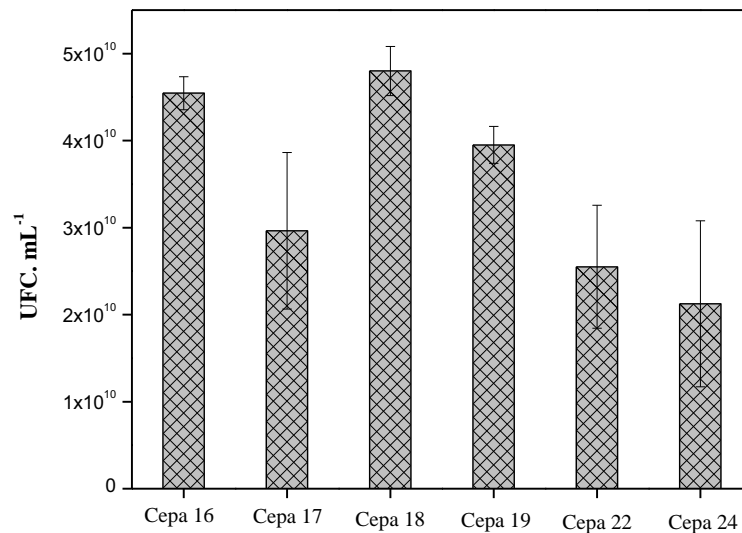


Figura 9. Quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹) em meio MRS modificado após 96h de fermentação, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

De acordo com Borzani et al., (2001) o processo fermentativo que leva a produção de ácido láctico é dividido em duas fases: a primeira refere-se a velocidade específica de consumo do açúcar que está diretamente relacionado à de crescimento do micro-organismo não havendo formação do produto. Por outro lado na segunda etapa ocorre a formação do produto que está parcialmente associada ao crescimento microbiano.

Quando a produção de ácido láctico está associada ao crescimento, a bactéria é capaz de multiplicar-se e sintetizar seu metabólito continuamente até que todo o açúcar seja utilizado (BOONMEE et al, 2003).

Em suas pesquisas Boonmee et al., (2003) avaliaram o efeito da limitação da lactose e inibição do crescimento pelo produto (lactato) empregando *Lactococcus lactis* NZ133. As fermentações em batelada foram conduzidas em meios com diferentes concentrações de lactose (gL^{-1}): 20, 40, 60, 80 e 100 respectivamente. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que a produção de lactato estava associada ao crescimento quando 20 gL^{-1} e 40 gL^{-1} de lactose foram utilizados; não havendo acúmulo de açúcar residual. Ocorreu o oposto quando foram utilizados de 60 gL^{-1} a 100 gL^{-1} de lactose, o crescimento cessou antes que toda lactose fosse consumida e houve um período significativo de não crescimento associado à produção de lactato.

A Figura 10 indica que a cepa 22 apresentou rápido crescimento entre 48 e 72h, quando metade da glicose foi consumida na conversão para ácido láctico, restando 5 gL^{-1} após 96h de fermentação a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

A produção de ácido láctico pela cepa 22 pode ser classificada como mista, o produto foi sintetizado nas três fases de crescimento: exponencial (Log), estacionária e declínio (morte celular); sendo que a formação do produto não apresentou grande associação com o aumento celular e com o declínio da viabilidade (Figura 10).

Como a concentração de glicose no meio não foi determinante para aumentar os teores de ácido láctico, o crescimento exponencial celular permaneceu inalterado em ambos os meios, e o valor do açúcar residual em média no MRS modificado foi maior (10,03 gL^{-1}) após 96h.

Diante dos resultados obtidos optou-se prosseguir as fermentações em maior escala em meio MRS.

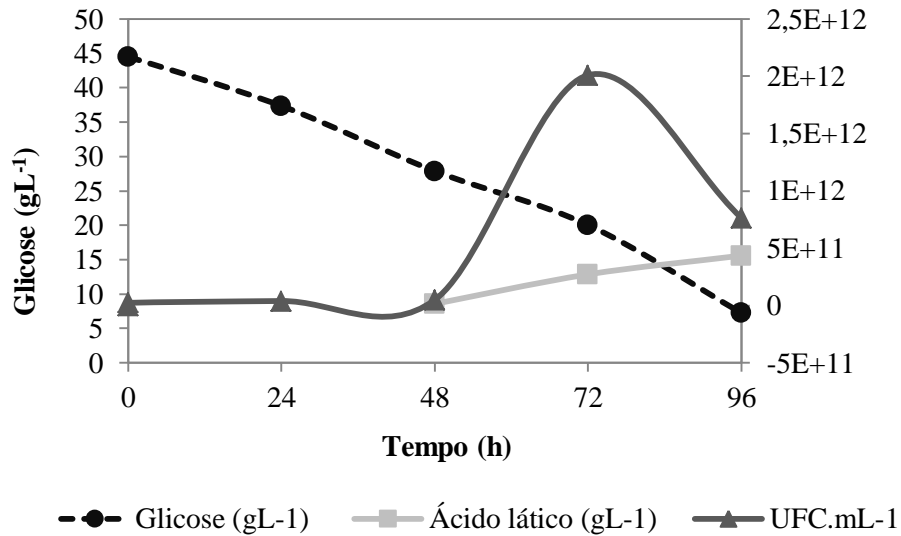


Figura 10. Representação da cinética de crescimento, produção de ácido láctico e consumo da glicose no cultivo da cepa 22, pH $5,3 \pm 0,2$ em meio MRS modificado, temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96h de fermentação.

4.4 Avaliação da produção de ácido láctico em biorreator de 5L

As cepas 16 e 22 que apresentaram maior rendimento em ácido láctico na etapa anterior (triagem) foram submetidas a processo fermentativo em biorreator de 5L.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que para ambas as cepas, ocorreram aumento do rendimento e produtividade comparados com o experimento anterior (Tabela 4).

A cepa 16 apresentou aumento no teor de ácido láctico em 58,69%, com rendimento de 91,13% e produtividade de $3,31 \text{ g/L.h}^{-1}$, esta produtividade corresponde a um aumento de 6 vezes ao experimento anterior. O mesmo pode ser observado para a cepa 22, que apresentou valores de rendimento superiores a 78% em condições iguais de processo (biorreator com ajuste de pH), produziu $15,98 \text{ g/L}^{-1}$ de ácido láctico, com produtividade aumentada em 5,38 vezes.

Nas condições que o experimento foi conduzido salienta-se que estes valores foram obtidos em um período de fermentação de 26 horas.

Tabela 5. Quantificação de ácido láctico (gL^{-1}), rendimento ($Y_{P/S}$) % e produtividade (g/L.h^{-1}) produzidos pelas cepas 16 e 22 em biorreator de 5L, em meio MRS, temperatura de 36°C , 120 rpm, $\text{pH} = 5,3 \pm 0,1$ período de 26 horas.

| Tempo(h) | Cepa 16 | | | Cepa 22 | | |
|----------|---------------------------------------|-------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------|--|
| | Ácido láctico (gL^{-1}) | Rendimento ($Y_{P/S}$) % | Produtividade (g/L.h^{-1}) | Ácido láctico (gL^{-1}) | Rendimento ($Y_{P/S}$) % | Produtividade (g/L.h^{-1}) |
| 10 | $7,38 \pm 0,0$ | $36,9 \pm 0,0$ | $3,69 \pm 0,0$ | $4,53 \pm 3,66$ | $22,63 \pm 18,28$ | $2,26 \pm 1,83$ |
| 22 | $16,47 \pm 0,64$ | $82,35 \pm 3,18$ | $3,74 \pm 0,14$ | $11,88 \pm 2,04$ | $59,4 \pm 10,18$ | $2,70 \pm 0,46$ |
| 26 | $18,23 \pm 1,46$ | $91,13 \pm 7,32$ | $3,31 \pm 0,01$ | $15,98 \pm 0,32$ | $79,88 \pm 1,59$ | $3,07 \pm 0,06$ |

\pm de experimentos realizados em duplicata.

Os valores de rendimento, produtividade e produção do ácido láctico registrados na Tabela 5 para as duas estirpes, deve-se provavelmente as condições em que o experimento foi desenvolvido empregando-se biorreator com bons recursos de controle.

Tudo indica que a correção contínua e automatizada do pH com NaOH (5M) a medida que o ácido láctico era produzido, diminuiu o tempo das fermentações de 96h para 26h, e favoreceu o processo melhorando o rendimento.

Nessas condições o emprego da cepa 16 em processos fermentativos industriais é promissor, uma vez que essa bactéria isolada do ambiente possui perfil metabólico diferenciado convertendo a glicose em ácido láctico em menos tempo. A Figura 11 mostra o biorreator onde foram realizados experimentos com ajuste do pH de forma mais precisa.



Figura 11. Biorreator empregado para avaliar a produção de ácido láctico pelas cepas 16 e 22, em meio MRS após 26h de fermentação, temperatura de 36°C, 120 rpm.

A Figura 12 apresenta a cinética do processo metabólico de crescimento, consumo de glicose e produção de ácido láctico da cepa 16. Nesta figura verifica-se rápido crescimento nas primeiras 8 horas de fermentação, estabilizando-se a seguir, porém acompanhado do consumo da glicose e produção de ácido láctico em 26 horas de fermentação. O valor residual de glicose no meio foi de 2,61 gL⁻¹.

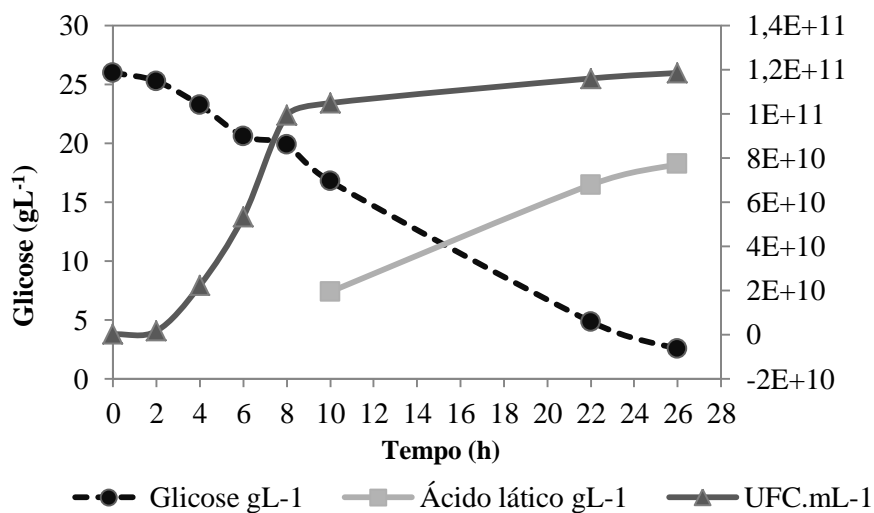


Figura 12. Cinética de crescimento avaliada em Unidades Formadoras de colônias/mL (UFC.mL⁻¹), produção de ácido láctico (gL⁻¹) e consumo da glicose (gL⁻¹) no cultivo da bactéria 16, em meio MRS, pH 5,3 ± 0,1, temperatura de 36°C em período de 26h.

Tabela 6. Quantificação do L (+) ácido láctico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e lactímetro para as cepas 16 e 22.

| Tempo de fermentação | Área do Pico CLAE | Conc. de ácido láctico ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) CLAE | Conc. final de ácido láctico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) CLAE | Conc. final de ácido láctico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Lactímetro |
|----------------------|-------------------|--|--|--|
| Ensaio 1 | | | | |
| 10h | 284503 | 351,47 | 7,03 | 7,38 |
| 22h | 607181 | 748,49 | 14,97 | 16,92 |
| Cepa 16 | | | | |
| Ensaio 2 | | | | |
| 10h | 309933 | 382,76 | 7,66 | 7,38 |
| 22h | 640631 | 789,65 | 15,79 | 16,02 |
| 26h | 707116 | 871,45 | 17,43 | 17,19 |
| Ensaio 1 | | | | |
| 10h | 272571 | 336,78 | 6,74 | 7,11 |
| 22h | 599349 | 738,85 | 14,78 | 13,32 |
| Cepa 22 | | | | |
| Ensaio 2 | | | | |
| 22h | 436281 | 538,21 | 10,76 | 10,44 |
| 26h | 691754 | 852,55 | 17,05 | 15,75 |
| 30h | 680179 | 838,31 | 16,77 | 15,48 |

Os resultados registrados na Tabela 6 confirmam que o equipamento utilizado (lactímetro) para a dosagem do ácido láctico produzido durante o processo de fermentação pode ser um instrumento prático conferindo uma boa alternativa para esta análise de maneira rápida, simples e com sensibilidade quando comparado ao da CLAE.

4.6 Avaliação da isomeria do ácido láctico produzido durante as fermentações

A avaliação de formação de isômeros de ácido láctico D (-) ou L (+) foi verificada por cromatografia utilizando uma coluna quirál. A intenção desta verificação foi de certificar se os rendimentos observados pelas cepas isoladas estavam associados a este fato de produzirem também o D (-) ácido láctico, uma vez que o lactímetro apresenta leitura somente para o isômero L (+) ácido láctico.

Os resultados revelaram que as cepas isoladas e estudadas não apresentavam o isômero D (-) ácido láctico, confirmando que os baixos rendimentos obtidos por algumas cepas não estava associado ao fator isomeria e sim, pelas suas características metabólicas.

4.7 Avaliação do produto final de fermentação

Após o término das fermentações pelas cepas 16 e 22, amostras foram submetidas a análises por cromatografia para avaliação do produto final e verificação de possível formação de outros ácidos orgânicos durante o processo.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 14, 15, 16 e 17 referem-se a experimentos realizados no biorreator para as cepas 16 e 22 respectivamente no período de 26 horas de fermentação.

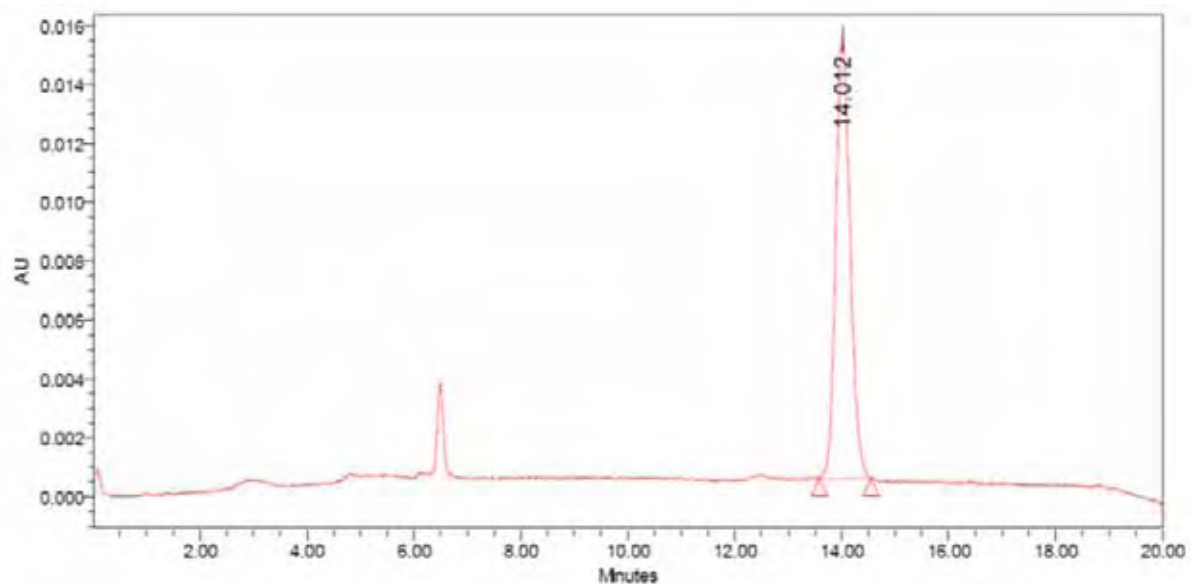


Figura 14. Cromatograma padrão de ácido láctico.

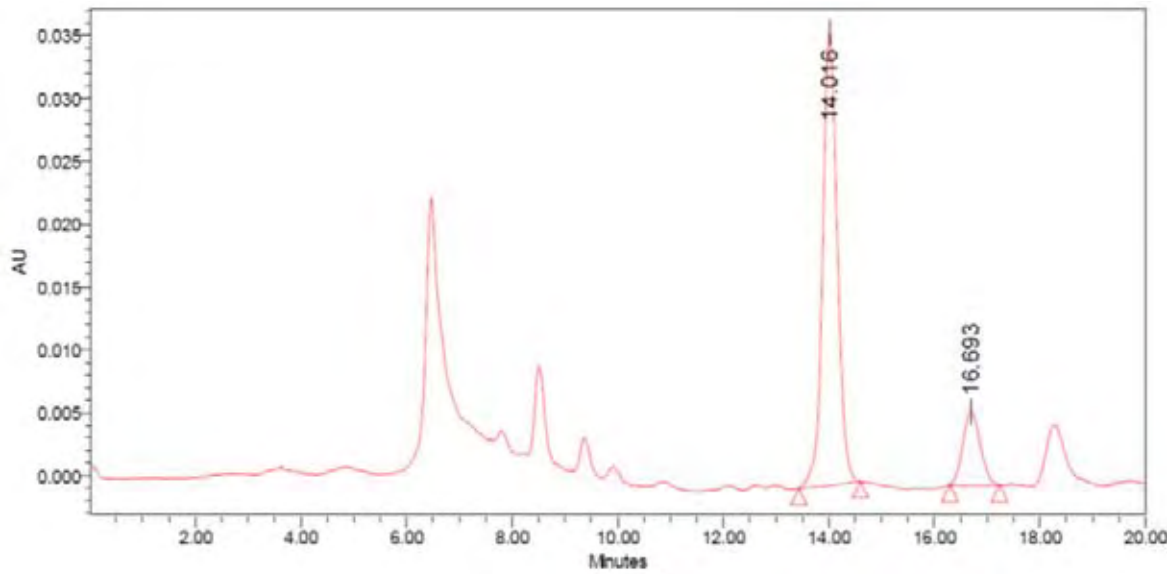


Figura 15. Perfil cromatográfico do caldo fermentativo da Cepa 22 cultivada em meio MRS, após 26h de fermentação, temperatura de 36°C, 120 rpm, pH $5,3 \pm 0,1$.

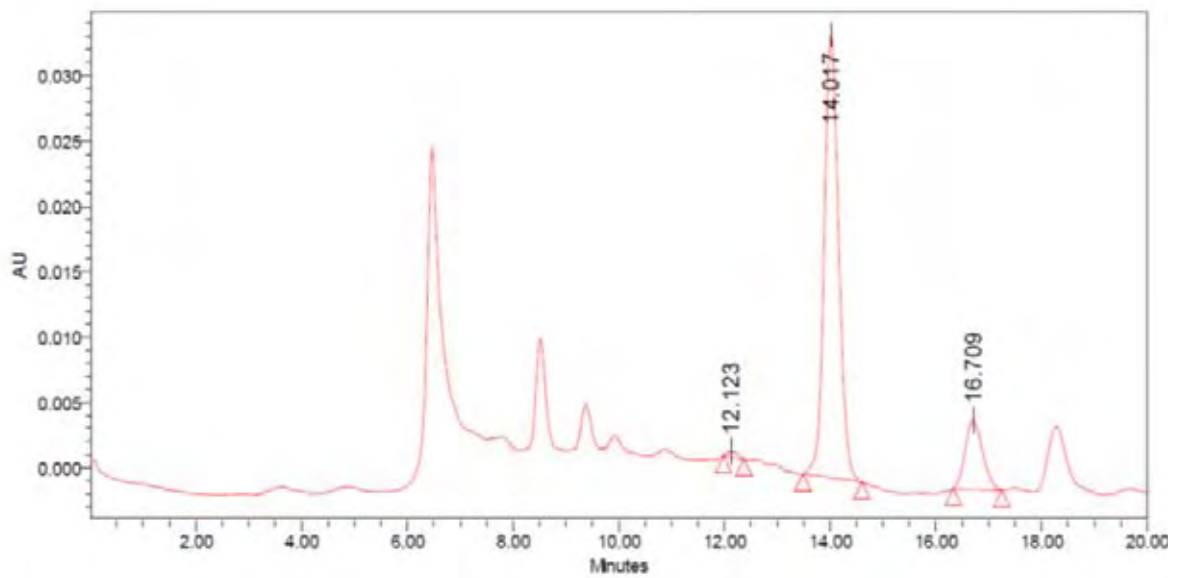


Figura 16. Perfil cromatográfico do caldo fermentativo da Cepa 16, cultivada em meio MRS, após 26h de fermentação, temperatura de 36°C, 120 rpm, pH $5,3 \pm 0,1$.

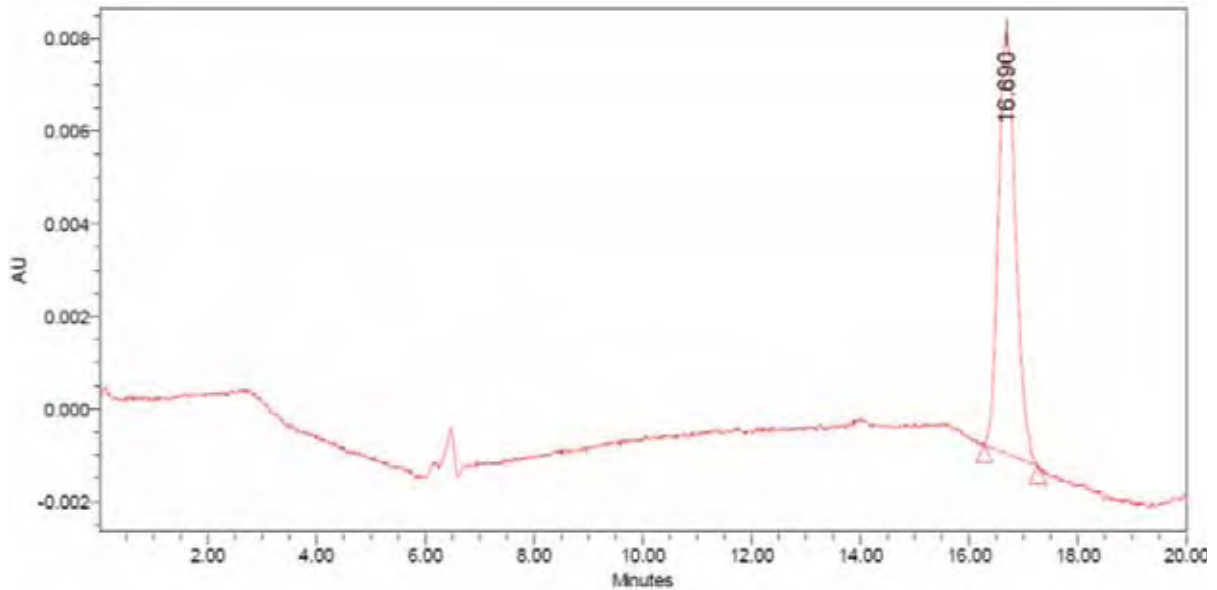
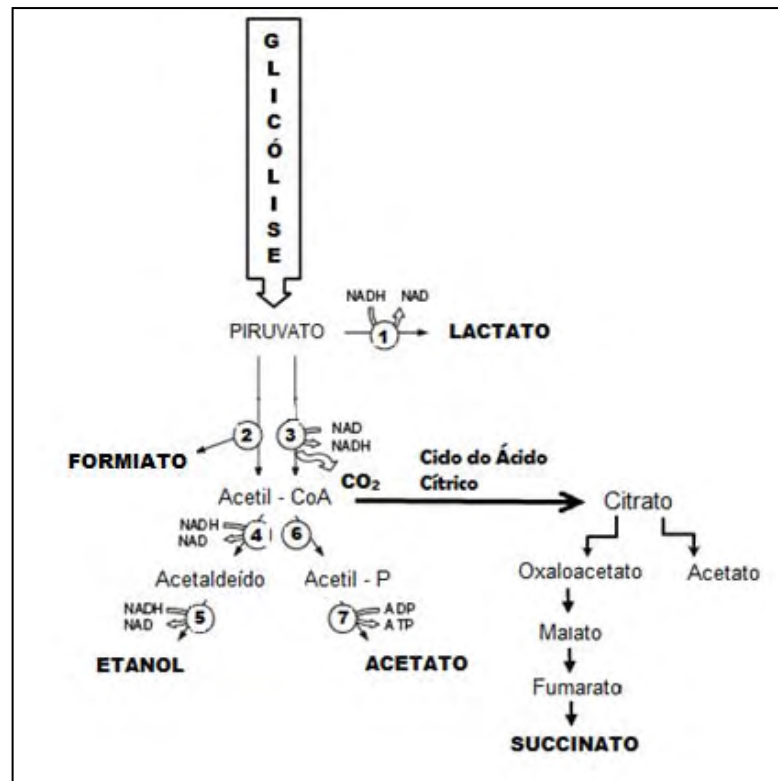


Figura 17. Cromatograma do padrão de ácido acético.

Com base nas informações cromatográficas foi verificada a produção de ácido láctico durante as fermentações pelas bactérias 16 e 22, confirmando que ambas são produtoras do ácido láctico (Figuras 15 e 16). Também foram avaliadas as presenças do ácido acético e do ácido succínico nos processos, cujos tempos de retenção são respectivamente 16.690 e 12.545.

Trata-se de um fato conhecido que as bactérias lácticas homofermentativas incluem os gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus*; fermentam açúcares pela via Embden - Meyerhoff - Parnas (EMP) no qual o piruvato é convertido exclusivamente em ácido láctico pela ação da lactato desidrogenase (AXELSSON, 2004; MAYO et al., 2010).

Contudo, outros autores afirmam que em condições limitadas de fonte de carbono ou excesso, utilização de outros tipos de açúcares como maltose, galactose e pentoses (resultando em menor taxa de crescimento); faz com que o metabolismo homolático seja substituído pelo metabolismo de ácidos mistos (ou fermentação mista). Sendo assim, o piruvato é desviado para uma rota alternativa com a síntese de outros metabólitos como formato, acetato, etanol e CO₂ (BOUSQUET et al., 2002; EVEN et al., 2001; GARRIGUES et al., 2001) (Figura 18).



Fonte: Axelsson, (2004); Mayo et al., (2010) modificado.

Figura 18. Metabolismo de ácidos mistos. Enzimas que catalisam as reações: 1- Lactato desidrogenase (LDH); 2- Piruvato Formiato Liase (PFL); 3- Piruvato Desidrogenase; 4- Acetaldeído desidrogenase (ACDH); 5- Álcool desidrogenase (ADHE); 6- Fosfotransacetilase (PTA); 7- Acetato quinase (ACK).

Essa modificação no metabolismo do piruvato está relacionada ao controle da atividade das seguintes enzimas: Lactato desidrogenase (LDH), piruvato formiato liase (PFL) e a gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase (GADPH); em função da razão de NADH/NAD⁺.

Quando a proporção entre NADH / NAD⁺ é baixa, a LDH torna-se inativa, com isso a GADPH é ativada impedindo o aumento da triose fosfato, frutose 1-6 difosfato e do gliceraldeído -3- fosfato (moléculas chave, intermediárias da glicólise). Nessas condições a inibição da PFL é muito fraca e o metabolismo do piruvato é re-direcionado para a fermentação de ácidos mistos (GARRIGUES et al., 2001; KOEBMANN et al., 2005; KOWALCZYK; BARDOWSKI, 2007).

Yun et al., (2003) investigaram os efeitos de várias fontes de carbono na produção de ácido lático por *Enterococcus faecalis* RKY1. Os autores comprovaram que na presença de glicose, frutose ou maltose a produção de ácido ocorreu normalmente sem obtenção de metabólitos secundários. Ao contrário quando a galactose foi utilizada como fonte de C no meio; os ácidos acético e fórmico foram produzidos em maior quantidade. Perceberam ainda que o mesmo micro-organismo foi capaz de produzir ácido succínico com altos rendimentos em meio contendo ácido fumárico e glicerol. O ácido fumárico funciona como acceptor de H^+ enquanto o glicerol funciona como doador de H^+ na bioconversão de ambos os ácidos em succinato.

A presença do ácido succínico mostrado na Figura 16, que foi produzido durante o processo está relacionado ao desvio do metabolismo do piruvato que segue a rota do ciclo do ácido cítrico.

Inicialmente o piruvato é oxidado pela piruvato desidrogenase, no qual o grupo carboxila é removido do piruvato na forma de uma molécula de CO_2 e os dois carbonos remanescentes tornam-se o grupo acetil do acetil-CoA. O acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico, transfere o seu grupo acetil para o oxaloacetato para formar o citrato. O citrato é transformado em isocitrato e este é desidrogenado com perda de CO_2 para formar o α -cetoglutarato. A partir deste último que também sofre uma descarboxilação ($-CO_2$) libera o succinato que é convertido enzimaticamente (em reação de três etapas) no oxaloacetato com o qual o ciclo se iniciou. Para iniciar uma volta do ciclo uma molécula de oxaloacetato reage com uma nova molécula de acetil-CoA para formar o citrato como pode ser observado na Figura 18 (LENINGHER, 2010).

Os resultados obtidos neste estudo permite pressupor que a bactéria 16 apresentou desvio metabólico com produção de ácido succínico, devido ao fato da fermentação não ser conduzida em estrita anaerobiose dentro do biorreator. O biorreator opera com agitação de 0.60 x G e ocorre certa oxigenação no meio e propicia o metabolismo da bactéria para transformar o piruvato aerobiamente seguindo a rota do ciclo do ácido cítrico (Figura 16).

4.8 Identificação molecular das bactérias

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das cepas 16 e 22 apresentaram entre 99 e 100% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S das linhagens tipo *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus hirae*, além de similaridade com sequências de várias linhagens de *Enterococcus* sp contidas nas bases de dados consultadas Genbank e RDP. A análise filogenética recuperou as duas cepas no mesmo cluster com 50% de re-amostragem com as linhagens tipo *Enterococcus durans* e *Enterococcus faecium* não sendo possível a identificação em nível de espécie, entretanto, cabe ressaltar que ambas as cepas 16 e 22 apresentaram alta similaridade entre suas sequências podendo inclusive ser consideradas réplicas (Figura 19).

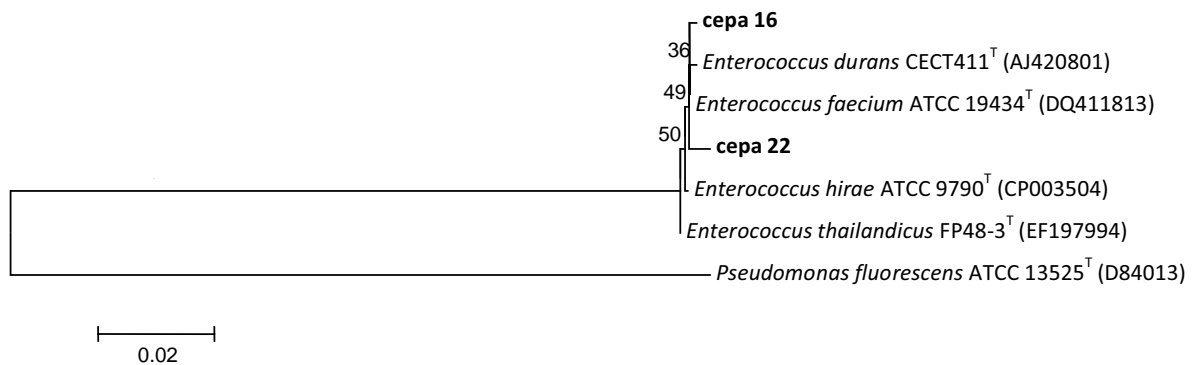


Figura 19. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S das nomeadas cepa 16 e cepa 22 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank.

5. CONCLUSÕES

As duas cepas 16 e 22 foram identificadas com 99% e 100% de similaridade podendo ser: *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus hirae*. Não foi possível identificar precisamente quais espécies correspondem as cepas estudadas.

Como nesse trabalho objetivou-se selecionar bactérias produtoras de L (+) ácido láctico, conclui-se que as cepas provenientes de usinas sucroalcooleiras e de alimentos cárneos foram as que apresentaram melhor produção em ácido láctico.

O ajuste do pH durante as fermentações favoreceu maior produção de ácido láctico.

O emprego das cepas 16 e 22 em processos fermentativos industriais controlados foi promissor devido ao fato dessas bactérias possuírem perfis metabólicos diferenciados, convertendo a glicose em ácido láctico em menor tempo.

Outros ensaios para quantificar a produção de ácido láctico em condições otimizadas pode indicar melhores rendimentos das linhagens estudadas. Dentre os estudos alternativos seria realizar fermentações com diferentes fontes de carbono: glicose, sacarose, lactose, vários tipos de pentose; fontes de nitrogênio e microelementos necessários para o desenvolvimento das bactérias lácticas.

A quantificação do ácido láctico com o lactímetro mostrou ser uma metodologia confiável para a análise de L (+) ácido láctico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERBERG, C.; HOFVENDAHL, K.; ZACCHI, G.; HAHN-HAGERDAL, B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole wheat flour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 682-690, 1998.

AKSU, T.; BAYTOK, E.; BOLAT, D. Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility. **Small Ruminant Research**, v. 55, p. 249 - 252, 2004.

ALPERT, N. R. Lactate production and removal and the regulation of metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 119, n. 3, p. 995-1012, 1965.

AMRANE A. Evaluation of lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.16, p. 207-209, 2000.

AURAS, R.A.; HARTE, B.; SELKE, S. **Poly (lactide): moisture sorption characteristics and storage consequences**. In: ANTEC 2003 THE 61ST ANNUAL TECHNICAL CONFERENCE OF THE SOCIETY OF PLASTICS ENGINEERS, n. 61 th, may 4-8, 2003, Nashville.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S; LAHTINEN, S.; OUWEHAND A.C.; WRIGHT A.V. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. New York: Marcel Decker, 2004. p. 30.

BJÖRKROTH, J.; DICKS, L.M.T.; HOLZAPFEL, W.H. Genus III. *Weissella*. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 3, **The Firmicutes**, Eds. DE VOS, P., GARRITY, G.M.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. p. 643–654. Springer, New York. 2009.

BOGAERT, J.C.; NAIDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Section V: Acid – Antimicrobials, Chapter 22, Lactic Acid, 2010.

BOONMEE, M.; LEKSAWASDI, N.; BRIDGE, W.; ROGERS, P.L. Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p.127–135, 2003.

BORCH, E.; MOLIN, G. The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix* and *Carnobacterium* in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 81–88, 1989.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. Editora Edgard Blücher, v. 2, p. 93-109, 2001.

BOUDRANT, J.; MENSHUTINA, N.V.; SKOROHODOV, A.V.; GUSEVA, E.V.; FICK, M. Mathematical modelling of cell suspension in high cell density conditions: Application to L-lactic acid fermentation using *Lactobacillus casei* in membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1641-1647, 2005.

BOUSQUET, M.C.; EVEN S.; LINDLEY, N.D.; LOUBIÈRE P. Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Mini – Review, v. 60, p. 24-32, 2002.

BRECHT, 1967. Muskelphysiologie. In KEIDEL: Physiologie pp. 262-294. Stuttgart:Thieme Verlag. (LIVRO: Section V Acid Antimicrobials) 2000 CRC Press LLC.

BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E.; COWAN, S.T., HOLT, J.G.; LISTON, J.; MURRAY, R.G.E.; NIVEN, C. F.; RAVIN, A.W.; STAINER R.Y. **Bergey's Manual of Determinative bacteriology**. Eight Edition. Baltimore: The Willians & Wilkins Company, 1974.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-246, 1992.

BUSTOS, G.; MOLDES, A.B.; ALONSO, J.L.; VÁZQUEZ, M. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. **Food Microbiology**, v. 21, p. 143-148, 2004.

CAI, Y.; YANG, J.; PANG, H.; KITAHARA, M. *Lactococcus fujiensis* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 1590-1594, 2011.

CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. The use a understanding of media in brewing bacteriology. I Early history and development of general purpose media. **Brewer Digest**, v. 56, n. 2, p. 26-33, 1981.

CHO, S.L.; NAM, S.W.; YOON, J.H.; LEE, J.S.; SUKHOO, A.; KIM, W. *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1844–1849, 2008.

COELHO, L.F. **Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para a produção de ácido láctico**. 2011. 134f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

COELHO, L.F.; DE LIMA, C.J.B.; BERNARDO, M.P.; ALVAREZ, G.M.; CONTIERO, J. Improvement of L(+)-lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 90, p. 1944–1950, 2010.
 COLLINS, M.D.; FARROW, J.A.E.; PHILLIPS, B.A.; KANDLER, O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 8–12, 1983.

COLLINS, M.D.; FARROW, J.A.E.; PHILLIPS, B.A.; FERUSU, S.; JONES, D. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 310–316, 1987.

COLLINS, M.D.; RODRIGUES, U.; ASH, C.; AGUIRRE, M.; FARROW, J.A.E.; MARTINEZ, A.M.; PHILLIPS, B.A.; WILLIAMS, A.M.; WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 5–12, 1991.

COLLINS, M.D.; SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages: Description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, p. 595–603, 1993.

DATTA R., HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1119–129, 2006.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics — compensation for lactase insufficiency. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 421–429, 2001.

DELVES, J.B.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 69, p.193-202, 1996.

DOBSON, C.M.; DENEER, H.; LEE, S.; HEMMINGSEN, S.; GLAZE, S.; B. Ziola. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2003–2010, 2002.

DURSELEN L.; DAUNER M.; HIERLEMANN H.; PLANCK H.; CLAES L.E.; IGNATIUS A. Resorbable polymer fibers for ligament augmentation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 58, p. 666–672, 2001.

DYKHUIZEN, D. E. Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 25–33, 1998.

EVEN S.; LINDLEY N.D.; BOUSQUET, M.C. Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3817–3824, 2001.

FORTINA, M.G.; RICCI G.; ACQUATI A.; ZEPPA G.; GANDINI, A.; MANACHINI, P. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma Piemontese. **Food Microbiology**, v. 20, p. 397–404, 2003.

GARCÍA, F.D.G. **Enterococcus in Milk and Dairy Products**. In: Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition Online: John W. Fuquay, Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney. Universidad Complutense, Madrid, Spain; 3200 pages, Academic Press, 2011.

GARRIGUES, C.P.; MERCADE, M.; BOUSQUET, M.C.; LINDLEY, N.D.; LOUBIERE, P. Regulation of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* depends on the imbalance between catabolism and anabolism. **Biotechnology Bioengineering**, v. 74, n. 2, p. 108–115, 2001.

GARVIE, E.I.; MABBITT, L.A. Stimulation of the growth of *Leuconostoc oenos* by tomato juice. **Archives für Mikrobiologie**, v. 55, p. 398 - 407, 1967.

GEIGY, J.R., 1968. In: BOGAERT, J.C.; NAIDU, A.S.;. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Section V: Acid – Antimicrobials, Chapter 22, Lactic Acid, 2010.

GHALY, A. E.; TANGO, N.S.M.; AVERY, A.C. Batch propagation of *Lactobacillus helveticus* for production of lactic acid from lactose concentrated cheese whey with microaeration and nutrient supplementation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 65-75, 2004.

GHORPADE, V.M.; GENNADIOS, A.; HANNA, M.A. Laboratory composting of extruded poly (lactic acid) sheets. **Bioresource Technology**, v.76, p. 57–61, 2001.

GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1316-1325, 2005.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 4, p. 455–482, 2007.

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B.J.B.; HOLZZAPFEL, W.H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie, 1995. v.2, p. 19-34.

HEMME, D. ; SCHEUNEMANN, C. F. *Leuconostoc* characteristics use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**. v 14, p. 467–494, 2004.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Editora Edgard Blücher, v. 2, p. 93-109, 2001.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. L (+) lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*, **Enzyme and Microbial Technology**. v. 20, p. 301–307, 1997.

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

HOLZAPFEL, W.H.; VAN WYK, E.P. *Lactobacillus kandleri* sp. nov., a new species of the subgenus *Betabacterium* with glycine in the peptidoglycan. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v. 3, p. 495–502. 1982.

HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M.A.P.; LUDWIG, W.; BACK, W.; DICKS, L.M.T. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**, 3rd Ed., New York, Springer Verlag, 2006, p. 229–266.

HO, M.H.; WANG, D.M.; HSEIH, H.J; LAI, J.Y. Preparation of polylactid scaffolds. In: BO, M.; ASHOK, K.; GALAEV, I. Y. **Macroporous Polymers: Production properties and Biotechnological Biomedical Applications**. CRC Press, 2010. p. 119.

HOSHINO, A.; TSUJI, M.; ITO, M.; MOMOCHI, M.; MIZUTANI, A.; TAKAKUWA, K. Biodegradable polymers and plastics. In: Chiellini, E. , Solaro, R. (Ed.), **Study of the Aerobic Biodegradability of Plastics Materials Under Controlled Compost**, v. 47, Plenum Press, New York (Chapter 21). 2003.

HUGENHOLZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v. 12, p. 165–168, 1993.

HUJANEN, M.; LINKO, Y. Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 307-313, 1996.

HUYS, G.; LEISNER, J.; BJÖRKROTH, J. The Lesser LAB Gods: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* and affiliated genera. In: SALMINEN, S.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; WRIGHT, A.V. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. Fourth Edition, New York: CRC Press, 2012.

JONES, D. **Composition and differentiation of the genus Streptococcus** In: F.A. Skinner and L.B. Quesnel (editors). **Streptococci**. Society for Applied Bacteriology Symposiums, Series n. 7. Academic Press, London. p. 149. 1978.

JUSTÉ, A.; LIEVENS, B.; FRANS, I.; MARSH, T.L.; KLINGEBERG, M.; MICHIELS, C.W.; WILLEMS, K.A. Genetic and physiological diversity of *Tetragenococcus halophilus* strains isolated from sugar and salt rich environments. **Microbiology**, v. 154, p. 2600–2610, 2008.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 49, 209–224, 1983.

KEUTH, S.; BISPING, B. Formation of vitamins by pure cultures of moulds and bacteria during the solid substrate fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, n. 5, p. 427-434, 1993.

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE K.; YOON, S.H. ; KIM, M.; HYUNSOO, N. et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 716-721, 2011.

KIM, M.; CHUN, J. Bacterial community structure in Kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 103, p. 91–96, 2005.

KIMURA, M. Average time until fixation of a mutant allele in a finite population under continued mutation pressure: Studies by analytical, numerical, and pseudo-sampling methods. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 1, p. 522-526, 1980.

KOEBMANN, B.J.; SOLEM, C.; JENSEN, P.R. Control analysis as a tool to understand the formation of the las operon in *Lactococcus lactis* . **FEBS Journal**, v. 272, p. 2292 - 2303, 2005.

KOWALCZYK, M.; BARDOWSKI, J. Regulation of Sugar Catabolism in *Lactococcus lactis*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 33, p. 1–13, 2007.

KUBOTA, H., TSUJI, H., MATSUDA, K.; KURAKAWA, T.; ASAHARA, T. K.; NOJIMOTO. Detection of human intestinal catalase negative Gram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription – PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 16, p. 5440–5451, 2010.

LANE, D.J.; PACE B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5ª edição. Artmed Editora, 2010.

LEROY, F.; VUYST, L. de. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 67-78, 2004.

LI, S.; TENON, M. ; GARREAU, H. ; BRAUD, C.; VERT, M.:. Enzymatic degradation of stereo copolymers derived from L-, DL- and meso-lactides. **Polymer Degradation Stability**, v. 67, p. 85–90, 2000.

- LI, H.; MUSTACCHI, R.; KNOWLES, C.J.; SKIBAR, W.; SUNDERLAND, G.; DALRYMPLE, I.; JACKMAN, A. An electrokinetic bioreactor: using direct electric current for enhanced lactic acid fermentation and product recovery. **Tetrahedron**, v. 60, p. 661-665, 2004.
- LIEW, S.L.; ARIFF, A.B.; RAHA, A.R.; HO, Y.W. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, Article In Press, p.1-6, 2005.
- LIN, M.Y.; YOUNG, C.M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5-6, p. 409-413, 2000.
- MADHAVAN, N.K.; NIMISHA, R.N.; ROJAN, P.J. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101 p. 8493-8501, 2010.
- MADIGAN M.T.; MARTINKO J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 11th edição, Sanddle River, 2008.
- MÄKI, M.. Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Third Ed., New York, Marcel Dekker Inc., 2004, p. 419-430.
- 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. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 44, p. 371-374, 1998.
- MAYO, B.; PIEKARCZYK, T.A.; FERNANDÉZ, M.; KOWALCZYK, M.; MARTÍN, P.A.; BARDOWSKI, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G.M. **Biotechnology of lactic acid bacteria novel applications**. Ames, Iowa, USA, Wiley Blackwell Publishing, 2010, p. 3-7.
- MCDONALD, L.C.; FLEMING, H.P.; HASSAN, H.M. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2120-2124, 1990.
- MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v 31, p. 426-428, 1959.
- MIN-TIAN, G.; HIRATA, M.; KOIDE, M.; TAKANASHI, H.; HANO, T. Production of L-lactic acid by eletrodialysis fermentation (EDF). **Process Biochemistry**, Article In Press, 2003.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MANCILHA, I.M.; ROBERTO, I.C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v 40, p. 437–444, 2008.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v 7, n.2, p. 167-179, 2004.

NAVEENA, B. J.; ALTAF, Md.; BHADRIAH, K.; REDDY, G. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 485-490, 2005.

ODA, Y.; YONETSU, A.; URAKAMI, T.; TONOMURA, K. Degradation of polylactide by commercial proteases. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 8, n. 1, p. 29–32, 2000.

OLIVEIRA, V.M.D.; SETTE, L.D.; GARBOGGINI, F. F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Revista Multiciência**, p. 1-19, 2006.

ONDA T, YANAGIDA F, UCHIMURA T, TSUJII M, OGINO S, SHINOHARA T, YOKOTSUKA K. Widespread distribution of the bacteriocin - producing lactic acid cocci in Miso-paste products. **Journal Applied Microbiology**, v. 92, p. 695-705, 2002.

ORLA-JENSEN, Sigurd. **The lactic acid bacteria**. AF Høst, 1919.

PARAJÓ, J.C.; ALONSO, L.; MOLDES, A.B. Production of lactic acid from lignocellulose in a single stage of hydrolysis and fermentation. **Food Biotechnology**, v 11, n.1, p. 45-58, 1997.

PEREIRA, C. S. M.; SILVA, V. M. T. M.; RODRIGUES, A. E. Ethyl lactate as a solvent: properties, applications and production processes – a review. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2658-2671, 2011.

PIARD, J. C.; LOIR, Y.L.; POQUET, I.; LANGELLA, P. **Utilização das bactérias lácticas no centro dos novos desafios**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - Encarte Especial. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>. Acesso em: 28 abr. 2005.

- PORRO, D.; BIANCHI M.M.; BRAMBILLA L.; MENGHINI R.; BOLZANI D.; CARRERA, V. Replacement of a metabolic pathway for large scale production of lactic acid from engineered yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4211–4215, 1999.
- POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 6, p. 217-218, 1995.
- RACCACH, M. *Pediococci* and Biotechnology. **Critical Reviews in Microbiology**, v 14, n. 4, p. 291 - 309, 1987.
- ROSALES, S.Y.R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica**: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. 1989. 200 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1989.
- SAITOU N.; MASATOSHI N. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4, p. 406-425, 1987.
- SAKATA, M. M.; RINCON, M.C.A. do; DUEK, E. A. R. Estudo da interação polímero / cartilagem / osso utilizando Poli (ácido lático - co - ácido glicólico) e Poli (p- Dioxanona) em condilo femural de coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 3, p. 176-180, 2004.
- SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: ácido lático uma alternativa. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.37-40, 1991.
- SOARES, M. M.; RIBEIRO, M. C. **Microbiologia prática roteiro e manual: bactérias e fungos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.
- SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Potential of solid state fermentation for production of L (+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 286-290, 1994.
- STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.
- SYBESMA, W.; STARRENBURG, M.; KLEEREBEZEM, M.; MIERAU, I; DE VOS, W.M.; HUGENHOLTZ, J. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3069-3076, 2003.

TAMURA K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; MASATOSHI, N.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

TAN, M.L.; CHOONG, P.F.; DASS, C.R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v. 31, p. 184–93, 2010.

TANAKA, T.; HOSHINA, M.; TANABE, S.; SAKAI, K.; OHTSUBO, S.; TANIGUCHI, M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, Article In Press, 2005.

TARANTO, M.P.; FERNANDEZ, M.L.; LORCA, G.; DE VALDEZ, G.F. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 86-91, 2003.

TAY, A.; YANG S.T. Production of L(+)-Lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 1, p. 1-12, 2002.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIMBUNTAM, W.; SRIROTH, K.; TOKIWA, Y. Lactic acid production from sugar-cane by a newly isolated *Lactobacillus sp.* **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 811-814, 2006.

TOKIWA, Y. ; JARERAT, A. Biodegradation of poly (L-lactide). **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 771–777, 2004.

TORRES, A.; LI, S. M.; ROUSSOS, S.; VERT, M. Degradation of L and DL- lactic acid oligomers in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Pseudomonas putida*. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, v. 4, p. 213–223, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. Tenth edition, San Francisco, Pearson, 2010.

TORSVIK, V., OVREAS, L. & THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, p. 1064 – 1066, 2002.

TSUJI, H.; IKADA, Y. Autocatalytic hydrolysis of amorphous made polylactides: effects of lactide content, tacticity and enantiomeric polymer blending. **Macromolecules**, v 43, n. 6, p. 1789 - 1796, 2002.

TUOMINEN, J. **Chain linked lactic acid polymers: Polymerization and biodegradation studies**. Ed. Polymer Technology Publication Series, Finland, n. 25, 2003.

VERSARI, A.; PARPINELLO, G.P.; CATTANEO, M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 447–455, 1999.

VIANA R.; YEBRA M.J.; GALAN J.L.; MONEDERO V.; MARTINEZ, G.P. Pleiotropic effects of lactate dehydrogenase inactivation in *Lactobacillus casei*. **Research in Microbiology**, v 156, n. 5, p. 641 - 649, 2005.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRIC, T. Recent Trends in the production, purification and application of Lactic Acid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v 22, n. 2, p. 245–264, 2008.

WEISS, N. The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In **The Prokaryotes**, 2nd ed., Eds. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer, p. 1502–1507, Springer-Verlag, New York. 1992.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; STROUMTSOS, L.Y.; FERTIG, M.N. **The Merck Index: Na Encyclopedia of Chemicals and Drugs**. Ninth Edition. Rahway: Merck & Co. Inc., 1976.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 95, p. 6578 – 6583, 1998.

WCMC, Groombridge. **Global biodiversity: Status of the Earth's living resources**. WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE (CMC), 1992.

YEN, H.W.; CHEN, T.J.; PAN, W.C.; WU, H. J. Effects of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 26, p. 437 – 441, 2010.

YUMOTO, I.; IKEDA, K. Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. **Biotechnology Letters**, v.17, n. 5, p. 543-546, 1995.

YUN J.S.; WEE, Y.J.; RYU, H.W. Production of optically pure L (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1 . **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 416-423, 2003.

7. APÊNDICE

7.1 Apêndice A - Sequências parciais do operon RNA ribossomal dos isolados.

>cepa 16

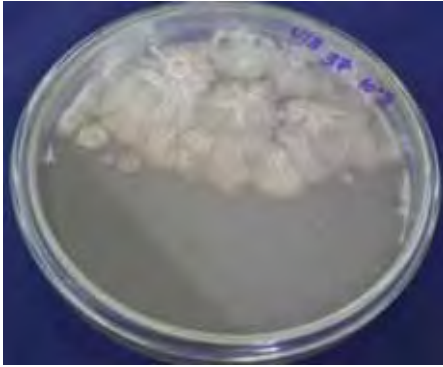
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACA
 GGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTT
 TCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
 GCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGG
 GACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCA
 ATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATC
 GTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA
 CGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT
 CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGG
 GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACG
 CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCT
 AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACG
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACACTAGAGATAGAGCTTCC
 CCTTC

>cepa 22

TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
 CCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
 GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAG
 TCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGT
 TGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACC
 AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT
 GTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGT

GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGAAACGCGAAGAACCT
TACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCAATCGAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGG
CAAAGTGACAGGTGGTGC

7.2 Apêndice B - Aspectos morfológicos das colônias dos isolados de acordo com as procedências.



Cepa 7. Dorna de usina sucroalcooleira



Cepa 13. Peixe



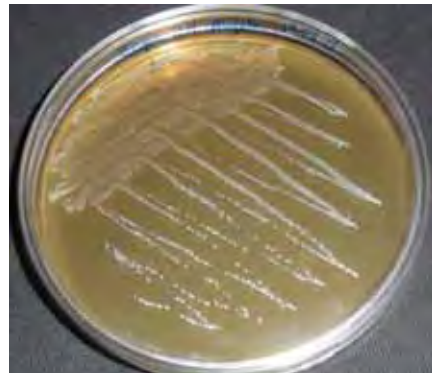
Cepa 16. Dorna de usina sucroalcooleira



Cepa 18. Queijo ricota



Cepa 22. Pele de salame



Cepa 24. Dorna de usina sucroalcooleira