
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE MICROBIOLOGIA APLICADA**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR LACTOBACILOS EM
DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

ANGELA ROMERO LOPES

Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro
Março - 2008**

Aos meus pais: *João e Ana Maria,*
Dedico

“Pensamentos valem e vivem pela observação exata ou nova, pela reflexão aguda ou profunda; não menos querem a originalidade, a simplicidade e a graça do dizer.”

Machado de Assis

AGRADECIMENTOS

- À Deus.
- Aos meus pais João Batista Simões Lopes e Ana Maria Romero Lopes por me darem apoio, carinho, incentivo e oportunidade de estudo.
- À profa. Dra. Dejanira Franceschi de Angelis por sua orientação, amizade, exemplo incansável de dedicação e paciência.
- Ao prof. Dr. Jonas Contiero pela confiança, amizade e disposição para ajudar.
- Ao prof. Dr. Octavio Antonio Valsechi pelas modificações sugeridas.
- À profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte por sua contribuição na melhoria deste trabalho.
- À profa. Dra. Georgina Michelena por ter cedido duas linhagens de lactobacilos.
- A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Instituto de Biociências para desenvolver esta pesquisa.
- Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Bioquímica, em especial: Inês, Maria Luisa e Beto.
- Às minhas amigas do departamento: Bruna L. Baldissera, Adriana Knob, Roberta Lovaglio, Marcela M. Satow, Danilla A. de Oliveira, Fabiana A. Heicklein, Ariane C. Bertolletti, Luciana F. Coelho pelo apoio e incentivo.
- Aos amigos: César R. Terrasan, Alex F. de Almeida, Ricardo Ventura, Waldenilson “Zito” e Acácio Navarette pela ajuda.
- A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Bactérias Láticas.....	6
3.1.1 Caracterização.....	6
3.1.1.1 O gênero <i>Lactobacillus</i>	8
3.1.2 Bactérias lácticas na indústria.....	11
3.2 Bactérias lácticas como contaminantes industriais.....	14
3.2.1 Formas de controle das bactérias lácticas.....	16
3.3 Otimização da produção de ácido láctico por bactérias.....	19
3.4 Ácido láctico.....	21
3.4.1 Propriedades.....	21
3.4.1.1 Configuração do ácido láctico.....	23
3.4.2 Obtenção.....	24
3.4.3 Aplicações.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Material	32
4.1.1 Equipamento portátil Accutrend Lactate®.....	32
4.1.2 Espectrofotômetro.....	32
4.1.3 Agitador tipo mesa rotatória.....	32
4.1.4 Refratômetro de brix de campo.....	32
4.1.5 Culturas de bactérias lácticas utilizadas.....	33
4.1.6 Meios de cultivo.....	33
4.1.6.1 Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	34

4.1.7 Reagentes.....	34
4.1.7.1 Ácido 3,5–dinitro acetil salicílico (ADNS).....	34
4.1.7.2 Kit enzimático Laborlab®.....	34
4.2 Método.....	34
4.2.1 Preparo dos meios de cultivo.....	34
4.2.1.1 MRS modificado.....	34
4.2.1.2 Meio CSN modificado.....	34
4.2.1.2.1 Clarificação do caldo de cana: FALCÃO DE MORAIS et al (1983).....	34
4.2.1.3 Meio de caldo de cana líquido suplementado (CSN).....	35
4.2.1.4 MRS líquido (DIFCO, 1984).....	35
4.2.1.5 Meio Padrão (LOPES, 1979).....	35
4.3 Preparo do extrato de tomate.....	35
4.4 Reagentes.....	36
4.4.1 Ácido 3,5–dinitro acetil salicílico (ADNS).....	36
4.5 Manutenção e ativação das culturas.....	36
4.6 Parâmetros analisados.....	36
4.6.1 Determinação da acidez por titulometria.....	36
4.6.2 Dosagem da glicose.....	37
4.6.2.1 Dosagem da glicose por método enzimático.....	39
4.7 Quantificação do ácido láctico.....	40
4.8 Cultivo das bactérias para produção do ácido láctico.....	41
4.9 Procedimento para cálculo dos custos de produção do ácido láctico.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Produção de ácido láctico pelas bactérias utilizadas.....	43
5.2 Enriquecimento dos meios de cultivo.....	47
5.3 Análise das produções de ácido láctico pelo Accutrend Lactate®.....	53
5.4 Custo da produção de ácido láctico.....	55
6. CONCLUSÃO.....	58
7. LITERATURA CITADA.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Organização do gênero <i>Lactobacillus</i>	9
Tabela 2.	Lista das espécies de <i>Lactobacillus</i>	10
Tabela 3.	Parâmetros de vinho obtido de fermentação de mosto de melaço por leveduras, contaminado com pool de bactérias lácticas, corrido em batelada durante 9h, a 32°C sob agitação.....	16
Tabela 4.	Composição dos meios de cultivo.....	33
Tabela 5.	Produção de ácido láctico pelas bactérias <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 103.10.1, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 103.10.2, <i>Lactobacillus fermentum</i> 292B, <i>Lactobacillus fermentum</i> e “Cambuchá” empregando os meios de cultivo: MRS modificado, CSN 5brix e CSN 12brix, em condição estática, sem enriquecimento, temp. de 30 ± 2°C por 72h.....	44
Tabela 6.	Produção de ácido láctico pelas bactérias <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 103.10.2 e bactéria selvagem empregando os meios de cultivo: Padrão, MRS modificado e CSN 12brix em condição agitada (150 rpm), sem enriquecimento, temp. de 30 ± 2°C por 72h.....	46
Tabela 7.	Produção de ácido láctico pelas bactérias <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 103.10.2 e bactéria selvagem empregando os meios de cultivo: CSN 12brix, MRS modificado e Meio Padrão enriquecidos com extrato de tomate (ET) em diferentes concentrações. Temperatura de 30 ± 2°C por 72h, agitação de 150 rpm.....	48
Tabela 8.	Produção de ácido láctico e consumo da glicose pela bactéria selvagem não identificada empregando os meios de cultivo: CSN 12brix, MRS modificado e Meio Meio Padrão enriquecidos com extrato de tomate (ET) em diferentes concentrações. Temp. de 30 ± 2°C por 72h, agitação de 150 rpm.....	50
Tabela 9.	Valores comparativos de custos de meios de cultivo.....	55
Tabela 10.	Custos relativos dos produtos que compõem os meios de cultivo, relacionando-se com a produção de ácido láctico.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias catabólicas das bactérias lácticas.....	8
Figura 2.	Molécula de ácido láctico.....	22
Figura 3.	Reta padrão da glicose.....	38
Figura 4.	Esquema simplificado da técnica utilizada para as análises nos experimentos.....	41
Figura 5.	Quantificação de ácido láctico por titulação nos meios: MRS modificado (—●—), CSN 5 brix (—□—) e CSN 12 brix (—▲—). Fermentação estática, temp. de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. (A) <i>L. delbrueckii</i> 103.10.2 , (B) <i>L. delbrueckii</i> 103.10.1 e (C) <i>L. fermentum</i> 292B.....	45
Figura 6.	Quantificação de ácido láctico (—■—) por titulação produzido por bactéria selvagem e consumo de glicose (—▲—) pelo método do ADNS; 150 rpm, temp. de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.(A) Meio CSN sem extrato de tomate,(B) Meio CSN 4% de extrato de tomate e (C) Meio Padrão 4% de tomate.....	52
Figura 7.	Quantificação enzimática da produção de ácido láctico gL^{-1} por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 103.10.2 e <i>Lactobacillus fermentum</i> 292B mediante o equipamento Accutrend Lactate®, durante 72h de fermentação estática e temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$	54
Figura 8.	Quantificação enzimática da produção de ácido láctico gL^{-1} por bactéria selvagem mediante o equipamento Accutrend Lactate®, durante 72h de fermentação com enriquecimento, 150 rpm, temp. de $30 \pm 2^\circ\text{C}$	54

RESUMO

O ácido láctico é produzido preferencialmente durante o metabolismo fermentativo de carboidratos por bactérias lácticas (BAL). Esse processo metabólico anaeróbico gera 2 moles de ácido láctico partindo-se de 1 mol de glicose. Procurando-se obtenção de ácido em meios de cultivo de baixo custo, foram avaliados 3 meios de cultivo: CSN a base de caldo de cana-de-açúcar, MRS modificado (2% de glicose) e o meio Padrão (4% sacarose). Para cada meio utilizou-se 4 Erlenmeyer's de 250 mL sendo 1 deles o controle e os demais contendo as bactérias. Empregou-se após seleção prévia *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2 e linhagem selvagem não identificada na condição estática ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) e agitada (150 rpm, temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$) por 72 h. Os meios foram enriquecidos com extrato de tomate em diferentes concentrações (0; 0,5 ; 2 e 4%). O ácido láctico produzido foi quantificado enzimaticamente pelo Accutrend Lactate® e a acidez total por titulometria. Acompanhou-se o consumo da glicose pelo método do ADNS. Verificou-se que $34,35\text{gL}^{-1}$ de ácido láctico foram obtidos em 72 h de fermentação agitada pela linhagem selvagem não identificada, no meio CSN 12 brix acrescido de 4% de extrato de tomate, sendo consumidos $16,1\text{ gL}^{-1}$ de glicose. A linhagem *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2 produziu $27,90\text{gL}^{-1}$ de ácido láctico em meio Padrão, contendo 0,5% de extrato de tomate, durante as 72h de cultivo.

Palavras-chave: ácido láctico, fermentação, BAL.

ABSTRACT

The lactic acid is produced preferably during fermentative metabolism of carbohydrate for lactic acid bacteria (BAL). In this anaerobic metabolic process, two lactic acid molecules are produced from each molecule of glucose. In this study *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2 and unidentified wild strain was assayed in three different culture media: modified MRS medium (2% glucose), CSN (sugar-cane juice supplemented with nutrients) and a standard medium (4% sucrose) with agitation or under stationary conditions, enriched with tomato extract (0; 0,5 ; 2 and 4%). The lactic acid produced was measured with the Accutrend Lactate® as well as titration method (verification of acidity); and glucose concentration was determined by ADNS method. The best strain for lactic acid production was unidentified wild strain, presenting 34,35 gL⁻¹ of lactic acid in the CSN 12 brix medium enriched with 4% of tomato extract; 16,1 gL⁻¹ of glucose was consumed, at 30 ± 2°C for 72h, under agitation at 150 rpm.

Key-words: lactic acid, fermentation, BAL.

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico é um composto orgânico que pode ser utilizado em vários setores industriais, tais como: o alimentício, funcionando como preservativo, acidulante, flavorizante, aromatizante e emulsificador; em indústrias farmacêuticas, na produção de cosméticos, formulação de pomadas, loções, no transporte de fármacos, sendo empregado na produção de bases químicas e solventes orgânicos na indústria química, tendo aplicação na área médica com a utilização de seus polímeros (PLA'S) e ambiental na manufatura de plásticos renováveis e biodegradáveis.

Trata-se do ácido orgânico ácido-2-hidroxi-3-propiônico com um β -carbono assimétrico (centro quiral) que possibilita a formação de dois isômeros ópticos: L(+), D(-) e uma mistura DL racêmica. Pode ser obtido por síntese química ou fermentação de carboidratos por bactérias lácticas. O método por síntese química resulta unicamente numa mistura racêmica de ácido láctico (DL); enquanto que o processo fermentativo microbiano propicia a produção de L(+) e o D(-) separadamente ou uma mistura racêmica (DL) em diferentes proporções.

Isso deve-se a presença das enzimas L(+) lactato-desidrogenase ou D(+) lactato-desidrogenase (nLDH) nas células bacterianas. As bactérias lácticas fermentam a glicose por vias diferentes e podem ser divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com o produto final obtido.

Na homofermentação o ácido láctico é o único produto final do metabolismo da glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas ou via glicolítica, na qual o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH); com um ganho líquido de 2 ATP, sendo 2 lactatos por molécula de glicose fermentada. Entretanto na heterofermentação, quantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono e etanol ou acetato são formados a partir da glicose via oxidativa das pentoses (fosfoquinase), sendo o ácido pirúvico e o acetaldeído substâncias intermediárias dessa via para formar o etanol. As bactérias lácticas requerem nutrientes complexos para o seu desenvolvimento tais como: aminoácidos, peptídios, ácidos nucleicos e derivados, vitaminas, sais, ácidos graxos, devido a sua habilidade limitada para sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos. O ácido láctico pode ser obtido pela fermentação de várias matérias-primas, subprodutos ou resíduos industriais (diferentes tipos de açúcares, materiais lignocelulósicos, derivados de amido, do leite, etc). Para que a produção de ácido láctico torne-se viável, é necessário buscar condições do meio de cultivo que favoreçam o processo fermentativo, tornando-o mais eficiente, minimizando custos e os resíduos gerados.

Vários fatores estão envolvidos no processo: tempo da fermentação, variação do pH, temperatura, agitação, enriquecimento do meio (nutrientes), entre outros.

Considerando-se os custos dos nutrientes requeridos pelas bactérias lácticas, tornou-se necessário buscar fontes alternativas para compor o meio de cultivo visando obtenção de maiores teores de ácido láctico, assim como a bioprospecção de novas linhagens.

2. OBJETIVOS

- **Objetivo Geral:** Buscar meios de cultivo alternativos de baixo custo para a produção de ácido láctico.
- **Objetivo Específico:** Isolar linhagens potencialmente capazes de produzir ácido láctico, sob a influência da temperatura, tempo, condições físicas e químicas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias láticas

3.1.1 Caracterização

As bactérias láticas podem ter forma de cocos ou bacilos, ocorrem em cadeia ou isoladamente, são Gram positivas, não apresentam motilidade, não formam esporos, anaeróbias ou anaeróbias facultativas, microaerófilas, não patogênicas (gozando do status “GRAS”– Generally Recognised As Safe), são incapazes de sintetizar ATP através da respiração, catalase negativa, não produzem indol e ácido sulfídrico; apresentam-se em colônias pequenas, a produção de pigmentos é rara, mas se presente, pode ser amarela ou laranja escuro, ou ainda, vermelho escuro (BUCHANAN et al., 1974; HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000).

As bactérias láticas requerem nutrientes complexos para o seu desenvolvimento tais como: aminoácidos, peptídios, ácidos nucléicos e derivados, vitaminas, sais, ácidos graxos, devido a sua habilidade limitada para sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos. Obtém energia através da fermentação de açúcares, os produtos finais do metabolismo podem ser: lactato, acetato, formato, succinato, dióxido de carbono e etanol. A temperatura ótima de crescimento varia entre 30 a 40°C, são acidófilas, toleram níveis de pH baixos, o seu pH ótimo varia em torno de 5,5 a 5,8 , crescendo preferencialmente a um pH entre 5,0 e 4,5; em pH neutro ou em reações alcalinas há uma diminuição na produção de ácido e o crescimento diminui. Estas bactérias são encontradas naturalmente em: efluentes, esgotos, grama, em laticínios, leite, carne e derivados, cerveja, vinho, frutas, suco de frutas, água,

vegetais, pickles, como parasitas na boca, trato intestinal e vagina de animais homotérmicos incluindo o homem. A porcentagem em G + C no genoma é de 34,7 (BUCHANAN et al., 1974; HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000).

As bactérias láticas fermentam a glicose por vias diferentes e podem ser divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com o produto final obtido. Na homofermentação o ácido lático é o único produto final do metabolismo da glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas ou via glicolítica, na qual o ácido pirúvico é convertido em ácido lático pela ação da enzima lactato desidrogenase (**FIG. 1A**). Entretanto na heterofermentação, quantidades equimolares de ácido lático, dióxido de carbono e etanol ou acetato são formados a partir da glicose pela via oxidativa das pentoses (fosfoquinase) sendo que o ácido pirúvico e o acetaldeído são substâncias intermediárias dessa via para formar o etanol (**FIG. 1B**). A proporção de etanol e acetato formado depende do potencial redox do sistema. Este caminho é utilizado pelas bactérias heterofermentadoras facultativas, como *Lactobacillus casei*, enquanto que na fermentação de pentoses e de hexoses e pentoses são realizados por heterofermentadoras obrigatórias como *Leuconostoc* (HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000).

Vários ácidos são formados por homofermentadores, como no caso dos *Lactococci* em condições limitadas de glicose e o crescimento em outros açúcares, como *Lactococcus lactis* na maltose, lactose e galactose, ou ainda num pH muito alto e baixa temperatura. Neste caso, o etanol, o formato, e o acetato são formados em adição ao ácido lático. No metabolismo do piruvato (homofermentação) há a produção de formato e acetil-CoA junto com o ácido lático pela ação da enzima piruvato formato liase (PFL) (**FIG. 1C**). Na presença do oxigênio esta enzima é inativada, e um caminho alternativo no metabolismo torna-se ativo via piruvato desidrogenase (PDH), resultando na produção de dióxido de carbono, acetil-CoA e NADH (HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000)

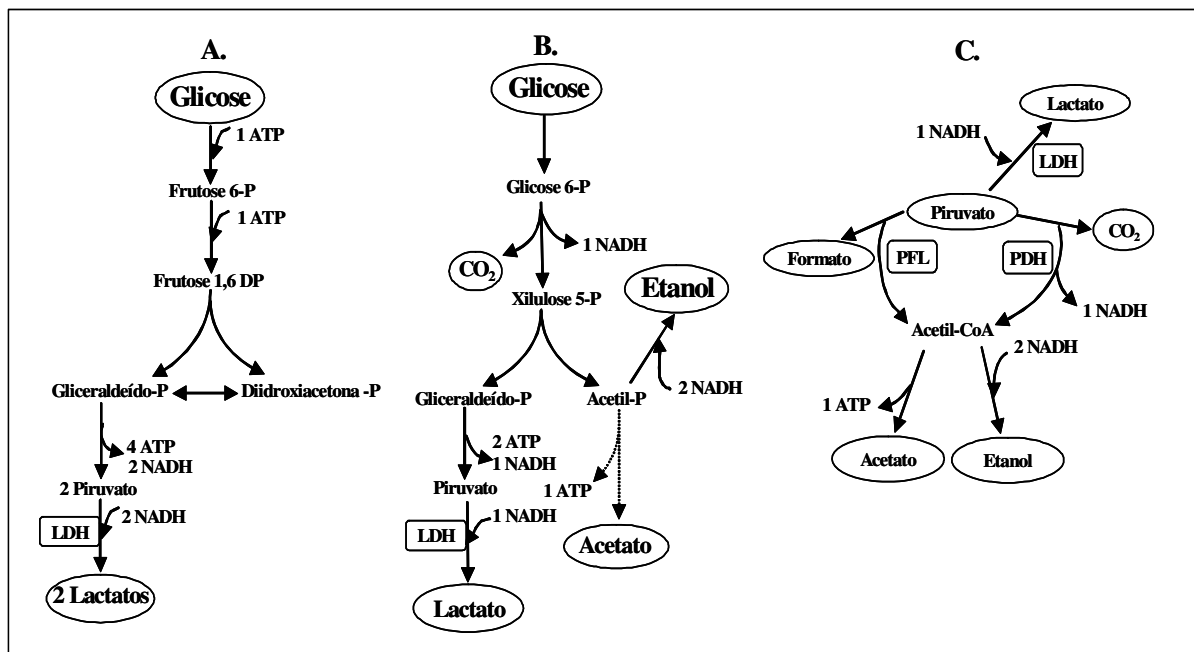


Figura 1: Vias catabólicas das bactérias lácticas. Homofermentação (A), heterofermentação (B) e fermentação de vários ácidos a partir do piruvato (C). P = fosfato, LDH = Lactato desidrogenase, PFL = piruvato formato liase, e PDH = piruvato desidrogenase (Modificado de HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000).

3.1.1.1 O gênero *Lactobacillus*

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* dispõem de características semelhantes às aquelas anteriormente descritas para bactérias lácticas: bacilos ou cocos Gram (+), 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 motiva ou acceptor de elétrons (HAMMES e VOGEL, 1995).

De acordo com Hammes e Vogel (1995), os lactobacilos podem ser divididos quanto à utilização da hexose em:

- **Grupo A: Homofermentativos obrigatórios** – As hexoses são quase que exclusivamente fermentadas (>85%) a lactato pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Esses microrganismos possuem a enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase. A ausência da enzima fosfoetolase, faz com que as pentoses ou o gluconato não sejam fermentados.
- **Grupo B: Heterofermentativos facultativos** – As hexoses são quase exclusivamente fermentadas em ácido lático pela via EMP. Os microrganismos possuem a aldolase e a fosfoetolase, 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 sob condições estritamente anaeróbias, algumas espécies heterofermentativas facultativas devem produzir acetato, etanol e formato no lugar do lactato (partindo-se do piruvato).
- **Grupo C: 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.

Tabela 1. Organização do gênero *Lactobacillus*.

Caráter	Grupo A Homofermentativos obrigatórios	Grupo B Heterofermentativos facultativos	Grupo C Heterofermentativos obrigatórios
Fermentação pentose	-	+	+
CO ₂ da glicose	-	-	+
CO ₂ do gluconato	-	+ ^a	+ ^a
Presença da FDP aldolase	+	+	-
Presença da fosfoetolase	-	+ ^b	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. reuteri</i>

^a Quando fermentado

^b Induzido por pentoses

Fonte: AXELSSON, 1998.

As espécies existentes do gênero *Lactobacillus* descritas até 1995 são mostradas na **Tabela 2.**

Tabela 2. Lista das espécies do gênero *Lactobacillus*

Nº de espécies	Espécies
18	<i>L. acetotolerans</i>
1	<i>L. acidophilus</i>
32	<i>L. agilis</i>
20	<i>L. alimentarius</i>
2	<i>L. amylophilus</i>
3	<i>L. amylovorus</i>
12	<i>L. aviarius</i> subspécie <i>araffinosus</i>
12	<i>L. aviarius</i> subspécie <i>aviarius</i>
21	<i>L. bif fermentans</i>
35	<i>L. brevis</i>
36	<i>L. buchneri</i>
22	<i>L. casei</i> subspécie <i>casei</i>
37	<i>L. collinoides</i>
48	<i>L. confusus</i>
23	<i>L. coryniformis</i> subspécie <i>coryniformis</i>
23	<i>L. coryniformis</i> subspécie <i>torquens</i>
4	<i>L. crispatus</i>
24	<i>L. curvatus</i>
5	<i>L. delbrueckii</i> subspécie <i>bulgaricus</i>
5	<i>L. delbrueckii</i> subspécie <i>delbrueckii</i>
5	<i>L. delbrueckii</i> subspécie <i>lactis</i>
13	<i>L. farciminis</i>
38	<i>L. fermentum</i>
39	<i>L. fructivorans</i>
52	<i>L. fructosus</i>
6	<i>L. gallinarum</i>
7	<i>L. gasseri</i>
25	<i>L. graminis</i>
53	<i>L. halotolerans</i>
19	<i>L. hamsteri</i>
8	<i>L. helveticus</i>
40	<i>L. hilgardii</i>
26	<i>L. homohiochii</i>
27	<i>L. intestinalis</i>
9	<i>L. jensenii</i>
10	<i>L. johnsoni</i>
55	<i>L. kandleri</i>
41	<i>L. kefir</i>

11	<i>L. kefiranofaciens</i>
42	<i>L. malefermentans</i>
15	<i>L. mali</i>
56	<i>L. minor</i>
28	<i>L. murinus</i>
43	<i>L. oris</i>
44	<i>L. parabuchneri</i>
29	<i>L. paracasei subspécie paracasei</i>
29	<i>L. paracasei subspécie tolerans</i>
33	<i>L. pentosus</i>
46	<i>L. pontis</i>
34	<i>L. plantarum</i>
45	<i>L. reuteri</i>
30	<i>L. rhamnosus</i>
16	<i>L. ruminis</i>
31	<i>L. sake</i>
14	<i>L. salivarius subspécie salicinius</i>
14	<i>L. salivarius subspécie salivarius</i>
50	<i>L. sanfrancisco</i>
17	<i>L. sharpeae</i>
48	<i>L. suebicus</i>
49	<i>L. vaccinostercus</i>
47	<i>L. vaginalis</i>
54	<i>L. viridescens</i>

Fonte : Modificado de WOOD e HOLZAPFEL 1995.

3.1.2 Bactérias lácticas na indústria

O grupo das bactérias lácticas tem um papel fundamental nos processos de fermentação industrial. Produzem substâncias antimicrobianas, polímeros de açúcar, compostos aromáticos, vitaminas, enzimas úteis e alguns exibem atividade probiótica. Estes microrganismos promovem uma rápida acidificação do meio (substrato), no qual são formados ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático. Também são produzidos: ácido acético, etanol, bacteriocinas, exopolissacarídeos e várias enzimas de extrema importância (LEROY e 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 sofreu fermentação láctica (PIARD et al., 2005).

Outros aditivos químicos tais como: nitrito, sulfito, ácido propiônico, ácido sórbico e ácido benzóico são comumente aplicados para a preservação dos alimentos. A atividade exibida pelas linhagens de bactérias lácticas ajuda a combater contaminações microbianas; várias substâncias antimicrobianas são sintetizadas pelas bactérias lácticas, estas incluem: os ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico-fenil e ácido capróico), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, diacetil, etanol, bacteriocinas, reuterina e reuteriicina. As bacteriocinas promovem a supressão de microrganismos contaminantes, que produzem sabores desagradáveis em alimentos, muitas são ativas contra patógenos (*Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*), e inibem a atividade de microrganismos produtores de esporos (LEROY e VUYST, 2004).

De acordo com Leroy e Vuyst (2004), a reuterina (β -hidroxipropionaldeído) é ativa contra vários microrganismos como: bactérias, bolores e leveduras, mas não é formada em quantidades suficientes na presença de açúcar. Enquanto que o ácido capróico inibe o crescimento de bolores, o ácido láctico-fenil produzido por *Lactobacillus plantarum* apresenta uma ampla atividade antifúngica. Os polissacarídeos microbianos como a xantana e o gelan, os carboidratos de plantas e as gelatinas aumentam a viscosidade e a consistência dos alimentos, sendo usados para melhorar a textura e o paladar de iogurtes, sorvetes, entre outros. As bactérias lácticas contribuem para a obtenção de aromas e sabores nos alimentos fermentados formando compostos aromáticos, que promovem a aceleração do processo de maturação na fabricação de queijos e a intensificação do sabor. Segundo estes autores, durante o processo de maturação do queijo vários compostos aromáticos são gerados: aminoácidos livres, ácidos graxos e peptídeos devido à ação de enzimas endógenas presentes no leite, assim como, as atividades lipolíticas, proteolíticas e glicolíticas das enzimas produzidas pelas bactérias lácticas.

As bactérias lácticas podem ser usadas como inoculantes (aditivo) na produção de silagens. A inoculação microbiana tem um efeito positivo na silagem devido o aumento dos níveis de ácido láctico, a diminuição dos valores do pH e dos ácidos acético e butírico (AKSU et al., 2004).

Com a diminuição do pH pode-se prevenir o crescimento de *Clostridium tyrobutyricum*, uma bactéria anaeróbia que degrada proteína e produz o ácido butírico, resultando numa baixa palatabilidade da silagem (MEESKE et al., 2002).

Alguns trabalhos sugerem que o uso de bactérias lácticas como inoculantes nas silagens, proporciona melhora do desempenho dos animais, um possível efeito probiótico, a inibição de microrganismos prejudiciais e a interação com os microrganismos do rúmen elevando sua funcionalidade (AKSU et al., 2004).

Além dessas funções tecnológicas, algumas linhagens de bactérias lácticas possuem atividades probióticas ao serem ingeridas vivas por um hospedeiro determinado, exercendo um efeito benéfico direto ou indireto (PIARD et al., 2005).

De acordo com Piard et al. (2005), existem três tipos de atividades probióticas; a primeira relacionada à digestibilidade da lactose, pessoas que são intolerantes a esse tipo de açúcar, tem deficiência da enzima lactase no organismo. Nestas pessoas é comum o aparecimento de sintomas como: diarreias, cólicas abdominais ou flatulência. Uma solução para este problema é a ingestão de iogurte, cuja flora bacteriana suplementa a deficiência de lactase do hospedeiro com a sua própria e estimula a produção endógena da enzima na mucosa intestinal do hospedeiro. Outra atividade probiótica exercida pelas bactérias lácticas é higienizar o tubo digestivo. A presença dessas bactérias na flora do hospedeiro funciona como uma barreira protetora, ajudando o organismo a se defender de contaminações digestivas causadas por bactérias patogênicas. A terceira atividade relaciona-se com certas linhagens de bactérias lácticas que possuem atividades que estimulam a resposta imunológica do hospedeiro contra antígenos, atividades antiolesterolêmicas e antitumorais propostas, dependem de maior comprovação através de estudos *in vivo*.

3.2 Bactérias láticas como contaminantes industriais

A contaminação bacteriana é a maior causa da diminuição na produção de etanol durante a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. As bactérias láticas são encontradas desde a etapa inicial do processo, podendo colonizar colmos, raízes e folhas da cana-de-açúcar (matéria-prima), mosto, passando pelos trocadores de calor até a chegada às dornas de fermentação (CHERUBIN, 2003 ; TILBURY, 1975).

Segundo Lopez et al. (1988) citado por Alcarde (1995) o caldo de cana-de-açúcar contém quantidades variáveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH e temperatura favoráveis que proporcionam o crescimento de uma intensa microbiota.

O número de microrganismos contaminantes na cana-de-açúcar pode variar de acordo com o tratamento que é fornecido, formas de colheita, tipo de transporte, o tempo decorrido entre o corte da cana e seu processamento na usina, armazenamento, estado da matéria-prima ao chegar na usina (limpa, suja, seca, molhada, deteriorada, com raízes) (GALLO, 1989).

Tilbury (1975) citado por Maciel (2001) relata que o número de bactérias láticas presentes nas amostras obtidas a partir de colmos recém-colhidos variou de 5×10^4 UFC.mL⁻¹ a 5×10^5 UFC.mL⁻¹, atingindo valores máximos, na ordem de 10^8 UFC. mL⁻¹, após 3-4 dias de estocagem.

As bactérias láticas adaptam-se bem às condições do processo industrial alcoólico, toleram altas temperaturas, altos teores de álcool, baixo pH, e aí multiplicam-se rapidamente. Em condições anaeróbias metabolizam glicose convertendo-a em ácido lático para obter energia para o crescimento e manutenção de suas células; isto leva a diminuição na produção do etanol, pois cada molécula de glicose que é convertida na produção do ácido lático resulta na perda de duas moléculas de etanol que poderiam ser produzidas pela levedura (NARENDRANATH, et al., 1997).

Rosales (1989) identificou que as bactérias láticas também estão presentes na indústria sucroalcooleira (75,6%). Dentre as bactérias identificadas em maior porcentagem destaca-se o gênero *Lactobacillus* sp (45%).

Rodini (1985) isolou e identificou microrganismos de mosto fermentado de 17 destilarias. Os gêneros contaminantes mais freqüentes foram: *Lactobacillus* sp.,

Leuconostoc mesenteroides, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus lylae*, *Panococcus* sp. e *Acinetobacter calcoaceticus*.

Portanto há uma correlação entre a contaminação por bactérias e as perdas na produção do álcool. O ácido láctico exerce um efeito tóxico nas células das leveduras, inibindo o seu metabolismo e crescimento. Com a diminuição do pH do meio, o ácido láctico não dissociado difunde passivamente através da membrana plasmática da levedura, até que o equilíbrio seja estabelecido. Uma vez que a molécula do ácido entra no citoplasma dissocia-se no devido pH intracelular e os prótons liberados são bombeados para fora da célula com gasto de ATP (DORTA et al., 2006; NARENDRANATH et al., 1997; VENTURA, 2007).

Maiorella et al (1983) citado por Dorta et al (2006) estabeleceram que 40 gL⁻¹ de ácido láctico em meio sintético, foi capaz de reduzir em 80% a população de *Saccharomyces cerevisiae*.

As interações entre *Saccharomyces cerevisiae* e algumas linhagens de lactobacilos foram analisadas por Thomas et al. (2001). Foi verificado que o número de células das leveduras diminuiu 31%, passando de 3,2 x 10⁸ mL⁻¹ para 2,2 x 10⁸ mL⁻¹ na presença de *Lactobacillus fermentum*. Houve perdas na viabilidade (45%) e na produção de etanol (22%).

Nas fermentações etanólicas acometidas por contaminações de bactérias indesejáveis, a concentração final de ácido láctico é proporcional ao de novas células bacterianas produzidas. Deste modo, quando as bactérias lácticas estão presentes em grande número são capazes de aumentar sua biomassa rapidamente e exibirem um potencial metabólico suficiente para competir com as leveduras por açúcar e com isso, há diminuição da produção de etanol (NARENDRANATH et al., 1997).

Oliva-Neto e Yokoya (1994) relataram a queda na eficiência alcoólica de um processo fermentativo após o 15º ciclo, quando o ácido láctico excedeu 6 gL⁻¹ e o número de bactérias contaminantes foi maior que 1,2 x 10⁹ células por mL⁻¹.

Ventura (2007) demonstrou as perdas do processo de produção de etanol pela presença do ácido láctico produzido por bactérias. Nas fermentações onde o teor de ácido

lático foi superior a 774 mg.L^{-1} , houve diminuição no teor de álcool e no crescimento da levedura enquanto que aumentou a floculação (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de vinho obtido de fermentação de mosto de melaço por leveduras, contaminado com pool de bactérias lácticas, corrido em batelada durante 9h, a 32°C sob agitação.

Fermentações	U.F.C ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	Ácido láctico produzido (mg.L^{-1})	Teor alcoólico (%)	Levedura ($\times 10^8 \text{ mL}^{-1}$)	Viabilidade levedura (%)	Floculação média (%)
01, 02, 03	0,01*	20,7	4,72	3,02	84,36	4,0
04, 05, 06	12,80	1089,0	3,80	1,60	76,92	92,0
07, 08, 09	5,40	774,0	4,25	1,86	78,54	74,0
10, 11, 12	0,40	369,0	4,38	2,14	79,23	44,0
13, 14, 15	0,10	108,0	4,70	2,32	81,57	12,0
16	0,05	37,8	4,84	2,68	83,12	6,0

*Valor estimado

Fonte: VENTURA, 2007.

Dorta et al (2006) estudaram o potencial fermentativo de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente às condições altamente estressantes. Essas linhagens foram submetidas a 200 mg.L^{-1} de bissulfito de sódio, 6 g.L^{-1} de ácido láctico, $9,5\%$ (g.L^{-1}) de etanol e $\text{pH} = 3,6$. Os autores constataram que o baixo pH foi o maior fator de estresse superando os outros fatores analisados.

O pH muito baixo aumenta o efeito tóxico do etanol e dos ácidos orgânicos, que promovem a modificação da composição da membrana plasmática, a síntese de proteínas de estresse, a regulação nos processos de troca iônica, assim como a diminuição da atividade metabólica. Nessas condições ocorre inibição ou o mau uso da glicose, com minimização das taxas de crescimento e formação do etanol; pelas células das leveduras (DORTA et al., 2006).

3.2.1. Formas de controle das bactérias lácticas

Vários problemas podem surgir em decorrência da contaminação bacteriana: deterioração da cana, aumento da floculação, perda da viabilidade da levedura, diminuição de massa de fermento, formação de metabólitos indesejáveis. O número elevado de contaminantes provoca instabilidade no processo operacional, prejudicando a centrifugação

de células, aumento do uso de ácido no tratamento do fermento, aumento do tempo de fermentação e elevação de açúcares não fermentados o que compromete o rendimento alcoólico (CHERUBIN, 2003).

Os gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* são contaminantes comuns na fermentação alcoólica, sendo responsáveis pela floculação e morte das células da levedura. A floculação de leveduras é facilmente reconhecida, no microscópio e quando o problema é intenso torna-se visível ao olho nu. Suspensões concentradas de células de leveduras floculadas são transformadas primeiramente em uma fina camada de células que flutam no meio e a seguir, esta camada celular tende a aumentar e ficar mais densa. Os flocos separam-se do meio por sedimentação ou flotação, fenômenos decorrentes da união dos flocos com as bolhas de gás produzidos na fermentação (ISERENTANT, 1996).

A floculação do fermento leva ao assentamento das leveduras no fundo das dornas, entupimento de tubulações, dificuldade na operação das centrífugas, formação de espuma, diminuição na velocidade de fermentação, dificultando a conversão do açúcar em etanol e dióxido de carbono. Para que ocorra uma máxima conversão do açúcar em álcool é necessário que as leveduras permaneçam suspensas e não floculadas. Vários fatores contribuem para a floculação das leveduras: o contato com gomas sintetizadas pelas bactérias, contato entre bactérias indutoras da floculação e leveduras, ou devido à contaminação por leveduras auto-floculantes; o que provoca diminuição no rendimento alcoólico (CHERUBIN, 2003; LUDWIG, et al., 2001).

Vários métodos podem ser utilizados no controle do crescimento de bactérias contaminantes, por exemplo, lavagem ácida do fermento, ajuste do pH do mosto, centrifugação do vinho, a adição de biocidas, antibióticos, antimicrobianos; o uso de biopreservativos, ultra-som e a limpeza constante de moendas, tanques fermentadores, tubulações e trocadores de calor (OLIVA NETO e YOKOYA, 1998; VENTURA, 2007).

Os efeitos do antibiótico virginamicina foram investigados por Hynes et al. (1997), frente a 7 linhagens de lactobacilos. A menor concentração testada desta substância foi 0,5mg Lactrol™ Kg⁻¹, inibindo o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus delbrueckii*. Diferentemente das outras linhagens, *Lactobacillus plantarum* não foi significativamente inibido, sugerindo a

necessidade de uma dose maior do antibiótico para controlá-lo. Neste estudo percebeu-se a variação da sensibilidade das linhagens mediante o uso do antibiótico e a diminuição nas perdas de produção do etanol (acima de 11%).

Em sua pesquisa, Oliva Neto e Yokoya (1998) testaram o efeito de 3,4,4-triclorocarbonil (TCC), um anti-séptico, no crescimento de *Lactobacillus fermentum* pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC); para estabelecer a melhor concentração dessa substância necessária para controlar o crescimento do contaminante. De acordo com os autores, a adição de 0,075 gL⁻¹ de TCC, alginato de cálcio, 1,67 mgL⁻¹ de duodecilsulfato de sódio (SDS) e o extrato de levedura na concentração de 0 a 5 gL⁻¹, inibiram o crescimento de *Lactobacillus fermentum*. Deste modo, a acidez e a contaminação bacteriana foram controladas, com aumento da viabilidade celular e eficiência alcoólica (20,8%) pelas células das leveduras.

Bertoletti et al. (2007) analisaram a ação antimicrobiana do Poliquilgerm® (substância derivada do óleo de mamona) frente a *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante o teste de MIC e plaqueamento, verificaram que esta substância na concentração de 20% inibiu o crescimento da levedura em 99%; enquanto que para a bactéria demonstrou ter ação bactericida inibindo o crescimento em 100% em 24h, sendo a concentração do Poliquilgerm® de 5%.

Oliva-Neto et al. (2004) caracterizaram uma linhagem de levedura com atividade antibacteriana, não floculante, isolada do caldo e mosto de uma destilaria alcoólica. O sobrenadante da cultura da levedura centrifugado e esterilizado por filtração Millipore, foi considerado como o extrato antibacteriano. Para averiguar a possível atividade antibacteriana desse extrato, utilizaram o teste de antibiograma, no qual discos de celulose esterilizados foram embebidos no extrato e colocados em placas de Petri previamente inoculadas com 0,1mL de *Lactobacillus fermentum*. Após a incubação verificaram a formação de halos de inibição com 4 mm de raio, onde não houve crescimento bacteriano. Nos ensaios realizados em meio líquido (10mL de MRS), 0,1–0,4mL de extrato antibacteriano concentrado foram adicionados aos tubos, que foram inoculados com 0,1mL de *Lactobacillus fermentum*. Após 24h de incubação verificaram diminuição da turbidez em 71% e da taxa de crescimento específico da bactéria (56%).

Como uma alternativa ao uso de antibióticos, Franchi et al. (2003) investigaram a eficácia dos biopreservativos: nisina e lisozima combinados com EDTA e Tween 20 em diferentes concentrações; objetivando a eliminação dos contaminantes. Ensaio de MIC foram realizados para determinar a concentração de biopreservativos necessária para inibir o crescimento de linhagens de lactobacilos, bem como, avaliar a susceptibilidade da levedura frente aos biopreservativos. Os resultados revelaram que a nisina foi mais efetiva contra *Lactobacillus confusus* e *Lactobacillus plantarum* sendo que, para inibir o crescimento de *Lactobacillus fermentum* foram utilizadas 9ppm dessa substância. Concentrações acima de 1g.L^{-1} de lisozima não inibiram *Lactobacillus fermentum* ou *Lactobacillus confusus*, entretanto 700 mg.L^{-1} de lisozima inibiram *Lactobacillus plantarum*. Altas concentrações de lisozima e todas as combinações possíveis entre nisina, EDTA e Tween 20, não inibiram o crescimento da levedura.

Pulz (2002), verificou a eficiência dos produtos biocidas Kamoran WP® e Corstan® no controle de *Lactobacillus fermentum* e o efeito desfloculante dessas duas substâncias. Os resultados demonstraram que o efeito do Kamoran WP® foi positivo, não houve floculação durante 48h de fermentação (cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*). Ao contrário, concentrações de 10 a $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Corstan®, estimularam a floculação a partir de 24h de fermentação até o final do processo. Nenhuma ação biocida foi observada para os dois produtos na linhagem de bactéria estudada.

3.3 Otimização da produção de ácido láctico por bactérias

A eficiência de um processo de fermentação láctica pode ser medida pela concentração de ácido láctico produzido, baseado no consumo de substrato e na produtividade (HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000).

Alguns parâmetros devem ser considerados, para melhorar as condições operacionais do processo fermentativo na obtenção do ácido láctico. Em relação a cultura, devem ser avaliados: a temperatura dentro do fermentador, a concentração de nutrientes, a pressão parcial de oxigênio e dióxido de carbono, a pressão osmótica e a variação do pH.

No que se refere as condições químicas, estas incluem: a inibição da atividade biossintética devido a alta ou baixa concentração de substratos, excesso de subprodutos

formados e alta concentração celular (biomassa). Entretanto para as condições físicas devem ser considerados: o estresse sentido pelas células devido a agitação, turbulência, o atrito no reator, que contribuem para a colisão entre a células (BOUDRANT et al., 2005).

Em geral os meios utilizados para o crescimento de bactérias lácticas, não são economicamente atrativos; devido a grande quantidade de nutrientes onerosos requeridos, como o extrato de levedura e a peptona (BUSTOS et al., 2004).

Uma alternativa apontada por Bustos, et al. (2004) é a utilização do caldo de maceração de milho ou como é conhecido “Corn steep liquors” (CSL), que apresenta-se com baixo custo e pode ser utilizado para otimizar o processo. Os pesquisadores utilizam 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, o CSL. Mediante os dados experimentais obtidos e o desenvolvimento de um modelo matemático empírico, os autores definiram que para atingir a concentração máxima do produto final ($58,9 \text{ gL}^{-1}$), deve-se usar 5 gL^{-1} de CSL, $3,6 \text{ gL}^{-1}$ de extrato de levedura e 10 gL^{-1} de peptona, 100 gL^{-1} de glicose em 96h de fermentação. Entretanto, para alcançar a produção máxima e econômica deve ser usado 5 gL^{-1} de CSL como único nutriente, em um tempo de fermentação de 96h; para resultar em uma produtividade máxima a diminuição do tempo de fermentação para 44h seria o ideal.

Em seu estudo, Naveena et al. (2005), investigaram parâmetros nutricionais e físicos usando um modelo estatístico “Plackett Burman” para a produção de L(+)ácido láctico, utilizando a fermentação em estado sólido por *Lactobacillus amylophilus* GV6. Mediante esse modelo, um levantamento inicial dos ingredientes tem que ser providenciado para entender o significado do seu efeito na formação do produto, e a partir destes, seleciona-se os ingredientes mais adequados para otimizar o processo.

Naveena et al. (2005) relatam o efeito da peptona, extrato de levedura, tri-amônio citrato, extrato de carne, CSL, hidrolisado de caseína, pH, tamanho do inóculo, 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.

De acordo com Naveena et al. (2005) 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 os seus níveis forem aumentados. Nos casos de: sulfato de magnésio, acetato de sódio, CSL, extrato de carne, hidrolisado de caseína, pH, carbonato de cálcio e o período de incubação são considerados parâmetros insignificantes. O sulfato de manganês deve ser evitado pois não favorece a produção de ácido láctico.

Liew et al. (2005) utilizam 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% (L.L⁻¹), glicose = 5,01% (g.L⁻¹) e extrato de levedura = 6% (g.L⁻¹).

3.4 Ácido Láctico

3.4.1 Propriedades

Trata-se de um ácido orgânico com um β -carbono assimétrico (centro quiral) que possui dois enantiômeros: L(+), D(-) e um DL racêmico que pode ser obtido através de síntese química (ZHOU et al., 2003), (**FIG. 2**).

O L(+)-ácido láctico (ácido láctico dextrorrotatório) ocorre em pequenas quantidades no sangue, nos músculos de homens e animais, tendo sua concentração aumentada após a prática de atividades físicas intensas. Está presente ainda no fígado, rins, timo, líquido amniótico entre outros órgãos. No metabolismo humano é utilizado mediante a ação da L-lactato desidrogenase (WINDHOLZ, et al., 1976).

Pode ser obtido em metabolismo fermentativo por muitas espécies de microrganismos entre eles: *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus amylophilus* e pelo fungo *Rhizopus oryzae*. Este composto pode ser utilizado na fabricação de polímeros (WINDHOLZ, et al., 1976; OHARA e YAHATA, 1996).

Quimicamente é conhecido por ácido-2-hidroxiopropiônico, sua fórmula molecular é: $C_3H_6O_3$, massa molar = 90,08, ponto de fusão = $53^\circ C$, pK a $25^\circ C$ = 3,79, podendo formar sais com vários metais, com o zinco, originando o L(-)lactato diidrato, sendo os seus sais mais solúveis em água do que os sais formados pelo (DL) ácido láctico em mistura racêmica (WINDHOLZ, et al., 1976).

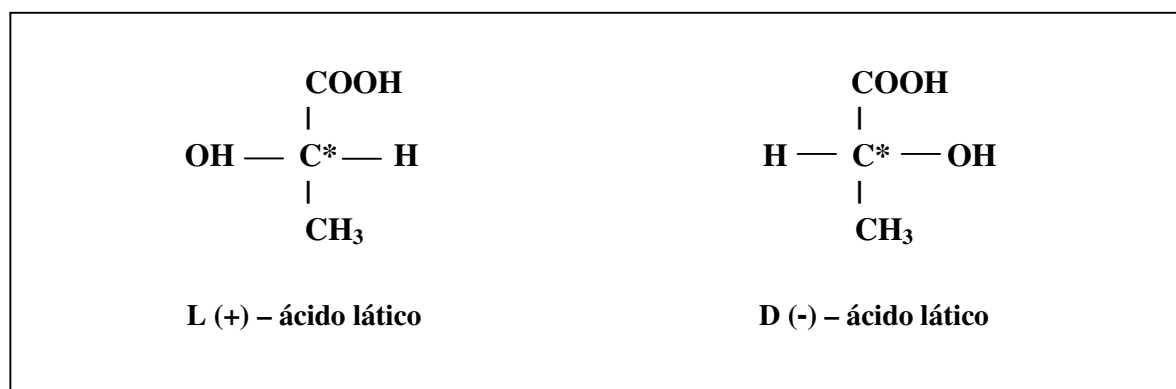


Figura 2: Molécula de ácido láctico (WINDHOLZ, et al., 1976).

O D (-) ácido láctico conhecido quimicamente por ácido(R)-2-hidroxiopropiônico, de massa molar = 90,08, fórmula molecular: $C_3H_6O_3$, ponto de fusão = $53^\circ C$, pK = 3,83, é obtido pela conversão de DL ácido láctico durante o processo de fermentação da glicose usando *Lactobacillus leichmannii*. Dentre as suas propriedades destaca-se a solubilidade em água, álcool, acetona, éter e glicerol; praticamente insolúvel em clorofórmio; podendo formar sais com muitos metais sendo a maioria destes dextrorotatórios. Com o zinco forma o sal D(+)-zinco lactato (cristais). O DL ácido láctico 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).

O DL ácido láctico é obtido tecnicamente em tempo relativamente curto por fermentação, a partir de diferentes carboidratos tais como: glicose, sacarose, frutose,

lactose, mediante o metabolismo de bactérias do gênero *Bacillus* e por outros microrganismos como: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*.

Dentre algumas das possibilidades de utilização destaca-se a fabricação de queijos, funciona como acidulante em bebidas, balas, anti-séptico intestinal, anti-fermentativo, serve ainda como solvente de tintas insolúveis em água, solvente na produção de celulose, manufatura de lactatos, presente nos alimentos, materiais plastificantes, entre outros (WINDHOLZ, et al.,1976).

3.4.1.1 Configuração do ácido láctico

Durante a fermentação de carboidratos, diferentes espécies de bactérias lácticas também produzem exclusivamente L(+)ácido láctico ou D(-)ácido láctico, quantidades aproximadamente iguais de ambos, ou predominantemente uma única forma. Isto vai depender da presença de uma enzima NAD^+ dependente específica conhecida como lactato desidrogenase (nLDH) e sua respectiva atividade (AXELSSON, 1998).

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 D e L ácido láctico. Geralmente a concentração do L ácido láctico é maior na fase inicial de crescimento dos microrganismos, enquanto que o isômero D é formado na fase estacionária (GARVIE, 1980 apud AXELSSON, 1998).

Manome et al (1998), relatam que é possível identificar, 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.

3.4.2 Obtenção

O ácido láctico pode ser obtido por três caminhos diferentes:

- Metabolismo animal,
- Síntese química,
- Fermentação microbiana.

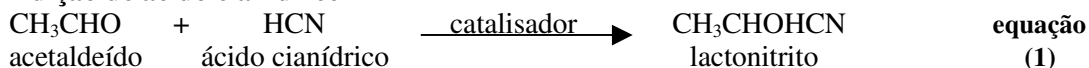
Em condições de anaerobiose o glicogênio armazenado nos músculos dos animais pode ser decomposto em glicose. Este processo é denominado glicólise, no qual cada molécula de glicose é convertida em duas moléculas de ácido pirúvico. Normalmente o ácido pirúvico passa às mitocôndrias das células musculares, reage com o oxigênio para formar muitas moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Quando o oxigênio é insuficiente para que ocorra a etapa oxidativa do metabolismo da glicose, a maior parte do ácido pirúvico é convertido em ácido láctico (GUYTON e HALL, 1998).

Durante um exercício intenso ocorre aumento do lactato no músculo e no sangue, decorrente da diminuição do pH nesses tecidos, deste modo, há a produção do ácido láctico (ROBERGS et al., 2004).

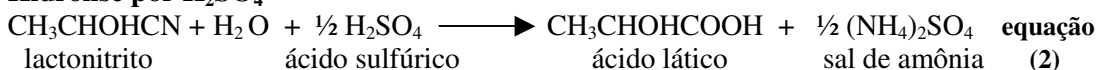
O processo de obtenção do ácido láctico por síntese química tem como base o lactonitrilo. O ácido cianídrico é adicionado ao acetaldeído na presença de uma base para produzir o lactonitrilo, sendo que esta reação ocorre na fase líquida sob alta pressão atmosférica. O lactonitrilo é recuperado e purificado por destilação sendo hidrolisado a ácido láctico mediante adição de ácido clorídrico ou ácido sulfúrico; com isso, ocorre a produção de sais de amônio e ácido láctico. A produção ocorre após a reação de esterificação o ácido láctico que une-se ao metanol e é possível a formação de um novo composto, o metil lactato. Por sua vez, o metil lactato pode sofrer hidrólise e os compostos iniciais podem ser recuperados (reação inversa) (NARAYANAN et al., 2004).

Este processo é representado pelas reações abaixo:

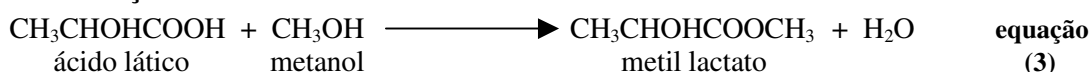
Adição de ácido cianídrico



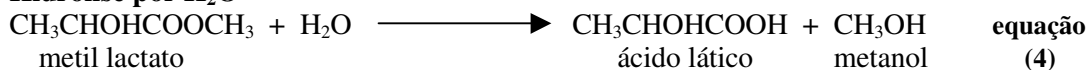
Hidrólise por H₂SO₄



Esterificação



Hidrólise por H₂O



Fonte: NARAYANAN et al., 2004.

O método por síntese química resulta unicamente numa mistura racêmica de ácido láctico, o DL ácido láctico (NARAYANAN et al., 2004).

O ácido láctico pode ser obtido pela fermentação de uma grande variedade de matérias-primas, subprodutos ou resíduos industriais, tais como: soro de leite, resíduo da fabricação do queijo, melaço (derivado da cana-de-açúcar), glicose, lactose, sacarose, milho, amido de milho, CSL, mandioca, batata, cevada, farelo de trigo e de arroz, resíduos de elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) das indústrias de papel, como a celulose e a hemicelulose, que são utilizados como fonte (s) de substrato(s).

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 láctico 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 e HÄGERDAI, 2000 ; NARAYANAN et al., 2004).

A produção de ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-445 tem sido estudada por Parajó et al. (1997), no qual utiliza pedaços de madeira de *Eucalyptus globulus* como substrato. O material lignocelulósico é hidrolizado por celulases e submetido a uma sacarificação simultânea e fermentação. De acordo com Parajó et al. (1997), a produtividade máxima alcançada é de 0,89-1,48 gL.h⁻¹ de ácido lático.

Soccol et al. (1994), descrevem 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 c. A concentração ideal da glicose é de 180gL⁻¹, resultando em uma produção de 137 gL⁻¹ de L(+) ácido lático e a produtividade 1,43 gL.h⁻¹.

Tanaka et al. (2005), têm estudado a produção de D(-) ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, usando 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 demonstram produção de 28 kg.m⁻³ de ácido lático a partir de 100 kg.m⁻³ farelo de arroz depois de 36h de fermentação a 37°C.

A produção biotecnológica de ácido lático por *Enterococcus faecalis*, a partir do melaço sem um pré-tratamento tem sido relatada por Wee et al. (2004). O método de fermentação em batelada é afetado pela variação da concentração de extrato de levedura, quando o meio contém 15 gL⁻¹ de extrato de levedura, a concentração máxima de ácido lático é de 134,9 gL⁻¹, sendo a produtividade máxima de 4,3 gL.h⁻¹.

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 produzindo 104 gL⁻¹ de ácido lático, em 120h de fermentação, com 90% de rendimento e 0,9 gL⁻¹ de produtividade. Para substituir o extrato de levedura outras fontes residuais de nitrogênio foram adicionadas ao meio de cultivo: larvas do bicho da seda, lêvedo de cerveja e restos de camarão podendo elevar a produção de ácido lático.

Em sua pesquisa, Kourkotas et al. (2005), trabalharam com células imobilizadas de *Lactobacillus casei* em frutas (maçã e marmelo), utilizando soro de leite como substrato, aplicando 15 fermentações sucessivas em batelada a 30, 37 e 45°C durante 50 dias. Após a formação da biomassa esta é misturada com os pedaços de frutas por imobilização e depois são lavadas no suporte para testar sua estabilidade e sobrevivência. Os resultados demonstraram que ocorre alta conversão do substrato a ácido láctico; o tempo gasto de fermentação para as células livres de *Lactobacillus casei* é maior, enquanto que para as células imobilizadas há uma diminuição ou estabilização do tempo de fermentação.

Parâmetros cinéticos têm sido estudados por Ghaly et al. (2004), para a produção do ácido láctico, mediante a fermentação contínua e em batelada a partir de soro de queijo (fonte de lactose) usando *Lactobacillus helveticus*. Nestes estudos os efeitos da concentração de lactose, microaeração do processo fermentativo e a utilização de extrato de levedura têm sido investigados.

Os resultados obtidos por Ghaly et al. (2004), indicam efeito inibitório utilizando altas concentrações de lactose, isto acarreta aumento da fase lag e o tempo de fermentação; ocorrendo a 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%) é de 75 gL⁻¹. Em contrapartida, usando extrato de levedura e/ou microaeração aumenta o número de células (320 x 10⁶ células.mL⁻¹), atingindo crescimento específico de $\mu = 0,22 \text{ h}^{-1}$, na produção celular, consumo de lactose e produção de 52,5 gL⁻¹ na concentração do ácido láctico, com constante diminuição da fase lag, no tempo de fermentação e da lactose residual.

Os meios fermentados podem ter ácido láctico puro, sais de ácido láctico, ou uma mistura dos dois (NARAYANAN et al., 2004). Vários estudos têm sido realizados para aprimorar ou desenvolver novas técnicas de separação, concentração e purificação do ácido láctico do caldo de fermentação, LI et al. (2004).

Segundo Narayanan (2004 apud Eyal, 2001) vários caminhos podem ser usados na separação dos sais de lactato do meio fermentado, tais como: extração por solventes, separação por troca iônica, adsorção, membrana ou por destilação a vácuo. Outros métodos podem ser utilizados para a obtenção do ácido láctico puro: eletrodialise, esterificação,

cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), destilação direta e separação por membrana (HÁBOVÁ et al., 2004; HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000).

Em seu estudo, Hábová et al. (2004), recuperam o ácido láctico do caldo de fermentação aplicando um modelo de eletrodialise composto por duas fases. Na primeira etapa o lactato de sódio é concentrado através da dessalinização usando membranas de troca iônica Ralex®. Em um segundo momento, há a eletroconversão do lactato de sódio a ácido láctico por eletrodialise através de membranas bipolares (EDBM) Neosepta®. O caldo de fermentação é submetido a um pré - tratamento (ultrafiltração, descoloração e remoção de íons metálicos) antes da eletrodialise. Os resultados indicam uma concentração final de lactato na primeira fase de 175 gL^{-1} e na segunda de 151 gL^{-1} .

Os métodos convencionais de eletrodialise (membranas de troca iônica sob a influência direta de corrente elétrica) e de membrana bipolar têm sido usados conjuntamente no estudo de Li et al. (2004). Estes processos eletrocinéticos permitem a remoção do ácido láctico diretamente do biorreator “in situ”, na forma concentrada, com um controle ideal do pH, sem a produção de sais indesejáveis durante o processo fermentativo. A proporção média de ácido láctico produzido é de $0,61 \text{ mmol.h.g}^{-1}$ de massa seca em 135,5h de fermentação.

Min-Tian et al. (2003), comparam o método de fermentação por eletrodialise com o método convencional de fermentação para a obtenção de L(+) ácido láctico. Os resultados demonstram eficiência duas vezes maior na produção de ácido láctico pela eletrodialise.

3.4.3 Aplicações

Nos últimos anos, o interesse pelo ácido láctico e seus polímeros tem aumentado. Estes podem ser aplicados em vários tipos de indústrias, tais como: química, farmacêutica, alimentícia e mais recentemente na medicina (BOUDRANT et al., 2005; BUSTOS et al., 2004).

Na indústria química pode ser empregado na produção de solventes orgânicos, como os ésteres de ácido láctico (etil/butil-lactato) e na produção de bases químicas (HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000; LI et al., 2004; NARAYANAN et al., 2004).

O uso do ácido láctico na indústria farmacêutica está relacionado à produção de cosméticos, formulação de pomadas, loções, preparação de soluções anti-acne, humectantes, o lactato de cálcio pode ser usado como terapia na deficiência de cálcio e funcionando como agente na eliminação da carie dental, no transporte de drogas anti-inflamatórias (NARAYANAN et al., 2004).

Uma das maiores aplicações do ácido láctico na indústria alimentícia é de funcionar como: aditivo, preservante, agente tamponante, acidulante, flavorizante, aromatizante e emulsificador na fabricação de pães e derivados, doces, balas, além de inibir a esporulação de bactérias em alimentos processados (HOFVENDAHL e HÄGERDAL, 2000; LI et al., 2004; NARAYANAN et al., 2004; NAVEENA et al., 2005).

Estudos recentes têm demonstrado o grande potencial dos polímeros do ácido láctico 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).

Segundo Sakata et al. (2004), o poli L-ácido láctico (PLLA), o poli ácido glicólico (PGA), o poli ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) e o poli p – dioxanona (PDS), têm sido aplicados em suturas cirúrgicas e aprovados para uso em humanos, pela Food and Drug Administration (FDA).

Em sua pesquisa, Sakata et al. (2004), estudaram a interação polímero/tecido utilizando pinos de PLGA e PDS após implante em coelhos. Os animais são separados em grupos de 3, 6 e 12 semanas de implantação, sacrificados e posteriormente submetidos à análise histológica. Nos implantes de pinos com PLGA, após 3 semanas, há a formação de um tecido com características mesenquimatosas e com 12 semanas a formação de uma estrutura óssea madura. Nos implantes de pinos de PDS, de três semanas observou-se maior invasão de tecido mesenquimal se comparado ao PLGA, e após 12 semanas há a degradação avançada do tecido mesenquimal e ósseo. As análises demonstram efeito positivo na interação tecido/implante tanto para os implantes com PLGA como nos PDS, mas o

copolímero de PLGA apresenta propriedades osteoindutivas mais adequadas que o PDS, apresentando biocompatibilidade aceitável para aplicação ortopédica (SAKATA et al., 2004).

Em seu estudo, Gollwitzer et al. (2005), analisaram as características imunológicas e mecânicas na interação do poli DL ácido láctico (PDLLA) com o tecido, para avaliar as limitações do polímero em aplicações clínicas futuras. Os resultados provam que o PDLLA não exerce efeitos imunossupressivos ou indução de proliferação das células-T, fornecendo boa estabilidade mecânica e adesão em implantes ortopédicos, demonstrando excelente elasticidade, com uma elongação de 8%.

Em sua pesquisa, Uematsu et al. (2005), estudaram a regeneração da cartilagem hialina em coelhos, transplantando o tri-dimensional poli ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) cultivado em linhagens de células mesenquimais. Inicialmente os animais são submetidos a cirurgias que provocam defeitos na articulação femoropatelar, logo, recebem o PLGA, sendo sacrificados 4 a 12 semanas após o transplante para que os tecidos sejam analisados histologicamente. As análises finais provam que o PLGA fornece um suporte estrutural na diferenciação das células progenitoras, demonstrando ser eficiente na indução da condrogênese.

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

O polímero derivado do ácido láctico (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 em condições de aerobiose ou anaerobiose. Tais polímeros também quando expostos à altas temperaturas (termoplástico natural) e alta umidade, pode ter a biodegradação melhorada (AURAS et al., 2003; TUOMINEN, 2003).

De acordo com TUOMINEN (2003), os polímeros biodegradáveis são decompostos em ambientes onde estão presentes microrganismos, tais como: solo, húmus, mares, rios, lagos, corpos de animais e em humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamento portátil Accutrend Lactate®

Utilizou-se este equipamento para quantificar o ácido láctico produzido pelos microrganismos no processo de fermentação láctica.

4.1.2 Espectrofotômetro

O espectrofotômetro modelo SP 1105 de marca BEL PHOTONICS ® foi utilizado na dosagem da glicose, o qual foi ajustado para o comprimento de onda de 540nm, para a leitura das amostras.

4.1.3 Agitador tipo mesa rotatória

As fermentações com agitação foram realizadas em shaker modelo MA-410 da marca Marconi ®.

4.1.4 Refratômetro de brix de campo

O refratômetro marca TOKO ® n. 43292 (0-32%) foi utilizado para determinar a porcentagem de sólidos totais.

4.1.5 Culturas de bactérias lácticas utilizadas

- *Lactobacillus delbrueckii* 103-10-1 e *Lactobacillus delbrueckii* 103-10-2, linhagens que foram cedidas pelo “Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar - Depto. de Bioengenharia”, pela profa. Dra. Georgina Michelena,
- *Lactobacillus fermentum* 292B, culturas liofilizadas proveniente da “Fundação André Tosello”,
- *Lactobacillus fermentum*,
- Bactérias do “Cambuchá”,
- Linhagem selvagem não identificada de usina sucroalcooleira do norte do Estado de São Paulo.

4.1.6 Meios de cultivo

Tabela 4. Composição dos meios de cultivo.

MRS modificado	(L ⁻¹)	CSN	(L ⁻¹)	Meio Padrão**	(L ⁻¹)	MRS ***	(L ⁻¹)
Glicose	20g	–		Sacarose	40g	Dextrose	20g
Peptona	10g	Peptona	5g	–		Peptona	10g
Extrato de levedura	4g	Extrato de levedura	3g	Extrato de levedura	20g	Extrato de levedura	5g
Extrato de carne	8g	Extrato de carne	3g	Solução A	*	Extrato de carne	10g
Citrato de amônio	2g	Citrato de amônio	2g	Fosfato de potássio dibásico (Sol. B)	20g	Citrato de amônio	2g
Acetato de sódio	5g	–	–	Cloreto de cálcio (Sol. C)	0,02g	Acetato de sódio	5g
–	–	–	–	–	–	Complexo sorbitan	1g
–	–	–	–	–	–	Sulfato de Magnésio	0,1g
–	–	–	–	–	–	Sulfato de manganês	0,05g
–	–	–	–	–	–	Fosfato di-sódico	2g
Água	1	Caldo de cana clarificado	1	Água	1	Água	1
pH = 6	–	pH = 6,2	–	pH = 6,2	–	pH = 6,5	–

* Solução A: Sulfato de magnésio 0,2 gL⁻¹, sulfato de manganês 0,01 gL⁻¹, cloreto de sódio 0,01 gL⁻¹, sulfato ferroso 0,01 gL⁻¹.

** LOPES, 1979.

*** Meio Accumedial®.

4.1.6.1 Tomate (*Solanum lycopersicum*)

4.1.7 Reagentes

4.1.7.1 Ácido 3,5-dinitro acetil salicílico (ADNS)

4.1.7.2 Kit enzimático Laborlab®

4.2 Método

4.2.1 Preparo dos meios de cultivo

4.2.1.1 MRS modificado

Todos os ingredientes foram unidos e dissolvidos em água destilada completando-se o volume para 400 mL, sendo o pH do meio ajustado para 6. Posteriormente o meio foi esterilizado a 1atm de pressão, 15 min. 121°C.

4.2.1.2 Meio CSN modificado

4.2.1.2.1 Clarificação do caldo de cana: FALCÃO DE MORAIS et al (1983)

A 1000mL de caldo de cana-de-açúcar acrescentou-se duas claras de ovos batidos em neve. A mistura foi agitada fortemente em temperatura ambiente e submetida a vapor fluente em autoclave durante 30 min. Após este procedimento, filtrou-se com o auxílio de algodão e gaze; o brix foi ajustado de acordo com a exigência do experimento. Após a adição dos componentes nutrientes de complementação ao caldo de cana clarificado, este foi esterilizado a 1atm. de pressão, 15 min. 121°C.

4.2.1.3 Meio CSN líquido

Após o preparo do meio CSN, com o brix conveniente e acrescido os componentes de suplementação, este foi esterilizado a 1atm de pressão, 15 min. 121°C. Sua função foi reativar e manter as linhagens de bactérias.

4.2.1.4 MRS Líquido (DIFCO, 1984)

Este meio adquirido no comércio (Acumedia®) foi utilizado para reativar e manter as linhagens de lactobacilos. O meio após a dissolução em Banho Maria foi esterilizado a 1atm de pressão, 15 min. 121°C.

4.2.1.5 Meio Padrão (LOPES, 1979)

As soluções A, B e C foram esterilizadas em autoclave individualmente a 1atm de pressão, 15 min. 121°C e reunidas após autoclavagem. Este meio foi utilizado nos experimentos de fermentação láctica.

4.3 Preparo do extrato de tomate

Os tomates maduros 4Kg em pedaços, foram fervidos por 3h sem adição de água e logo em seguida triturados em liquidificador, peneirados, de onde obteve-se uma pasta homogênea.

Para determinar a matéria seca do extrato, foi utilizada uma cápsula de porcelana vazia que permaneceu em estufa de 105°C durante 24h. Passado este período, pesou-se a mesma em balança analítica três vezes e os valores anotados. Após este procedimento 100 mL do extrato de tomate foram transferidos para a cápsula, que permaneceu na estufa por 24h, à temperatura de 105°C. A cápsula foi retirada da estufa sendo pesada igual ao procedimento anterior, após o resfriamento.

Dos valores obtidos fez-se a diferença da cápsula com o extrato de tomate (g) menos a cápsula vazia (g). A matéria seca obtida do extrato de tomate foi de $5,5\text{g} \times 100\text{mL}^{-1}$, o qual foi empregado nos experimentos com enriquecimento.

4.4 Reagentes

4.4.1 Reagente ácido 3,5 - dinitro acetil salicílico (ADNS)

O reagente a base de ácido 3,5–dinitro acetil salicílico foi empregado na dosagem de açúcares redutores totais segundo Miller (1959). No preparo do reagente 1g de ADNS foi dissolvido em 30mL de água destilada a 40°C (Solução A); em um outro recipiente foram reservados 30g de Tartarato de Na e K os quais foram dissolvidos em 20mL de uma solução de NaOH 2N a 40°C (Solução B). As duas soluções permaneceram em Banho Maria por $\pm 3h$, até que se dissolvessem completamente. Logo juntou-se a solução A e B, completando o volume para 100 mL. O ADNS foi mantido em frasco âmbar para sua utilização nos experimentos.

4.5 Manutenção e ativação das culturas

Todas as linhagens foram repicadas e mantidas nos meios CSN e MRS líquido; incubadas à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. A seguir foram mantidas refrigeradas a $\pm 5^\circ\text{C}$ e quando necessárias utilizadas nos experimentos.

4.6 Parâmetros analisados

4.6.1 Determinação da acidez por titulometria

A acidez foi determinada acrescentando-se 2 mL da amostra à 100 mL de água destilada contida em frasco de Erlenmeyer de 250 mL. A seguir o frasco foi aquecido à ebulição durante 5 min. quando acrescentou-se 2 gotas de fenolftaleína. Procedeu-se a titulação com NaOH 0,05N até o ponto de viragem. O volume de hidróxido de sódio gasto para neutralizar o ácido foi anotado para calcular a quantidade de ácido láctico produzido.

$$[\text{g de ácido láctico}] = \frac{\text{mL de NaOH (0,05N)} \times 4,5 \times 10^{-3} \text{g} \times 1000}{2 \text{ mL (volume da amostra)}}$$

4.6.2 Dosagem da glicose

A concentração da glicose foi determinada em diferentes tempos de fermentação. Partiu-se de uma solução padrão de glicose para a construção de uma reta associada com a densidade óptica (espectrofotômetro).

Essa solução padrão foi obtida pesando-se 0,05 g de glicose pura, que foi dissolvida em água destilada completando-se o volume para 50mL (Concentração da solução padrão:mg.mL⁻¹). A reta padrão foi construída de acordo com o protocolo:

Protocolo experimental para análise de glicose pelo método ADNS

Tubos	V solução glicose (μL)	V H ₂ O (μL)	ADNS (μL)	Concentração (mg.mL ⁻¹)	A ₅₄₀ (nm)
Branco	0	500	500	0	
1	50	450	500	0,1	
2	100	400	500	0,2	
3	150	350	500	0,3	
4	200	300	500	0,4	
5	250	250	500	0,5	
6	300	200	500	0,6	
7	350	150	500	0,7	
8	400	100	500	0,8	
9	450	50	500	0,9	
10	500	0	500	1	

Após todas as alíquotas serem pipetadas nos tubos (protocolo), estes foram fervidos por 5 min. e resfriados em água corrente. Adicionou-se 5mL de água destilada em cada tubo após o resfriamento e as amostras lidas a 540nm.

As amostras dos meios de cultivo a base de caldo de cana clarificado foram invertidas para obtenção dos açúcares redutores. No preparo da inversão, 1mL da amostra foi pipetada em um tubo de ensaio, no qual adicionou-se 1mL de HCl 2N. Posteriormente a amostra foi aquecida em Banho Maria 80°C durante 30 min. e a seguir neutralizada com 1mL de NaOH 2N. O conteúdo do tubo foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume.

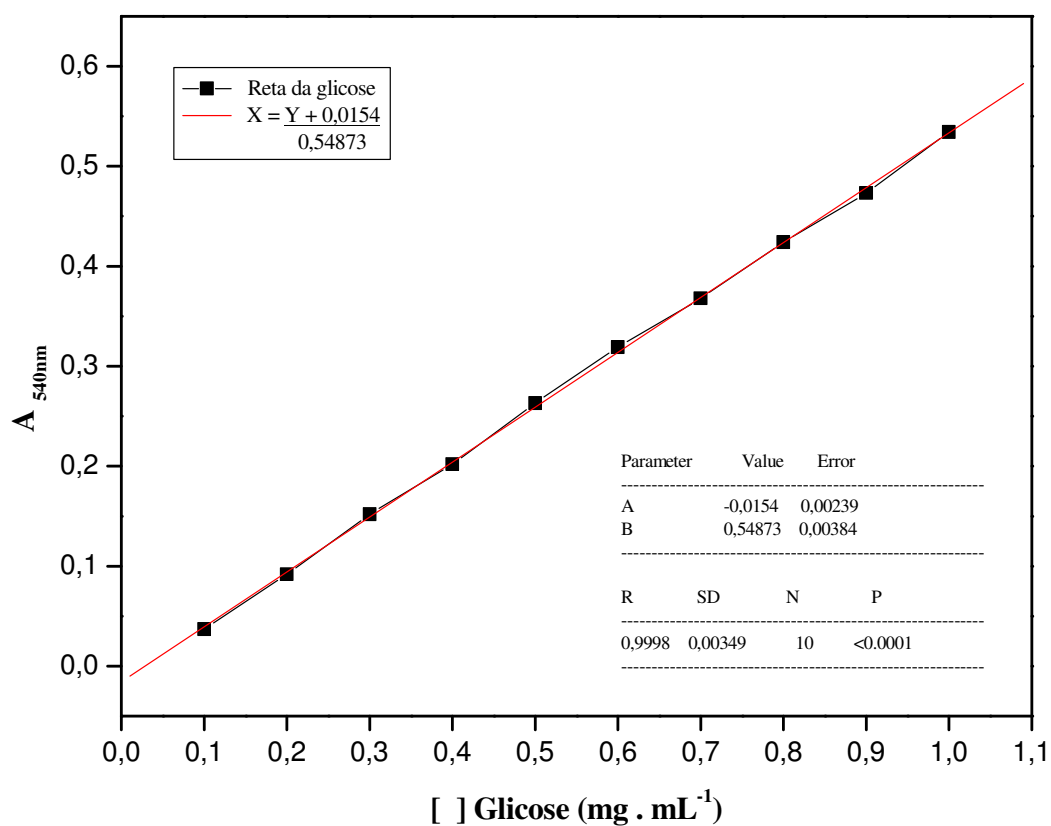


Figura 3. Reta padrão da glicose.

Os mesmos procedimentos adotados para a reta padrão (ADNS) foram utilizados na leitura das amostras invertidas ou não.

Para calcular a concentração de glicose utilizou-se a equação da reta:

$$Y = -0,0154 + 0,54873 \cdot X$$

Y= valor da absorbância X= concentração de glicose (mg.mL⁻¹)

4.6.2.1 Dosagem da glicose por método enzimático

O kit enzimático Laborlab® composto pelo reativo padrão (solução de glicose na concentração de 100 mg.dL^{-1}), reativo enzimático (glicose oxidase + enzima peroxidase), reativo de cor (1): 4-aminofenazona $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$ + Tampão TRIS $0,92 \text{ mol.L}^{-1}$ e o reativo de cor (2): fenol $0,055 \text{ mol.L}^{-1}$ foi utilizado nas análises do consumo de glicose pelos microrganismos.

Este método enzimático colorimétrico, no qual os tubos com as amostras em triplicatas: B (Branco), P (Padrão) e D (Desconhecido) são mantidos em Banho Maria por 10 min. 37°C , lidos em espectrofotômetro a 505nm . Segue-se abaixo o protocolo:

B	P	D	
–	20 μL	–	Padrão
–	–	20 μL	Desconhecido
2mL	2mL	2mL	Reativo de trabalho

Cálculos:

$$F = \frac{100\text{mg} \times \text{dL}^{-1}}{P} \quad \text{Glicose (mg} \times \text{dL}^{-1}) = D \times F$$

4.7 Quantificação enzimática do ácido láctico

A concentração de ácido láctico foi determinada enzimaticamente empregando-se o equipamento Accutrend Lactate®. No qual amostras foram analisadas diretamente sendo que amostras com maiores concentrações foram diluídas. Cerca de 25 µL foram suficientes para preencher todo o campo de leitura das fitas individuais acopladas ao aparelho. O ácido láctico foi então quantificado diretamente e os teores visualizados no aparelho em mmol.L⁻¹.

Para obter os teores de ácido láctico em gL⁻¹ foram realizados cálculos a partir da massa molar deste ácido.

Massa molar do ácido láctico = 90 gL⁻¹

1 mol do ácido láctico corresponde a 90 gL⁻¹

1 mmol. L⁻¹ do ácido = $90 \div 1000 = 0,09 \text{ gL}^{-1}$ ou 9 mg.L⁻¹ (ppm)

4.8 Cultivo das bactérias para produção do ácido lático

Erlenmeyer's de 250 mL previamente esterilizados contendo 100 mL de meio de cultivo, foram utilizados em todas as repetições. Para cada meio (CSN, MRS modificado e meio Padrão) empregou-se 4 Erlenmeyer's, sendo um deles o controle (sem inóculo). As bactérias foram inoculadas em frascos triplicatas.

Após a inoculação os frascos foram mantidos em estufa à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (fermentação estática). No caso da fermentação com agitação permaneceram em shaker à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm e as análises foram realizadas a cada 12h. Retirou-se 2 mL de amostra para a titulação (grau de acidez), 4 mL para análises de glicose (métodos enzimático da glicose oxidase e ADNS) e a quantificação do ácido lático mediante o uso do equipamento portátil Accutrend lactate®).

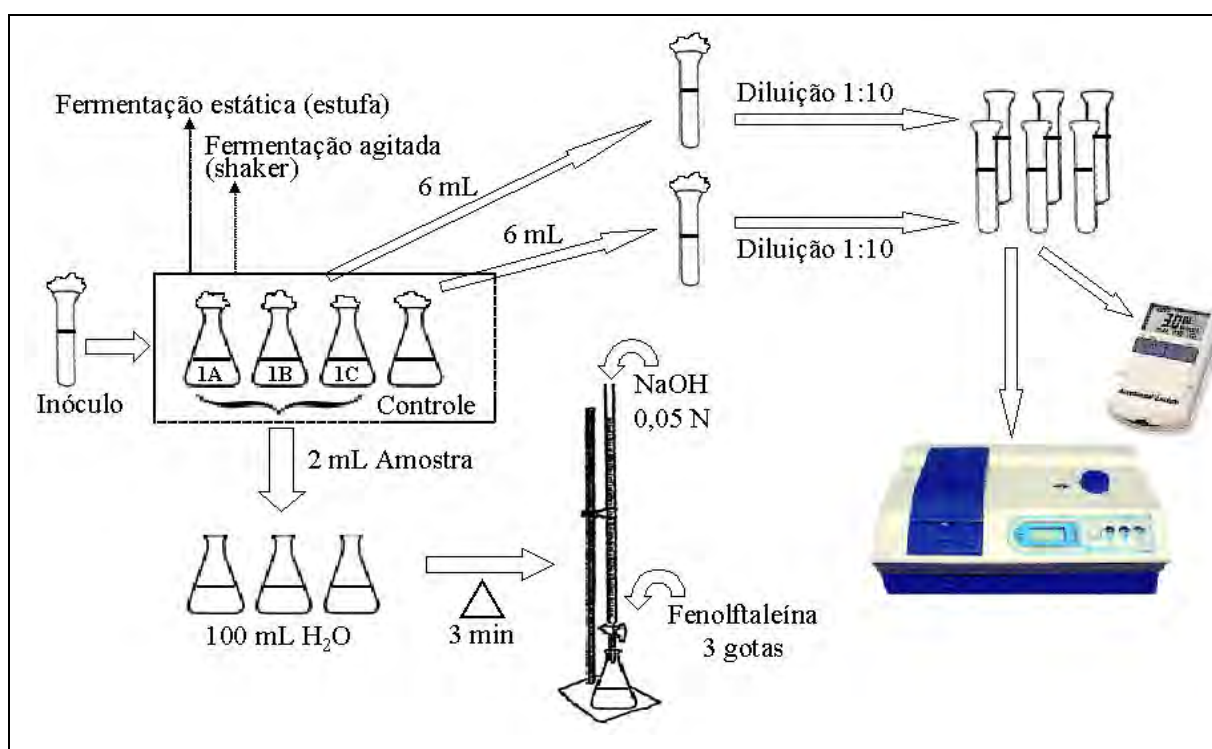


Figura 4. Esquema simplificado da técnica utilizada para as análises nos experimentos.

4.9 Procedimento para cálculo dos custos de produção do ácido láctico

Empresas fornecedoras de insumos para meios de cultivo foram contatadas via correio eletrônico, para efetuar os custos de produção do ácido láctico:

- Fornecedor 1: **Labcenter**, situado na rua Carolina Florence, n. 1838, Jardim Nossa senhora Auxiliadora, Campinas–S.P;
- Fornecedor 2: **Hexis**, situado na rua Maurício Galli, n. 987, Jardim Marivã, Araraquara–S.P;
- Fornecedor 3: **Merse**, situado na rua Dr. Quirino, n. 212, Centro, Campinas – S.P.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de ácido láctico pelas bactérias utilizadas

Na etapa inicial do trabalho avaliou-se a produção de ácido láctico pelas linhagens *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.1, *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fermentum* 292B, bactéria isolada do “Cambuchá” e linhagem selvagem não identificada, as quais foram cultivadas por 72h nos meios CSN 5brix, CSN 12 brix, MRS modificado e meio Padrão. A produção de ácido obtida por titulação e referenciada como ácido láctico pelas linhagens nos diferentes meios está apresentada na **Tabela 5**.

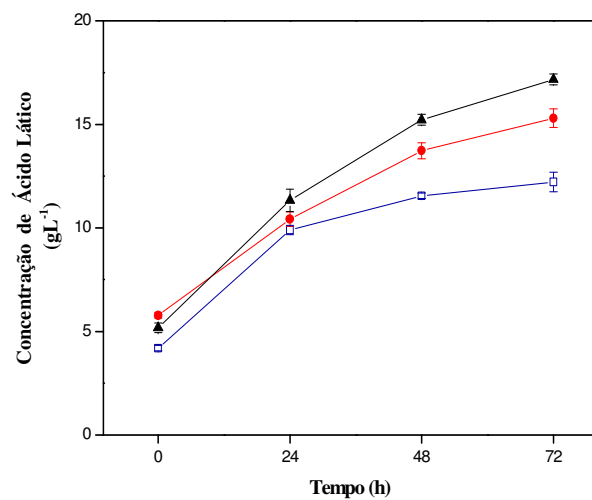
Tabela 5. Produção de ácido láctico pelas bactérias *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.1, *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2, *Lactobacillus fermentum* 292B, *Lactobacillus fermentum* e “Cambuchá” empregando os meios de cultivo: MRS modificado, CSN 5brix e CSN 12brix, em condição estática, sem enriquecimento, temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 72 h.

Bactérias	Meio de Cultivo	Ácido Láctico (gL^{-1})
		Titulação
<i>L. fermentum</i>	MRS modificado	$5,85 \pm 0,00$
	CSN 5	$2,70 \pm 0,00$
	CSN 12	$5,85 \pm 0,00$
<i>Cambuchá</i>	MRS modificado	$5,85 \pm 0,00$
	CSN 5	$3,30 \pm 0,00$
	CSN 12	$6,75 \pm 0,00$
<i>L. fermentum</i> 292B	MRS modificado	$12,75 \pm 1,37$
	CSN 5	$12,97 \pm 0,34$
	CSN 12	$15,30 \pm 0,72$
<i>L. delbrueckii</i> 103.10.1	MRS modificado	$7,35 \pm 1,06$
	CSN 5	$14,55 \pm 1,27$
	CSN 12	$16,50 \pm 1,24$
<i>L. delbrueckii</i> 103.10.2	MRS modificado	$15,30 \pm 0,45$
	CSN 5	$12,22 \pm 0,46$
	CSN 12	$17,17 \pm 0,26$

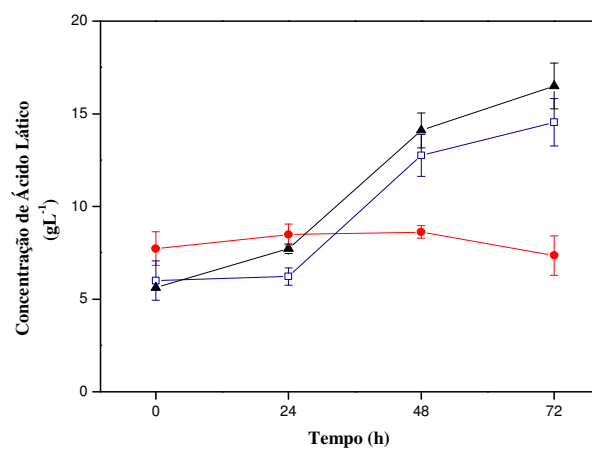
As maiores concentrações de ácido láctico foram obtidas por *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2, *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.1 e *Lactobacillus fermentum* 292B. Para *Lactobacillus fermentum* e Cambuchá, obteve-se concentrações menores que as quantidades alcançadas pelas demais linhagens.

Das produções obtidas por *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2, *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.1 e *Lactobacillus fermentum* 292B as maiores concentrações de ácido láctico ocorreram no meio CSN 12, como observado na **Figura 5**.

(A)



(B)



(C)

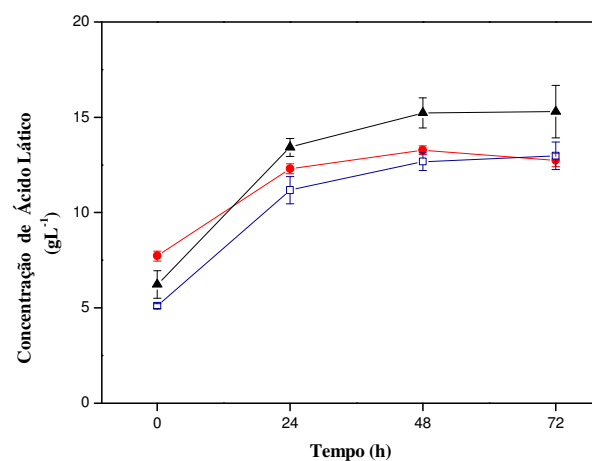


Figura 5. Quantificação de ácido láctico por titulação nos meios: MRS modificado (—●—), CSN 5 brix (—□—) e CSN 12 brix (—▲—). Fermentação estática, temp. de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. (A) *L. delbrueckii* 103.10.2, (B) *L. delbrueckii* 103.10.1 e (C) *L. fermentum* 292B.

Timbutam et al. (2006) estudaram o efeito de diferentes concentrações de caldo de cana (3 e 13%) utilizado como fonte de carbono. Os pesquisadores verificaram que quanto mais sacarose está presente no meio maior é a concentração de ácido lático final. A produção máxima de ácido lático alcançada por estes autores empregando *Lactobacillus sp.* linhagem FCP2, 150rpm, 40°C, foi de 104gL⁻¹ de ácido lático em caldo de cana a 13% (125gL⁻¹ de sacarose, 8gL⁻¹ de glicose e 6gL⁻¹ de frutose).

Nas fermentações realizadas por Cock et al. (2004), o caldo de cana foi suplementado em diferentes tratamentos, com 3 e 5% de extrato de levedura. O objetivo foi verificar o efeito da concentração de nitrogênio orgânico na produção de ácido lático. A linhagem *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* foi empregada nos testes de fermentação por 48h, 120rpm a 32°C. A concentração máxima de ácido lático obtido foi de 40,78gL⁻¹ em caldo de cana enriquecido com 5% de extrato de levedura.

Como maiores concentrações de ácido lático foram obtidas pela linhagem *L. delbrueckii* 103.10.2 optou-se pela sua utilização para a continuidade dos experimentos.

Na segunda etapa deste trabalho buscou-se verificar a influência da agitação na produção do ácido lático pela linhagem selecionada e por uma linhagem selvagem isolada do processo industrial de produção de etanol obtida posteriormente. Essas bactérias foram cultivadas nos meios: MRS modificado e CSN 12 brix selecionados anteriormente e no meio Padrão como descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6. Produção de ácido lático pelas bactérias *L. delbrueckii* 103.10.2 e bactéria selvagem empregando os meios de cultivo: Padrão, MRS modificado e CSN 12brix em condição agitada (150 rpm), sem enriquecimento, temperatura de 30 ± 2°C, por 72h.

Bactérias	Meio de Cultivo	Ácido Lático (gL ⁻¹) Titulação
<i>L. delbrueckii</i> 103.10.2	Meio Padrão	11,70 ± 0,45
	MRS modificado	8,47 ± 0,34
	CSN 12	8,85 ± 0,91
Bactéria selvagem	Meio Padrão	4,87 ± 2,22
	MRS modificado	4,87 ± 0,26
	CSN 12	17,92 ± 0,68

Durante a fermentação em condição estática, houve maior produção de ácido láctico por *L. delbrueckii* 103.10.2 no meio CSN 12brix como indicado na **Tabela 5**. Nos experimentos das fermentações aplicando-se agitação, para facilitar a transferência de massa e garantir a homogeneidade na concentração do substrato com as bactérias, como recomenda Cock et al.(2004), a produção de ácido láctico foi inferior.

5.2 Enriquecimento dos meios de cultivo

Em seu trabalho, Rosales (1989) utilizou o Ágar Multidiferencial de Lee (L.M.D.A) (CASEY e INGLEDEW, 1981) composto por várias fontes de nitrogênio, carbono, sais e sólidos de caldo de tomate. Nessa pesquisa optou-se pelos seguintes meios para fins comparativos: meio de caldo de cana clarificado suplementado com peptona e extrato de levedura (CSN); e posteriormente os meios MRS modificado e o meio Padrão.

Diante das baixas concentrações de ácido obtidos nos primeiros experimentos (**Tabelas 5 e 6**), optou-se por enriquecer os meios de cultivo adicionando-se extrato de tomate à sua composição original .

A **Tabela 7** fornece dados do ácido láctico obtidos por titulação, utilizando meios de cultivo enriquecido com extrato de tomate pela bactéria selvagem e *L. delbrueckii* 103.10.2 durante as fermentações.

Tabela 7. Produção de ácido láctico pelas bactérias *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2 e BB empregando os meios de cultivo: CSN 12brix, MRS modificado e Meio Padrão enriquecidos com extrato de tomate (ET) em diferentes concentrações. Temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72h, agitação de 150rpm.

Bactérias	Meio de Cultivo	Enriquecimento (%)		Ácido Láctico (gL^{-1}) Titulação
<i>L. delbrueckii</i> 103.10.2	Meio Padrão	0,5 ET	(sacarose 4,0)	$27,90 \pm 0,59$
	MRS modificado	0,5 ET	(glicose 2,0)	$15,67 \pm 0,13$
	CSN 12	0,5 ET	caldo cana 12 brix	$13,95 \pm 0,45$
Bactéria selvagem	Meio Padrão	0,5 ET	(sacarose 4,0)	$31,35 \pm 0,34$
	MRS modificado	0,5 ET	(glicose 2,0)	$19,12 \pm 0,38$
	CSN 12	0,5 ET	caldo cana 12 brix	$17,62 \pm 0,46$
Bactéria selvagem	Meio Padrão	2,0 ET	(sacarose 4,0)	$29,30 \pm 1,30$
	MRS modificado	2,0 ET	(glicose 2,0)	$22,66 \pm 0,89$
	CSN 12	2,0 ET	caldo cana 12 brix	$19,51 \pm 0,42$
Bactéria selvagem	Meio Padrão	4,0 ET	(sacarose 4,0)	$32,77 \pm 0,57$
	MRS modificado	4,0 ET	(glicose 2,0)	$27,00 \pm 0,13$
	CSN 12	4,0 ET	caldo cana 12 brix	$24,60 \pm 1,24$

Verificou-se que $32,77\text{gL}^{-1}$ de ácido láctico foram produzidos pela linhagem selvagem, no meio Padrão com 4% de extrato de tomate. No entanto *L. delbrueckii* 103.10.2 produziu $27,90\text{gL}^{-1}$ de ácido láctico no meio Padrão enriquecido com 0,5% de extrato de tomate. Observou-se ainda que mesmo com uma baixa concentração de extrato de tomate (0,5%) *L. delbrueckii* 103.10.2 conseguiu produzir quantidade significativa de ácido láctico quando comparada à outra linhagem (não foi possível realizar todos os ensaios para *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2 devido à perda da sua atividade celular de todas as culturas mantidas no laboratório).

Garvie e Mabbitt (1967) descreveram a importância do suco de tomate como fator de crescimento para *Leuconostoc oenos* NCD 1674. Os autores relatam que o suco de tomate contém um fator de crescimento ativo para algumas linhagens de *Leuconostoc oenos*, mas não necessariamente para outras bactérias lácticas. Outro fator descrito como importante para o crescimento das bactérias lácticas é o Tween 80 quando outros ácidos orgânicos não estão presentes.

Lopes et al. (2007), realizaram ensaios com os mesmos meios de cultivo empregados nesta pesquisa, enriquecidos com extrato de tomate. Altos teores de ácido láctico foram produzidos nos meios onde havia maiores concentrações do extrato (2 e 4%).

Haully et al. (2003), utilizaram melaço de cana-de-açúcar 10% (m.v⁻¹) enriquecido de extrato de levedura 2% (m.v⁻¹) e peptona 4% (m.v⁻¹) para a obtenção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em condições descontínuas. Os pesquisadores verificaram que o meio de cultivo utilizado produziu 30,5gL⁻¹ de ácido láctico e que o meio MRS considerado referência produziu 32gL⁻¹. Nesta pesquisa onde o caldo de cana foi enriquecido com extrato de tomate e extrato de levedura, obteve-se 27gL⁻¹ de ácido láctico, valores próximos ao dado do meio referência MRS.

Nos ensaios posteriores verificou-se o consumo da glicose pelo método do ADNS, a produção de ácido láctico por titulação e com o uso do lactímetro (Accutrend lactate®). O que pode ser observado na **tabela 8**.

Tabela 8. Produção de ácido láctico e consumo da glicose pela bactéria selvagem não identificada empregando os meios de cultivo: CSN 12brix, MRS modificado e Meio Padrão enriquecidos com extrato de tomate (ET) em diferentes concentrações. Temp. de 30 ± 2°C por 72h, agitação de 150rpm.

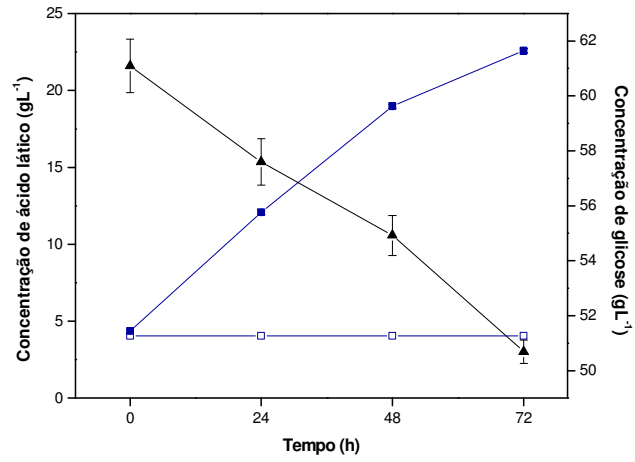
Meios de cultivo	Enriquecimento (%)	Ácido láctico (gL ⁻¹) 72 h		Glicose inicial (gL ⁻¹) t = 0 h	Glicose final (gL ⁻¹) t = 72 h
		Titulação	Ac. Lactate		
Meio Padrão	0 ET (Controle) (4 sacarose)	6,90 ± 0,26	1,10 ± 0,00	7,12 ± 0,14	3,02 ± 1,56
MRS modificado	0 ET "	11,81 ± 0,16	4,21 ± 0,00	20,02 ± 0,42	4,46 ± 0,06
	0 ET "	11,85 ± 0,13	4,23 ± 0,00	21,73 ± 0,35	18,66 ± 0,18
	0 ET "	22,57 ± 0,13	1,34 ± 0,00	61,09 ± 0,97	50,68 ± 0,42
Meio Padrão	0,5 ET -	19,87 ± 4,56	5,83 ± 0,00	10,60 ± 1,17	3,07 ± 1,53
MRS modificado	0,5 ET -	19,05 ± 0,34	1,95 ± 0,00	12,96 ± 0,09	5,78 ± 0,10
	0,5 ET -	16,95 ± 0,26	1,97 ± 0,00	29,19 ± 0,26	25,43 ± 0,35
	0,5 ET -	26,10 ± 1,19	0,89 ± 0,00	58,88 ± 0,42	43,97 ± 0,69
Meio Padrão	2,0 ET -	29,32 ± 2,02	13,12 ± 0,00	11,88 ± 0,17	3,59 ± 0,10
MRS modificado	2,0 ET -	18,67 ± 0,0	12,42 ± 0,00	27,67 ± 0,40	15,13 ± 0,21
	2,0 ET -	20,77 ± 1,11	5,76 ± 0,00	25,58 ± 0,57	17,31 ± 0,23
	2,0 ET -	29,77 ± 1,15	0,85 ± 0,00	43,69 ± 0,42	24,45 ± 0,32
Meio Padrão	4,0 ET -	30,67 ± 3,02	15,66 ± 0,00	12,00 ± 1,42	4,62 ± 1,13
MRS modificado	4,0 ET -	29,47 ± 0,59	0,94 ± 0,00	35,29 ± 0,11	18,92 ± 0,13
	4,0 ET -	26,10 ± 0,38	1,15 ± 0,00	52,80 ± 0,80	43,31 ± 0,26
	4,0 ET -	34,35 ± 0,57	0,47 ± 0,00	24,63 ± 0,16	8,53 ± 0,00

Para determinar o efeito da glicose na produção do ácido láctico, realizou-se ensaios com o meio MRS modificado variando a concentração de glicose 2 e 4% . Os resultados indicaram mediante avaliação estatística, que analisando-se o desvio padrão não houve diferença notável na quantidade de ácido produzido quando a glicose presente no meio foi maior ou igual a 2% (**Tabela 8**).

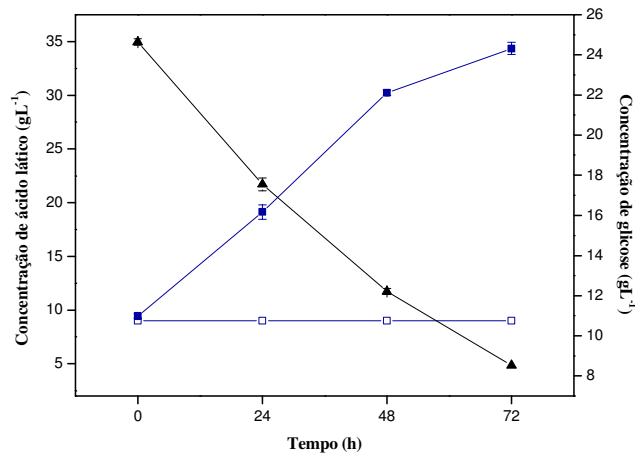
A **figura 6A** mostra as produções de ácido láctico e consumo da glicose pela bactéria selvagem no meio CSN 12 brix, sem a adição do extrato de tomate.

Nos ensaios onde os meios CSN 12 brix e Padrão foram enriquecidos com 4% de extrato de tomate maiores produções de ácido láctico ocorreram: 34,35 gL⁻¹ e 30,67 gL⁻¹ (**Figuras 6B e 6C**).

(A)



(B)



(C)

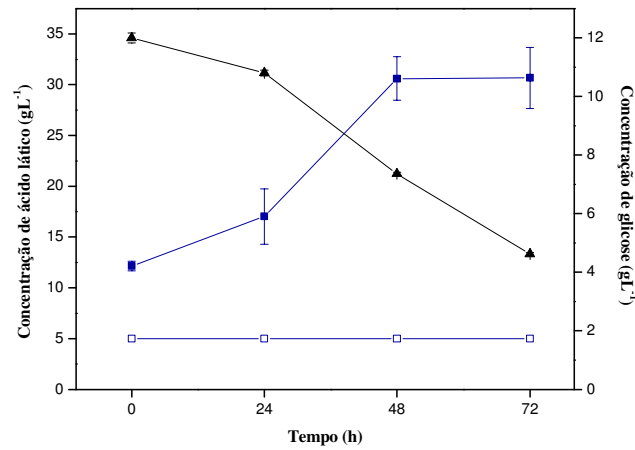
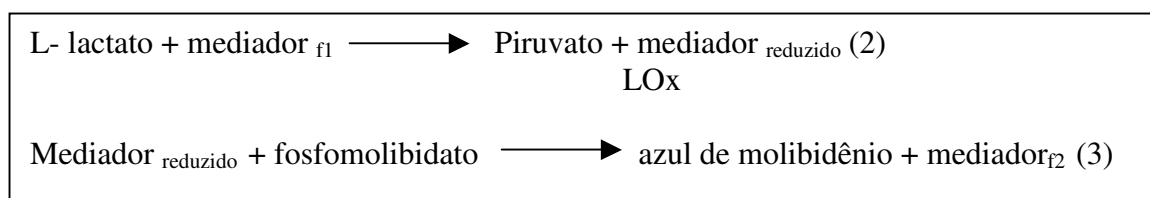


Figura 6. Quantificação de ácido láctico (—■—), controle (—□—), por titulação produzido por bactéria selvagem e consumo de glicose (—▲—) pelo método do ADNS; 150 rpm, temp. de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. (A) Meio CSN sem extrato de tomate, (B) Meio CSN 4% de extrato de tomate e (C) Meio Padrão 4% de tomate.

5.3 Análise das produções de ácido láctico pelo equipamento Accutrend Lactate®

O aparelho portátil da Roche® foi utilizado para avaliar a produção de ácido láctico nos ensaios estáticos e com enriquecimento. Segundo Ventura (2007), este aparelho é dotado de fotômetro de reflexão e fitas reagentes individuais e descartáveis impregnadas com enzima imobilizada lactato oxidase (LOx). O lactato em presença de um mediador é degradado a piruvato pela reação da enzima (reação 2), sendo o resultado dos produtos da reação avaliados por colorimetria em 657 nm (reação 3).



Este equipamento quantifica somente o isômero L-ácido láctico. A **figura 7** mostra que os maiores teores de ácido láctico foram obtidos para a linhagem *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2 nos meios MRS modificado, CSN 5 e 12 brix após 72 h de cultivo. Alguns autores citam que essa espécie de lactobacilo é produtora apenas do isômero D, mas mediante o experimento conduzido nas condições descritas, pode-se supor que a bactéria em questão foi capaz de produzir os isômeros L e o D, uma vez que o aparelho detectou a presença de lactato.

Os resultados da **figura 8** indicam que maiores produções de ácido láctico foram alcançadas nos meios enriquecidos com 2 e 4% de extrato de tomate para a bactéria BB, indicando a importância do estudo de aditivos na formulação de meios, quando o objetivo é produzir ácido láctico.

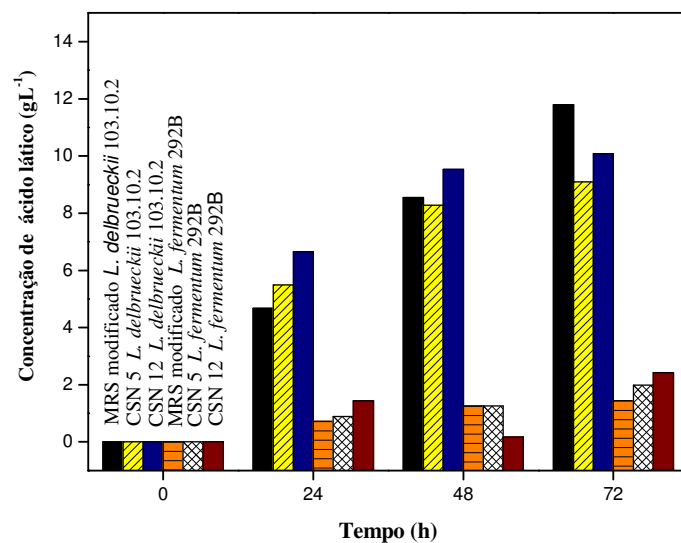


Figura 7. Quantificação enzimática da produção de ácido láctico gL^{-1} por *L. delbrueckii* 103.10.2 e *L. fermentum* 292B mediante o equipamento Accutrend Lactate®, durante 72 h de fermentação estática e temp. de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

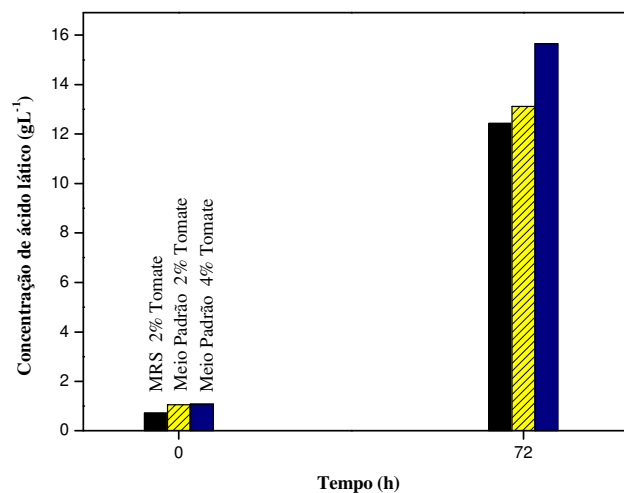


Figura 8. Quantificação enzimática da produção de ácido láctico gL^{-1} por bactéria selvagem mediante o equipamento Accutrend Lactate®, durante 72 h de fermentação com enriquecimento, 150 rpm, temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.4 Custo da produção de ácido láctico

A indústria de alimentos é um dos segmentos que apresenta maiores investimentos no mercado do ácido láctico. Mundialmente o consumo de ácido láctico é estimado entre 130.000 a 150.000 toneladas anuais e o seu preço comercial varia entre US\$ 1,38.Kg⁻¹ (lactatos com 50% de pureza) e US\$ 1,54.Kg⁻¹ a US\$ 1,59.Kg⁻¹ (lactatos com 88% de pureza). Entretanto, o custo da manufatura de ácido láctico foi estimado em US\$ 0,55. Kg⁻¹ e os monômeros deste ácido em US\$ 0,8.Kg⁻¹ (WEE, et al., 2006).

Neste estudo, foram avaliados os custos de três meios de cultivo utilizados nos experimentos (Meio Padrão, MRS modificado e CSN 12 brix a base de caldo de cana-de-açúcar) tomando-se como referência substâncias químicas purificadas. A **Tabela 9** mostra os valores de custo em R\$ (reais) e em US\$ (dólar) para cada litro de meio produzido.

Tabela 9. Valores comparativos de custos de meios de cultivo.

	Meio Padrão		MRS modificado		CSN 12**	
	(R\$.L⁻¹)	(US\$.L⁻¹)*	(R\$.L⁻¹)	(US\$.L⁻¹)*	(R\$.L⁻¹)	(US\$.L⁻¹)*
Fornecedor 1	9,10	4,66	10,70	5,48	5,55	2,84
Fornecedor 2	9,17	4,70	8,65	4,43	4,54	2,32
Fornecedor 3	30,24	15,50	33,83	17,33	16,89	8,66
Média	16,17	8,29	17,73	9,08	9,0	4,60

* Valor do dólar cotado no dia 27/08/2007 = US\$ 1,951.

** Valor do litro do caldo de cana obtido diretamente de usina: R\$ 0,50.

Através dos dados fornecidos pelos laboratórios que comercializam produtos químicos (**Tabela 9**), verificou-se que o meio CSN 12 é 1,97 vezes mais econômico que o MRS e o meio Padrão apresenta um valor intermediário 1,79 vezes menor.

Considerando as maiores produções do ácido láctico e os custos dos meios, é possível estimar mediante cálculos qual seria o meio de cultivo economicamente mais viável (**Tabela 10**).

Tabela 10. Custos relativos dos produtos que compõem os meios de cultivo, relacionando-se com a produção de ácido láctico.

Meios de cultivo	Custo (R\$.L ⁻¹)	Custo (R\$. g ⁻¹)	Ácido Láctico (gL ⁻¹)
MRS	17,73	1,68	29,47
Meio Padrão	16,17	2,02	30,67
CSN 12	9,0	3,00	34,35

Os dados da **Tabela 10** demonstram que a maior produção de ácido láctico ocorreu no meio CSN 34,35gL⁻¹, a um custo de R\$ 9,0. Enquanto que para produzir 30,67 gL⁻¹ do ácido no meio Padrão, custa R\$ 16,17; uma economia de R\$ 2,01 a menos. Logo abaixo segue os cálculos:

$$\begin{aligned}
 &30,67 \text{ gL}^{-1} \text{ ác. láctico (MP)} \quad \text{_____} \quad \text{R\$ 16,17} \\
 &34,35 \text{ gL}^{-1} \text{ ác. láctico (CSN)} \quad \text{_____} \quad \text{X = R\$ 18,11} \\
 &\text{R\$ 18,11} \div \text{R\$ 9,0 (custo CSN)} = \text{R\$ 2,01}
 \end{aligned}$$

No meio MRS modificado foram produzidos 29,47gL⁻¹ de ácido láctico a um custo de R\$ 17,53; ao passo que no CSN, 34,35gL⁻¹ do ácido seria o equivalente a R\$ 20,6 do MRS, uma economia de 2,28 R\$.

$$\begin{aligned}
 &29,47 \text{ gL}^{-1} \text{ ác. láctico (MRS)} \quad \text{_____} \quad \text{R\$ 17,73} \\
 &34,35 \text{ gL}^{-1} \text{ ác. láctico (CSN)} \quad \text{_____} \quad \text{Y = R\$ 20,6} \\
 &\text{R\$ 20,6} \div \text{R\$ 9,0 (custo CSN)} = \text{R\$ 2,28}
 \end{aligned}$$

Diferentemente do esperado, o custo na produção dos meios de cultivo foi maior do que o preço comercial do ácido láctico citado pela literatura. Atribui-se a este fato o custo dos insumos utilizados na composição dos meios, substâncias químicas puras de custo elevado; o que onera o custo final.

Os valores obtidos foram calculados tendo como referência uma produção em laboratório e utilizando insumos de grau analítico de pureza. Entende-se que outras fontes devem ser exploradas (escala industrial) para a obtenção de insumos economicamente viáveis (baixo custo), para que os gastos com a produção do ácido sejam minimizados.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir:

- O meio CSN 12 brix é mais econômico que os demais.
- A linhagem selvagem de bactéria não identificada mostrou-se capaz de produzir maiores quantidades de ácido láctico, quando comparada com *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2 nos meios enriquecidos com 0,5% de extrato de tomate.
- O enriquecimento dos meios de cultivo com extrato de tomate e a agitação promoveram aumento na produção de ácido láctico.
- O meio Padrão quando comparado ao meio CSN 12 brix pode ser considerado como o segundo melhor meio para a produção de ácido láctico.
- Para produção de ácido láctico em grande escala, ainda pode-se buscar outras linhagens selvagens e meios de cultivo enriquecidos com outros nutrientes.

7. LITETARURA CITADA

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.

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.

ALCARDE, V.E. **Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica.** 1995. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects.** New York: Marcel Decker, 1998. p.30.

BERTOLETTI, A.C.D.; ANGELIS, D.F. de.; SANTOS, A.M. dos.; CHIERICE, G.O.; NETO, S.C. Ação do Poliquilgerm® sobre a microbiota da fermentação etanólica no controle de contaminantes. In: Sinaferm XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007 . Resumo expandido CD.

BOUDRANT, J.; MENSUTINA, 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.

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 Williams & Wilkins Company, 1974.

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.

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.

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

COCK, S. L.; STOUVENEL, A.R. de. Jugo de caña verde como sustrato en la producción fermentativa por lotes de ácido láctico. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 6, n. 2, p. 37-42, 2004.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P. de; ABREU-NETO, M.S. de, NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 177-182, 2006.

FALCÃO de MORAIS, J.O.; MAGALI de ARAÚJO, J.; MARANHÃO, R.E.; RAMALHO de MELLO, B. Isolamento de *Zygomonas mobilis* em mosto de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais. Separata de: **Revista de Microbiologia**, v. 14, p. 6-10.

FRANCHI, M.A.; SERRA, G.E.; CRISTIANINI, M. The use of biopreservatives in the control of bacterial contaminants of sugarcane alcohol fermentation. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 7, 2003.

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

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

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.

GOLLWITZER, H.; THOMAS, P.; DIEHL, P.; STEINHAUSER, E.; SUMMER, B.; BARNSTORF, S.; GERDESMEYER, L.; MITTELMEIER, W.; STEMBERGER, A. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly (D,L- lactic acid) coating for orthopaedic implants. **Journal of Orthopaedic Research**, Article In Press, p. 1-8, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6. ed. Philadelphia: Guanabara Koogan S.A, 1998.

HÁBOVÁ, V.; MELZUCH, K.; RYCHTERA, M.; SEKAVOVÁ. Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth. **Desalination**, v. 163, p. 361-372, 2004.

HAULY, M.C. de O.; OLIVEIRA, A.R. de.; OLIVEIRA, A.S. de. Lactic acid production by *Lactobacillus curvatus* in sugarcane molasses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 133-142, 2003.

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.

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.

HYNES, SH; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 284-291, 1997.

ISERENTANT, D. Practical aspects of yeast flocculation. **Belgium Journal of Brewing and Biotechnology**, v. 21, n.3, p. 30-33, 1996.

KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS, V.; KALLIS, M.; BEZIRTZOGLU, E.; KANELLAKI, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 411-416, 2005.

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, 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.

LOPES, A.R.; ANGELIS, D.F. de.; CONTIERO, J. Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo. In: Sinaferm XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007 . Resumo expandido CD.

LOPES, A. **Production, purification et immobilization de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides***. 1979. Tese (Doctor Ingenieur) INSA, Toulouse, França, 1979.

LOPEZ, Z.O.; MORENO, I.E.; FOGLIATA, F.A.; AYALA, H.G. Microbial population of sugar juice that is neither affected nor deteriorated by frost. **Sugar y Azucar**, v. 83, n.9, 1988.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; D.F. DE ANGELIS. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p. 63-68, 2001.

MACIEL, J. F. **Antagonismo de culturas lácticas associadas com cana-de-açúcar sobre *Gluconacetobacter diazotrophicus***. 2001. 67 f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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

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

MEESKE, R.; MERWE, G.D. van der.; GREYLING, J.F., CRUYWAGEN, C.W. The effect of adding and enzyme containing lactic acid bacterial inoculant to big round bale oat silage on intake, milk production and milk composition of Jersey cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 97, p. 159-167, 2002.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 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.

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

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

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.

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

OLIVA-NETO, P. de.; YOKOYA, F. Effect of 3,4,4' – trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alvoholic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 17-21, 1998.

OLIVA-NETO, P. de.; FERREIRA, M. A.;YOKOYA, F. Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. **Bioresource Technology**, v. 92, p.1-6, 2004.

OHARA, H.; YAKATA, M. L- lactic acid production by *Bacillus sp* in anaerobic and aerobic culture. **Journal of Fermentation and bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 272-274, 1996.

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.

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.

PULZ, P. **Efeito de agentes químicos e físicos sobre a fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* contaminada com *Lactobacillus fermentum***. 2002. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2002.

ROBERGS, R. A. ; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, p. 502-516, 2004.

RODINI, M.A.T. **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias alcoólicas**. 1985. 92 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

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.

SAKATA, M. M.; RINCON, M.C.A. do; DUEK, E. A. R. Estudo da interação polímero / cartilagem / osso utilizando Poli (ácido láctico - co - ácido glicólico) e Poli (p- Dioxanona) em condilo femural de coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 3, p. 176-180, 2004.

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.

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.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p. 819-828, 2001.

TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CARR, J.G.; CUTTING, C.V.; WHITING, G.C. (Ed.) **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press, 1975. p. 177-191.

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.

TUOMINEN, JUKKA. **Chain linked lactic acid polymers: Polymerization and biodegradation studies**. Finlândia, ed. Polymer Technology Publication Series, 2003, n. 25, 28 fev.

UEMATSU, K.; HATTORI, K.; ISHIMOTO, Y.; YAMAUCHI, J.; HABATA, T.; TAKAKURA, Y.; OHGUSHI, H.; FUKUCHI, T.; SATO, M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three - dimensional poly – lactic - glycolic acid (PLGA) scaffold. **Biomaterials**, v. 26, p. 4273-4279, 2005.

VENTURA R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo.** 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

WEE, Y. J.; KIM, J.N.; YUN, J.S.; RYU, H.W. Utilization of sugar molasses for economical L(+) lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 568-573, 2004.

WEE, Y.J.; KIM, J.N.; RYU, H.W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, p. 163-172, 2006.

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.

ZHOU, S.; CAUSEY, T.B.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K.T.; INGRAM, L.O. Production of optically pure D- lactic acid in mineral salts medium by matabolically engineered *Escherichia coli* W3110. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 399-407, 2003.