

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Paula Katharina Nogueira da Silva**

**Avaliação do potencial de assimilação açúcares da bactéria *Lactobacillus vini* a partir meios de cultivo sintéticos.**

Recife, 2015

Paula Katharina Nogueira da Silva

**Avaliação do potencial de assimilação açúcares da bactéria *Lactobacillus vini* a partir meios de cultivo sintéticos.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior  
Orientador

Profa. Dra. Brígida Thais Luckwu de Lucena  
Co-orientadora

Recife, 2015

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Paula Katharina Nogueira da

Avaliação do potencial de assimilação açúcares da bactéria *Lactobacillus vini* a partir meios de cultivo sintéticos / Paula Katharina Nogueira da Silva. – Recife, 2015.

50 f.: il.

Orientadores: Marcos Antônio de Moraes Júnior, Brígida Thais Luckwu de Lucena

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências

1. Bactérias 2. Lactobacilo I. Moraes Júnior, Marcos Antônio de (orient.) II. Lucena, Brígida Thais Luckwu III. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UF PE/CB-2017-385

Paula Katharina Nogueira da Silva

**Avaliação do potencial de assimilação açúcares da bactéria *Lactobacillus vini* a partir meios de cultivo sintéticos.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data da aprovação: 27/02/2015

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Marcos Antonio de Morais Junior  
Departamento de Genética – UFPE

---

Profª. Dra. Márcia Vanusa da Silva  
Departamento de Bioquímica – UFPE

---

Prof. Dr. Will de Barros Pita  
Departamento de Antibióticos– UFPE

Recife, 2015

Dedico este trabalho aos meus amados pais Reginaldo e Claudia, a minhas avó e bisavó Geneide e Zuleide (*in memoriam*) ao meu irmão Igor e ao meu noivo Rafael.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior, meu orientador, pela confiança, oportunidade, exemplo e amizade.

A Prof. Dra. Brigida Thaís Luckwu de Lucena, pela co-orientação.

Ao Prof. Irapuã Pinheiro e sua aluna Amanda Mota por disponibilizar e viabilizar o uso do HPLC.

Aos integrantes do Department of Dairy and Fat Technology, Institute of Chemical Technology in Prague, pela recepção Especialmente a Michaela e Ruzena pela ajuda e a Eva e minhas supervisoras, professoras Milada e Šárka que me assistiram com esmero. Enfim, a todos que compõem o departamento, muito obrigada pela atenção, e por fazer desta experiência uma incrível experiência de vida!

Aos colegas do Núcleo de Engenharia Metabólica – NEM, em especial a Carol Elsztein e a Will, que tantas vezes deixou de ser o professor Will mas se manteve amigo. A vocês dois agradeço a amizade, os cafés e os momentos fora da rotina de trabalho;

Aos colegas Allyson e André pelas discussões de artigos e resultados e pela companhia na bancada;

Ao meu noivo Rafael, pelo companheirismo, cumplicidade, por nunca me deixar desistir e sempre incentivar, e pela ajuda fundamental na conclusão dessa jornada.

Aos meus pais Claudia e Reginaldo e minha avó Geneide, por tudo que são e representam para mim e pelos exemplos que me dão todos os dias.

## Resumo

A produção de etanol combustível em destilarias do nordeste brasileiro apresenta constantemente o seu rendimento em etanol comprometido pela presença de bactérias, como a *Lactobacillus vini*. Esta espécie foi recentemente identificada na produção de vinho e etanol, estando associada a presença de leveduras contaminantes, como a *Dekkera bruxellensis*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a assimilação de diversos açúcares presentes nos diferentes substratos industriais nos quais esta bactéria está presente. A linhagem industrial *L. vini* JP 7.8.9, isolada de destilarias do Nordeste brasileiro, foi utilizada como modelo de estudo. Os ensaios de assimilação foram realizados utilizando o kit API 50 CHL, o que resultou em um perfil de assimilação de açúcares muito semelhante ao da linhagem tipo. Entretanto, a variabilidade fenotípica intraespecífica observada não permitiu a identificação de fatores que sugerissem adaptação a quaisquer dos tipos de substratos industriais, mas sugere a possibilidade de que estas variações sejam produto de uma diversidade genômica causada pela presença de elementos móveis identificados recentemente no sequenciamento de seu genoma. Ensaios de crescimento em anaerobiose em que houve variação das fontes de carbono e de nitrogênio mostraram que celobiose é um dissacarídeo facilmente metabolizado por esta espécie, fato que deve estar associado à presença de vários genes que codificam a enzima  $\beta$ -glicosidase e de transportadores do tipo PTS-celobiose em seu genoma. O presente estudo abre, portanto, importante perspectiva para o início da elucidação das características bioquímicas desta bactéria, ainda pouco conhecido, o que permite compreender como este microrganismo consegue se manter no processo de produção de etanol como contaminante, bem como, abre a perspectiva do emprego de *L. vini* na produção de metabólitos de alto valor agregado, como o ácido láctico, possibilitando ainda o melhoramento de suas habilidades industriais.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus vini*. Metabolismo. Celobiose. Citrato. Lactato.

## Abstract

Distilleries producing fuel ethanol in the Northeast of Brazil have their ethanol yield constantly compromised by the presence of lactic acid bacteria such as *Lactobacillus vini*. This species was recently identified in the production of wine and ethanol, associated with contaminant yeast such as *Dekkera bruxellensis*. This study evaluated the assimilation of several sugars present in different industrial substrates in which this bacterium is found. The industrial strain *L. vini* JP 7.8.9, isolated distilleries in Northeast Brazil, was used as a model. Assimilation tests performed with the API 50 CHL kit resulted in a sugar assimilation profile very similar to the type strain. However, intraspecific phenotypic variability did not allow the identification of factors that suggest adaptation to any types of industrial substrates. It suggests that these variations are the product of genomic diversity caused by the presence of newly identified mobile elements in its genome sequencing data. Under anaerobic growth assays varying carbon and nitrogen sources showed that cellobiose is a disaccharide easily metabolized by this species, which might be related to the presence of several genes encoding for  $\beta$ -glucosidase enzyme and PTS-cellobiose transport system in its genome. The present study opens an important perspective to the elucidation of the biochemical characteristics of this microorganism, still poorly known, which allows us to understand how this organism can be consistently found in the ethanol production process as a contaminant. Additionally, our study opens the prospect of the employment of *L. vini* in the production of high value-added metabolites, such as lactic acid, also enabling the improvement of its industrial skills.

**Key words:** *Lactobacillus vini*. Metabolism. Cellobiose. Citrate. Lactate.

## Lista de Figuras

Figura 1. Vias para a produção de ácido láctico a partir de carboidratos, por parte de bactérias ácido lácticas (Wang *et al.*, 2015).

Figura 2. *L. vini* – linhagem industrial JP7.8.9.

Figura 3. Porcentagem dos isolados de espécies de LAB encontradas no início e no final do processo fermentativo (Lucena *et al.*, 2010).

### Anexo 1

Figura 1. Cinética do crescimento anaeróbio a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos com diferentes fontes de carbono. Gli: glicose; Fru: frutose; Sac: sacarose; Cel: cellobiose; Mal: maltose; Lac: lactose.

Figura 2. Cinética do crescimento anaeróbio a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos contendo sulfato de amônio (A), nitrato de sódio (B) ou glutamato (C) como fonte de nitrogênio.

Figura 3. Cinética da fermentação de glicose (A) e de sacarose (B) pelas células de *L. vini* JP7.8.9 em meio MRS reconstituído contendo citrato de amônio.

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies de levedura e bactérias encontradas no caldo de cana de açúcar (Sherata, 1960; De Azeredo, 1998; Santos2012).

Tabela 2. Traços fenotípicos que diferem entre *Lactobacillus vini* sp. nov. e seus vizinhos filogenéticos mais próximos *L. mali*, *L. nagelii* e *L. satsumensis* (Rodas et al 2006).

### Anexo 1

Tabela 1. Comparação fenotípica entre espécies de *lactobacillus* com relação a assimilação de diferentes fontes de carbono (Rodas *et al.*, 2006; Manual API Teste 50 CHL, Biomerieux, Marcy l'Etoile, França).

## Lista de Abreviaturas

<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>LAB</b>	Lactic Acid Bacteria (Bactéria ácido láctica)
<b>EMP</b>	Via Embden-Meyerhof-Parnas
<b>FDP</b>	Fructose 1,6-diphosphate (Frutose-1,6-difosfato)
<b>DHAP</b>	Dihydroxyacetone phosphate (Dihidroxiacetona fosfato)
<b>GAP</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate (Gliceraldeído-3-fosfato)
<b>PP</b>	Pentose Phosphate Pathway (Via Pentose Fosfato)
<b>PK</b>	Phosphoketolase Pathway (Via Fosfocetolase)
<b>OHO</b>	Obligately Homofermentative (Homofermentativo Obrigatório)
<b>FHE</b>	Facultative Heterofermentative (Heterofermentativo Facultativo)
<b>OHE</b>	Obligately Heterofermentative (Heterofermentativo Obrigatório)
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta pressão
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>GC</b>	Guanina+Citosina
<b>LAG</b>	Fase latente do crescimento microbiano
<b>PTS</b>	Sistema fosfotransferase (Bacterial phosphotransferase system)
<b>GlcU</b>	Glicose permease
<b>CcpA</b>	Catabolite Control Protein A (Proteína A de controle catabólito)
<b>P-Ser-HPr</b>	Proteína co-repressora do mecanismo de repressão catabólita
<b>CitP</b>	Citrato permease

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	11
2. Referencial Teórico.....	12
2.1 Contaminação Bacteriana.....	13
2.2 Bactérias Ácido Láticas .....	14
2.2.1 O gênero Lactobacillus .....	16
2.2.2 <i>Lactobacillus vini</i> .....	19
3. Objetivos .....	22
3.1 Geral .....	22
3.2 Metas .....	22
4. Referências Bibliográficas .....	22
5. ANEXO 1.....	31

## 1. Introdução

A produção de etanol combustível em destilarias do Brasil a partir da fermentação industrial do caldo da cana-de-açúcar é um campo rico de estudo tanto sobre o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, quanto em relação à diversidade de microrganismos. A cana-de-açúcar, principal matéria prima utilizada no Brasil, é processada na grande maioria das destilarias sem prévia esterilização do caldo, possibilitando uma série de contaminações por microrganismos indesejáveis, podendo ameaçar a estabilidade da população de *S. cerevisiae* do processo e interferir no rendimento e produtividade da fermentação industrial. Além disso, a reutilização total da biomassa celular ao longo de vários ciclos de fermentação favorece a constante dinâmica populacional e, conseqüentemente, a presença de bactérias e leveduras contaminantes. Os estudos sobre essa dinâmica populacional de microrganismos em dornas de fermentação nas destilarias brasileiras vêm sendo realizados pelo Núcleo de Engenharia Metabólica da UFPE (NEM) e tem gerado resultados bastante relevantes tanto para o contexto industrial, quanto no contexto científico. Um desses resultados foi a detecção da bactéria *Lactobacillus vini* no mosto fermentado de destilarias do nordeste brasileiro, numa concentração significativamente maior do que outras bactérias. A partir disso, o grupo vem desenvolvendo estudos para identificar a influencia dessa bactéria no rendimento da fermentação sua relação com leveduras (*S. cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*) comumente encontradas no processo industrial.

Diante do exposto, este estudo teve como principal objetivo aumentar o conhecimento sobre a fisiologia da assimilação do açucares da linhagem *L. vini* JP 7.8.9, por se tratar de uma linhagem plenamente adaptada às condições extremas da indústria do etanol. O presente trabalho determinou o perfil de assimilação de diferentes tipos de açucares pelas células desta linhagem e a produção de metabólitos de fermentação. Em adição, foi analisada a capacidade de utilização de diferentes fontes de nitrogênio, dentre as quais aquelas encontradas no substrato industrial de caldo de cana. Estes resultados servirão para o entendimento acerca da adaptação desta bactéria ao ambiente industrial bem como para a avaliação do potencial de exploração industrial desta espécie.

## 2. Referencial Teórico

A produção de etanol combustível realizada pelas destilarias do Brasil há várias décadas é um forte exemplo da importância biotecnológica de certos microrganismos como, por exemplo, da levedura *S. cerevisiae* que, de forma eficiente, é capaz de assimilar diversas fontes nutricionais do caldo de cana de açúcar e produzir etanol, entre outros compostos (Walker, 2003).

A fermentação alcoólica nas destilarias brasileiras vem sendo fonte de vários estudos sobre a dinâmica populacional tanto de leveduras como de bactérias, por se tratar de um ambiente não estéril e, portanto, propício ao aparecimento de diferentes espécies. Essas contaminações por microrganismos selvagens, ou seja, microrganismos que não faziam parte da microbiota inoculada no processo podem causar danos significativos na produção de etanol (Amorim *et al.*, 2004; Silva-Filho *et al.*, 2005b; Andrietta *et al.*, 2007). Portanto, o acompanhamento da microbiologia tanto da matéria-prima, como também da fermentação se torna essencial para um devido controle do processo.

Apesar do aparecimento de microrganismos selvagens, geralmente oriundos do caldo de cana (Tabela 1), algumas linhagens de *S. cerevisiae* são capazes de se estabelecer ao longo da safra. Essas linhagens podem variar de acordo com a região, como por exemplo, a linhagem PE-2 que permanece dominante em 58% das destilarias do estado de São Paulo (Basso *et al.*, 2008), e a linhagem JP1 que é mais adaptada as características da região nordeste (Silva-Filho *et al.*, 2005a). Ambas, além de permanecer no processo apresentam uma alta produção de etanol e eficiência de fermentação, fazendo com que se tornem comercialmente muito atrativas no setor sucroalcooleiro.

Outras espécies de leveduras também são capazes de se estabelecer no processo, porém, não tem a mesma capacidade fermentativa e se tornam indesejadas, como por exemplo, a levedura *Dekkera bruxellensis* (Liberal *et al.*, 2007; Basílio *et al.*, 2008), que também é relatada na indústria do vinho e da cerveja por produzirem compostos tanto desejáveis como indesejáveis às bebidas (Boulton *et al.*, 1996). Essa espécie vem sendo estudada ao longo dos anos, principalmente, para entender suas habilidades de adaptação as condições industriais (Ciani *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2011; De Barros Pita *et al.*, 2011, 2013; De Souza *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013) mas também para uma possível

utilização dessa levedura na produção de etanol em consórcio com outros microrganismos (Passoth, *et al.*, 2007) e também na produção de cachaça (Parente *et al.*, 2014).

**Tabela 1.** Espécies de levedura e bactérias encontradas no caldo de cana de açúcar.

<b>Leveduras</b>	<b>Bactérias</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Leuconostoc garlicum</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
<i>Endomyces</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Hansenula</i>	<i>Weissella cibaria</i>
<i>Kloeckera</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Pichia</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>Lactobacillus nageli</i>
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Enterobacter sp.</i>
<i>Debaromyces</i>	

Fonte: Sherata (1960), De Azeredo (1998) e Santos (2012)

## 2.1 Contaminação Bacteriana

Uma das questões mais relevantes economicamente na produção de etanol é a contaminação bacteriana, que está diretamente ligada com a diminuição da eficiência da fermentação (Muthaiyan *et al.*, 2011). Isto é mais preocupante quando a concentração de bactéria atinge níveis superiores a  $10^7$  ufc/ml (Amorim *et al.*, 1981). As bactérias competem com as leveduras por diversos nutrientes e, principalmente, pelas fontes de carbono (Narendranath *et al.*, 1997; Nobre, 2005; Muthaiyan *et al.*, 2011). Como exemplo, para cada molécula de açúcar utilizada na produção de lactato, ocorre a perda de produção de duas moléculas de etanol (Ingledeew, 1995).

Um dos maiores prejuízos causados pela presença de bactérias em processos de fermentação alcoólica, além da competição pelos nutrientes é a formação dos ácidos láctico

e acético que podem ocasionar intoxicação das leveduras, inibindo, portanto, o crescimento destas (Narendranath *et al.*, 2001; Skinner, 2004;). Estas podem ainda provocar a floculação das leveduras, que ocasiona redução na velocidade da fermentação, além de inconvenientes como entupimento de tubulações, aumento de fundo de dorna, dificuldade de operação das centrífugas devido ao entupimento dos bicos (Serra *et al.*, 1979; Yokoya & De Oliva-Neto, 1991). Tudo isto gera custos para a indústria, que vão desde a limpeza das dornas, utilização de antibióticos, à troca do fermento e queda no rendimento. Além disso, na fermentação de vinho a presença excessiva de bactérias pode causar sérios problemas, devido ao aumento da acidez do produto final e a diminuição da viabilidade das células de leveduras (Yokoya e Oliva-Neto, 1991).

As espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella* estão entre as espécies de bactérias ácido lácticas mais comumente encontradas na indústria de etanol, possivelmente, por serem tolerantes à baixos valores de pH, altas temperaturas e apresentarem ainda altas taxas de crescimento (Narendranath *et al.*, 1997). Entre estes grupos, os *Lactobacillus* predominam nos processos de fermentação, como tem sido observado por um longo tempo, sendo considerados os principais contaminantes na produção de etanol (Kandler, 1983; Kandler e Weiss, 1986; De Oliva-Neto & Yokoya, 1994; Chang, *et al.*, 1995; Schell, *et al.*, 2007). Em estudo comparando o efeito de bactérias heterofermentativas (*Lactobacillus fermentum*) e homofermentativa (*Lactobacillus plantarum*) no rendimento fermentativo foi constatado que a *L. fermentum* causa um maior efeito negativo na fermentação alcoólica em relação a *L. plantarum*, gerando uma diminuição no rendimento em etanol (Basso *et al.*, 2014). Estudos em destilarias do nordeste brasileiro revelaram uma grande diversidade de espécies de *Lactobacillus*, tanto no caldo de cana de açúcar, como também no mosto fermentado (Lucena *et al.*, 2010).

## 2.2 Bactérias Ácido Lácticas

Uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi encontrada em fermentações de etanol combustível, incluindo espécies de *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

*Pediococcus*, e *Weissella* (Chang *et al.*, 1995; Skinner, 2004; Lucena *et al.*, 2010). A maior parte destas é considerada bactérias ácido-láticas (LAB, do inglês Lactic Acid Bacteria). O termo “bactérias ácido-láticas” é relacionado com a atividade metabólica que tem o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (Sun *et al.*, 2014). Podem produzir ácido láctico como único metabólito, no caso das homofermentadoras, ou produzir outros compostos como, ácido acético, ácido fórmico, etanol e dióxido de carbono, como as heterofermentadoras (Kandler, 1983; König eFröhlich, 2009; Von Wright e Axelsson, 2012; Smid e Kleerebezem, 2014).

Estas bactérias podem ser encontradas em dois filós: o filo *Firmicutes* no qual se encontram os gêneros *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*; e o filo *Actinobacteria*, no qual se encontra o gênero *Bifidobacterium*, o único fora do grupo dos *Firmicutes* (Von Wright e Axelsson, 2012; Smid e Kleerebezem, 2014; Sun *et al.*, 2014; Holzapfel e Wood, 2014). Compreendem um grupo de bactérias Gram-positivas, não esporulantes, normalmente catalase negativas, tem forma de cocos, cocobacilos e/ou bacilos (Kandler, 1983; Axelsson, 2004; König eFröhlich, 2009; Sun *et al.*, 2014;), e contém baixo conteúdo de GC em seu DNA (König eFröhlich, 2009; Sun *et al.*, 2014; Holzapfel e Wood, 2014).

Podem ser encontradas em diversos habitats como produtos alimentícios (lácteos, vegetais, carnes), material em decomposição, bebidas e em cavidades de animais, como cavidades oral e vaginal e trato respiratório e gastrointestinal (König eFröhlich, 2009; Von Wright e Axelsson, 2012). São bactérias tolerantes a ácidos (König eFröhlich, 2009; Smid e Kleerebezem, 2014; Sun *et al.*, 2014; Holzapfel e Wood, 2014), e que podem conferir um “longo tempo de prateleira” aos produtos industrializados, uma vez que provocam uma diminuição no pH em associação com a produção de ácidos orgânicos, o que inibe o crescimento de microrganismos competidores (Smid e Kleerebezem, 2014;). Isto, aliado à sua permanência no trato gastrointestinal, pode possibilitar a utilização das LABs como probióticos, promovendo benefícios à saúde do hospedeiro. Seus efeitos benéficos na indústria de alimentos ainda incluem a habilidade de produzir compostos aromáticos e realçadores de sabor (Carr *et al.*, 2002)

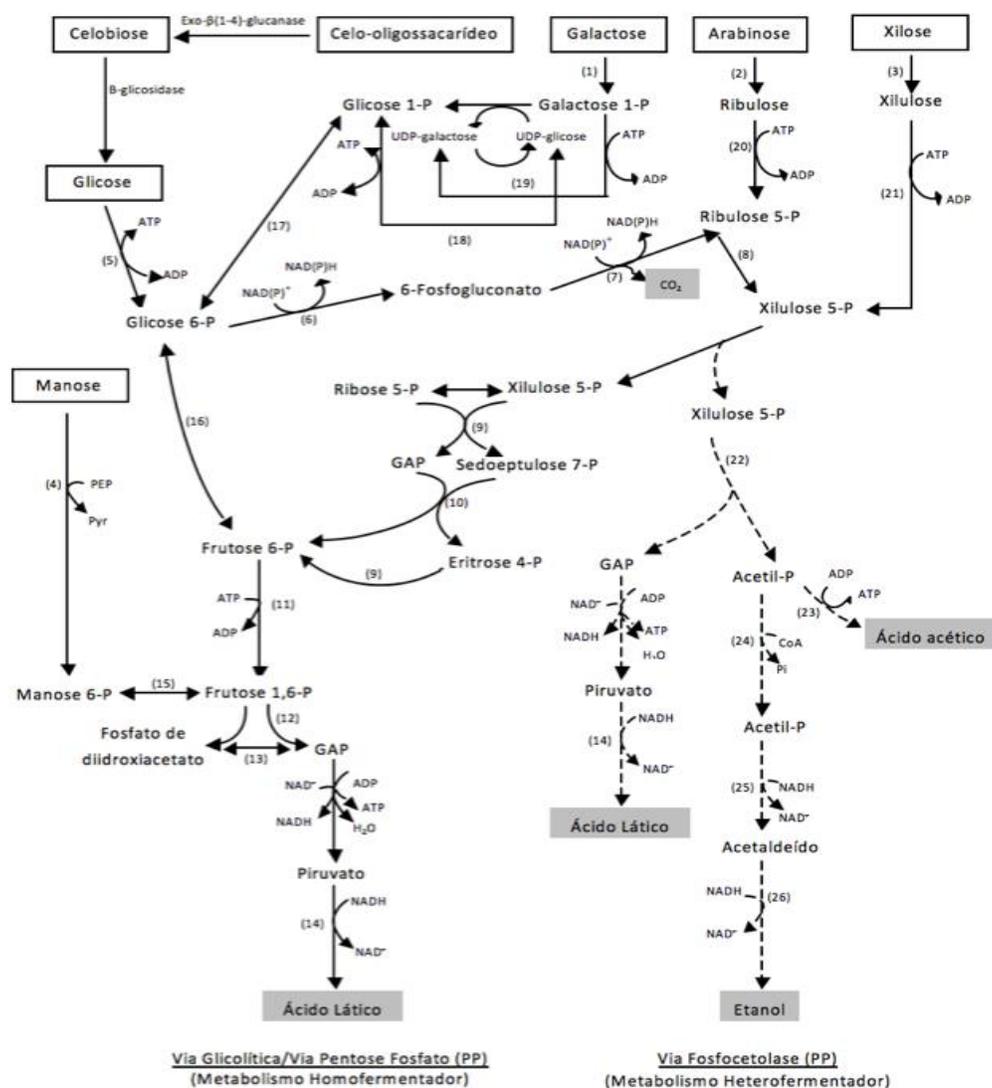
As LABs são anaeróbicas e estritamente fermentativas, embora sejam aero-tolerantes (Axelsson, 2004; König eFröhlich, 2009; Von Wright e Axelsson, 2012), e apresentam

três vias principais de fermentação de carboidratos (Figura 1): a Glicólise, ou via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), que em condições de disponibilidade de açúcares e limitação de oxigênio, é caracterizada pela formação da frutose-1,6-difosfato (FDP), a partir de hexoses, que é quebrada pela FDP aldolase em duas trioses (dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP)), que por sua vez, são convertidas a lactato (Kandler, 1983; Von Wright e Axelsson, 2012); a Via das Pentoses-Fosfato (PP), na qual as pentoses são fosforiladas e então convertidas a xilulose-5-fosfato e posteriormente em GAP pela ação das enzimas transcetolase e transaldolase, seguido pela conversão do GAP a piruvato, resultando em ácido lático. A via das pentoses pode ainda seguir pela Via Fosfocetolase (PK), na qual a xilulose-5-fosfato, resultante de pentoses ou ainda da glicose-6-fosfato (quando esta é convertida a 6-fosfogluconato), sofre a ação da enzima fosfocetolase e é clivada em GAP e acetil-fosfato (Acetil-P), que são reduzidas, transformando-se em ácido lático e etanol e/ou ácido acético, respectivamente. (Kandler, 1983; Kandler e Weiss, 1986; Wang *et al.*, 2015).

### 2.2.1 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é um grupo heterogêneo de bactérias ácido lácticas (LAB), composto por bactérias com diferentes propriedades fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas (Axelsson, 2004). A heterogeneidade do grupo é refletida na variação dos valores de GC em seu DNA. Espécies do gênero apresentam variações aproximadamente entre 32 e 55 mol %, o que representa cerca de duas vezes mais do que o aceitável normalmente, para um único gênero (Schleifer, 1983). Apresentam morfologia bacilar e são, geralmente, as espécies mais ácido-tolerantes (Hammes e Vogel, 1995; Hammes e Hertel, 2006; Slover e Danziger, 2008.). Estas bactérias são fastidiosas, apresentando necessidades nutricionais complexas, por vezes muito exigentes para os carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais derivados de ácidos nucleicos vitaminas e minerais. (Hammes e Vogel, 1995; Hammes e Hertel, 2006; König eFröhlich, 2009; Holzapfel e Wood, 2014). Ocasionalmente são redutoras de nitrato, normalmente não têm motilidade (Hammes e Vogel, 1995; Hammes e Hertel, 2006) e crescem a uma

temperatura e pH ótimos entre 30 e 40°C, e 5.5 e 6.2, respectivamente (Hammes e Hertel, 2009; Salvetti *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Vias para a produção de ácido láctico a partir de carboidratos, por parte de bactérias ácido lácticas. GAP, gliceraldeído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; Pyr, piruvato. Enzimas: 1, galactoquinase; 2, arabinose isomerase; 3, xilose isomerase; 4, manose fosfotransferase; 5, hexoquinase; 6, glicose-6-fosfato desidrogenase; 7, 6-fosfogluconato desidrogenase; 8, ribulose-5-fosfato 3-epimerase; 9, transcetolase; 10, transaldolase; 11, 6-fosfofruoquinase; 12, frutose-bisfosfato aldolase; 13, triosefosfato isomerase; 14, lactato desidrogenase; 15, fosfomanose isomerase; 16, fosfoglicose isomerase; 17, fosfoglucomutase; 18, galactose-1-fosfato uridil-transferase; 19, glicosiltransferase; 20, ribulocinase; 21, xiluloquinase; 22, fosfocetolase; 23, acetato quinase; 24, fosfotransacetilase; 25, aldeído desidrogenase; 26, álcool desidrogenase. (Retirado de Wang *et al.*, 2015)

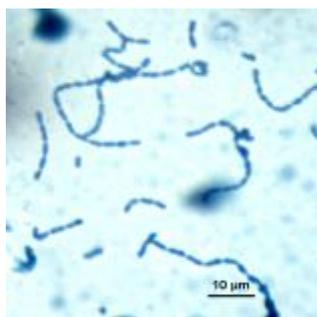
Amplamente distribuídos na natureza, os *Lactobacillus* são encontrados onde substratos ricos em carboidratos estão disponíveis (Hammes e Vogel, 1995; Hammes e Hertel, 2006), podendo ser também encontrados em diversos produtos alimentícios, principalmente em

produtos de origem láctea (Axelsson, 2004, Salvetti *et al.*, 2012). Geralmente são considerados como “Bactérias seguras” (Ajay e Ramana, 2009, Salvetti *et al.*, 2012), e compõem a microbiota entérica de humanos e outros mamíferos (Sekirov *et al.*, 2010), de forma que algumas espécies de *Lactobacillus*, como *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* e *L. fermentum*, são utilizadas como probióticos, por exemplo (Reid, 1999). Na presença de oxigênio ou de outros oxidantes, quantidades elevadas de acetato podem ser produzidas em detrimento ao lactato ou etanol. Assim, variações nos produtos metabólicos finais podem ocorrer. Vários compostos (por exemplo, citrato, malato, tartarato, quinolato, nitrato, nitrito, etc) podem ser metabolizados, e utilizados como fonte de energia ou aceptores de elétrons (Hammes e Vogel, 1995). Originalmente, as espécies deste gênero eram agrupadas com base na temperatura de crescimento e habilidade de fermentar hexoses (Carr *et al.*, 2002). Atualmente, a base fisiológica para a divisão é, geralmente, a presença ou ausência das enzimas do metabolismo de açúcar, dividindo, portanto, o gênero em três grupos distintos, de acordo com o modo como realizam a degradação dos carboidratos (Kandler, 1983; Kandler e Weiss, 1986; Hammes e Vogel, 1995; Sun *et al.*, 2014):

- Homofermentadores Obrigatórios (OHO): Só fermentam hexoses à ácido láctico, quase que exclusivamente (cerca de 85%), pela via EMP, na qual 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico e 2 moles de ATP.
- Heterofermentadores Facultativos (FHE): Semelhante ao grupo OHO, fermentam hexoses a ácido láctico pela via EMP, mas em condições extremas de glicose limitante, tem habilidade de degradar gluconato e pentoses através das vias Pentose Fosfato (PP) ou Fosfocetolase (PK), resultando na produção de ácido láctico, etanol e/ou ácido acético e CO<sub>2</sub>.
- Heterofermentadores Obrigatórios (OHE): Fermentam hexoses e pentoses exclusivamente pela via Fosfogluconato, que correspondente à primeira parte da via Pentose Fosfato, produzindo ácido láctico, etanol ou ácido acético, e CO<sub>2</sub>.

### 2.2.2 *Lactobacillus vini*

Recém-descrita na literatura (Rodas *et al.*, 2006), a bactéria *Lactobacillus vini* foi isolada pela primeira vez em 1978 em mosto fermentado de uva e denominada *Lactobacillus* sp. Mont 4. Esta linhagem apresentava cerca de 95,1 e 95,3% de homologia com linhagens de *Lactobacillus mali* e *Lactobacillus nagelii*, respectivamente, fato que pode ter contribuído para a demora de sua identificação como uma nova espécie (Rodas *et al.*, 2005). De acordo com sua descrição, a linhagem mantém as características das LABs, tais como Gram-positiva, catalase negativa e não esporulante (Figura 2). É anaeróbica facultativa, e homofermentativa para pentoses e hexoses, produzindo exclusivamente o lactato como produto final. Fermenta, entre outros, celobiose, maltose, trealose, sacarose, D-glicose, D-frutose, D-manose e L-Arabinose, mas não fermenta D-arabinose (Tabela 2). Não fermenta ainda, glicerol, D-xilose, L-xilose, manitol, lactose, xilitol, D-arabitol ou L-arabitol (Rodas *et al.*, 2006). A linhagem tipo não produz amônia a partir de arginina, fermenta D-ribose, não fermenta D-galactose, metil-x-D manosideo ou D-tagatose, é incapaz de hidrolisar arginina, mas não arbutina, e o teor de GC é de 39.4 mol% (Rodas *et al.*, 2006). O genoma de *L. vini* foi recentemente sequenciado pelo nosso grupo de pesquisa, tanto da linhagem tipo DMS 20605T descrita por Rodas *et al.* (2006) como da linhagem industrial JP7.8.9 isolada da fermentação alcoólica. Seu genoma contém em média 2,25 Mb, com conteúdo de GC na faixa de 37,7%, que abriga cerca de 1950 genes (Lucena *et al.* 2012). As anotações revelaram a presença de genes que tem grande relevância para uso industrial, como no caso de hidrolases e outras enzimas do metabolismo de carboidratos.



**Figura 2.** Morfologia das células de *Lactobacillus vini*, linhagem industrial JP7.8.9 depois de coloração de Gram (Foto da autora).

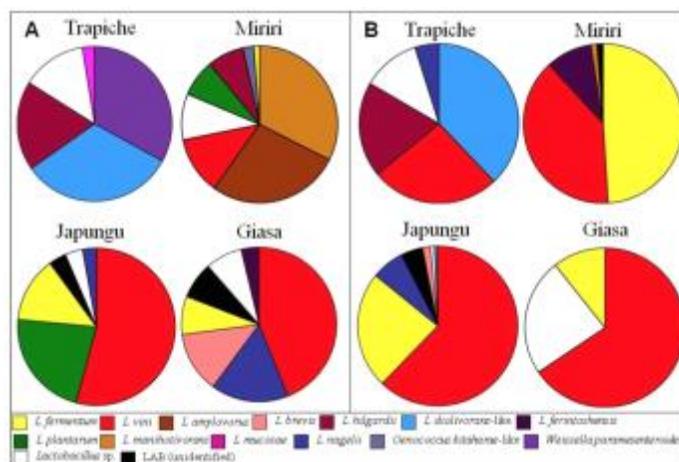
**Tabela 2.** Traços fenotípicos que diferem *Lactobacillus vini* de seus vizinhos filogenéticos mais próximos *L. mali*, *L. nagelii* e *L. satsumensis*.

Características	1	2	3	4
Crescimento em MRS a 15°C	-	+	+	+
Crescimento com 5% NaCl	+	-	+	+
Fermentação de:				
L-Arabinose	+	-	-	-
L-Sorbose	-	-	+	+
L-Rhamnose	-	-	+	+
D-Manitol	-	+	+	+
D-Sorbitol	-	+	+	-
Metil $\alpha$ -D-Glicosido	-	-	+	+
Salicina	+	-	+	+
Celobiose	+	+	+	-
Maltose	+	-	+	+
$\beta$ -Gentiobiose	+	+	-	+
D-Turanose	-	-	-	+
Isomero de Ácido Láctico	DL*	L	DL	L
Formação de exopolissacarídeos de sacarose	-	+	+	+
Tipo de peptídeo glicano	L-Lys-D-Asp	DAP	DAP	DAP

Especies: 1, *L. vini*; 2, *L. mali*; 3, *L. nagelii*; 4, *L. satsumensis*. +, positivo; -, negativo; DAP, ácido diaminopimélico. (Rodas *et al.*, 2006).

Desde sua descrição, *L. vini* vem sendo encontrada em alguns processos industriais pelo mundo. Na Suécia, a *L. vini* foi isolada durante o processo de produção de etanol (Passoth *et al.*, 2007). No Brasil, a presença da *L. vini* foi descrita, em grandes proporções, no mosto fermentado das destilarias de etanol do nordeste (Figura 3), se mantendo em maior quantidade com relação a outras LABs durante toda a safra 2007/2008, principalmente, após 60 dias do início das moagens (Lucena *et al.*, 2010), e estudos posteriores indicaram que influencia da presença dessa bactéria no rendimento da fermentação alcoólica em caldo de cana-de-açúcar sobre o consorcio entre *S. cerevisiae* (linhagem industrial JP1) e *D. bruxellensis* (linhagem industrial GDB 248) não exerce nenhum efeito negativo sobre as células de levedura (De Souza *et al.*, 2012). Apesar destes estudos e principalmente da frequência com a qual a *L. vini* vem sendo encontrada nas indústrias de etanol, pouco se sabe a respeito de sua fisiologia e seu metabolismo, o que permitiria compreender a ecologia deste microrganismo no processo industrial (as características de adaptabilidade e sua relação com os outros componentes da microbiota do processo) bem como seu potencial na produção de compostos de interesse

biotecnológico (tais como a produção de ácidos orgânicos e de compostos aromáticos, ou mesmo na produção de biocombustíveis).



**Figura 3.** Distribuição de isolados de espécies de LAB encontradas no início (A) e no final do processo fermentativo (B) de destilarias de álcool na região Nordeste do Brasil (Retirado de Lucena *et al.*, 2010).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Geral**

Determinar o perfil fisiológico da linhagem industrial *L. vini* JP7.8.9 em meios de cultura sintéticos em condições de crescimento e de fermentação.

#### **3.2 Metas**

Meta 1: Determinar o perfil de assimilação e a cinética de crescimento da linhagem *L. vini* JP7.8 em meios MRS-específicos, variando a fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose, celobiose, maltose e lactose)

Meta 2: Determinar o perfil de assimilação e a cinética de crescimento da linhagem *L. vini* JP7.8 em meios MRS-específicos, variando a fonte de nitrogênio (citrato de amônio, sulfato de amônio, nitrato de sódio e glutamato)

Meta 3: Quantificar o rendimento fermentativo de *L. vini* JP7.8.9 no meio sintético MRS.

### **4. Referências Bibliográficas**

Ajay, P., Ramana, K.V. Isolation and preliminary characterization of a nonbacteriocin antimicrobial compound from *Weissella paramesenteroides* DFR-8 isolated from cucumber (*Cucumis sativus*). *Process Biochemistry*. **2009**, 44: 499 – 503.

Andrietta, M.G.S.; Andrietta, S.R.; Steckelberg, C.; Stupiello, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. *Internacional Sugar Journal*, Campinas. **2007**, n. 1299, 109: 195 – 200.

Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Campos, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: Congresso Nacional dos Técnicos Açucareiros do Brasil, 2, Anais. Piracicaba: STAB. **1981**, 2: 58 – 168.

Amorim, H.V.; Basso, L.C.; Lopes, M.L. Evolution of ethanol production in Brazil. In: *Distilled Spirits – Tradition and Innovation*. Nottingham, UK: Nottingham University Press. **2004**, 1: 143 – 148.

Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Ed 3. Salminen, S.; Von Wright, A.; Ouwehand, A.C. (eds) New York: Marcel Dekker. **2004**, p 1 – 66.

Basílio, A.C.M.; Araújo, P.R.L.; Morais, J.O.F.; Silva-Filho, E.A.; Morais Jr., M.A.; Simões, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology*. **2008**, 56: 322 – 326.

Basso, L.C.; Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Lopes, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*. **2008**, 8: 1155 – 1163.

Basso, T.O.; Gomes, F.S.; Lopes, M.L.; Amorim, H.V.; Eggleston, G.; Basso, L.C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2014**, 105:169–177.

Boulton, R.B.; Singleton, V.L.; Bisson, L.F.; Kunkee, R.E. Principles and practices of winemaking. **1996**. Chapman & Hall, New York.

Carr, F.J.; Chill, D.; Maida, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. **2002**, 28: 281 – 370.

Chang, I.S.; Kim, B.H.; Shin, P.K.; Lee, W.K. Bacterial contamination and its effect on ethanol fermentation. *Journal of Microbiology & Biotechnology*. **1995**. 5: 309 – 314.

Ciani, M; Maccarelli, F.; Fatichenti, F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2003**, 19: 419 – 422.

De Azeredo, L.A.; Gomes, E.A.; Mendonca-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *International Microbiology*. **1998**, 1: 205 – 208.

De Barros Pita, W.; Leite, F.C.B.; De Souza Liberal, A.T.; Simões, D.A.; De Moraes, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. Cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2011**, 100: 99 – 107.

De Barros Pita, W.; Tiukova, I.; Leite, F.C.B.; Passoth, V.; Simões, D.A.; De Moraes, M.A. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. *Yeast*. **2013**, 30 (3): 111 – 7.

De Oliva-Neto, P.; Yokoya F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **1994**, 10: 967 – 999.

De Souza, R.B.; Santos, B. M.; De Souza, R.F.R.; Da Silva, P.K.N.; Lucena, B.T.L.; Morais Jr., M.A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. **2012**, 39: 1645 – 1650.

Hammes, W.P.; Vogel, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood, B.J.B.; Holzappel, W.H. (Eds) London: Blackie Academic & Professional, **1995**. v. 2, pp 19 – 54.

Hammes, W.P.; Hertel, C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Dworking, M.; Falkow, S.; Rosemberg, E.; Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E. (Eds) New York: Springer, **2006**. v. 4, p 320 – 403.

Hammes W., Hertel C. Genus I. *Lactobacillus Beijerinck* 1901. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2 Ed. De-Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.; Ludwig, W.; Rainey, F. *et al.*, (Eds). Berlin: Springer; **2009**. p. 465 – 510.

Holzappel, W.H.; Wood, B.J.B. Introduction to the LAB. In: *Lactic Acid Bacteria: biodiversity and taxonomy*. Holzappel, W.H.; Wood, B.J.B. (Eds) Wiley-Blackwell, **2014**. p 1 – 12.

Ingledeu, W.M. The biochemistry of alcohol production. In: *The alcohol textbook*. Lyons, T.P.; Kelsall, D.R.; Murtagh, J.E. (Eds) Nottingham: Nottingham University Press, **1995**. p. 55 – 79.

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

Kandler, O.; Weiss, N. *Lactobacillus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E.; Holt, J. G. (Eds) Baltimore: Williams and Wilkins, **1986**. 2: 103 – 121.

König, H.; Fröhlich, J. Lactic Acid Bacteria. In: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine. König, H.; Uden, G.; Fröhlich, J. (Eds) Berlin Heidelberg: Springer. **2009**, pp. 3 – 29.

Leite, F.C.; Basso, T.O.; De Barros Pita, W.; Gombert, A.K.; Simões, D.A.; De Moraes-Jr M.A. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. FEMS Yeast Res. **2013**, 13(1): 34 – 43.

Liberal, A.T.S.; Basílio, A.C.M.; Brasileiro, B.T.R.V.; Silva-Filho, E.A.; Simões, D.A.; Moraes Jr., M. A. Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. Journal Applied Microbiology. **2007**, 102: 538 – 547.

Lucena, B.T.L.; Santos, B.M.; Moreira, J.L.S.; Moreira, A.P.B.; Nunes, A.C.; Azevedo V.; Miyoshi, A.; Thompson, F.L.; Moraes Jr., M.A. Diversity of Lactic Acid Bacteria of the bioethanol process. BMC Microbiology, **2010**. 10: 298.

Lucena, B.T.L., Silva, G.G.Z., Santos, B.M., Dias, G.M., Amaral, G.R.S., Moreira, A.P.B., Moraes Júnior, M.A., Dutilh, B.E., Edwards, R.A., Balbino, V.Q., Thompson, C.C., Thompson, F.L. Genome Sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus vini* Strains LMG 23202T and JP7.8.9. Journal of Bacteriology, **2012**, 194:3018

Muthaiyan, A.; Limayem, A.; Ricke, S.C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. Progress in Energy and Combustion Science. **2011**. 37(3): 351 – 370.

Narendranath, N.V.; Hynwa, S.H.; Thomas K.C.; Ingledew, W.M.; Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**, 63 (11): 4158 – 4163.

Narendranath, N.V.; Thomas K.C.; Ingledew, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **2001**, 26(3): 171 – 7.

Nobre, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. **2005**, 90p.

Parente, D.C.; Vidal, E.E.; Leite, F.C.B.; De Barros Pita, W.; De Moraes Jr., M.A. Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaça. *Yeast*. **2014**, 31(1): 77 – 87.

Passoth, V.; Blomqvist, J.; Schunürer, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. *Applied Environmental Microbiology*. **2007**, 73: 4354 – 4356.

Pereira, L.P.; Bassi, A.P.G.; Avansini, S.H.; Barbosa - Neto, A.G.; Brasileiro, B.T.R. V.; Ceccato-Antonini, S.R.; Moraes Jr., M. A. The Physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2011**, 101(3): 529 – 539.

Reid, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied Environmental Microbiology*. **1999**, 65: 3763 – 3766.

Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2005**,55 197 – 207.

Rodas, A.M., Chenoll, E., Macia, M.C., Ferrer, S. Pardo, I. Aznar, R. *Lactobacillus vini* *sp. nov.*, a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2006**,56: 513 – 517.

Santos, B.M. Identificação Molecular de bactérias Lácticas Presentes no Caldo de Cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. **2012**, 90p.

Salvetti, E.; Torriani, S.; Felis, G.E. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **2012**, 4: 217 – 226.

Schell, D.J.; Dowe, N.; Ibsen, K.N.; Riley, C.J.; Ruth, M.F.; Lumpkin, R.E. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresource Technology*. **2007**, 98: 2942 – 2948.

Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E. Molecular systematics of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*. **1983**, 37: 143 – 187.

Sekirov, I.; Russell, S.L.; Antunes, C.M.; Finlay, B.B. Gut Microbiota in Health Disease. *Physiological Reviews*. **2010**, 3: 859 – 904.

Serra, G.E.; Cereda, M.P.; Feres, R.J.F.; Bertozzo, M.T.; Vicente, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica “floculação do fermento”. *Brasil Açucareiro*. **1979**, 93: 26 – 31.

Sherata, A.M. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. *Applied Microbiology*. **1960**, 8: 73 – 75.

Silva Filho, E.A.; Santos, S.K.B.; Resende, A.M.; Morais, J.O.F.; Morais Jr., M.A.; Simões, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2005a**, 88: 13 – 23.

Silva Filho, E.A.; Meol, H.F.; Antunes, D.F.; Santos, S.K.B.; Resende, A.M.; Simões, D.A.; Morais Jr., M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.**2005b**, 32: 481 – 486.

Skinner, K.A.; Leathers, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.**2004**, 31: 401 – 408.

Slover, C.; Danziger, L. *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*.**2008**. 30: 23 – 27.

Smid, E.J.; Kleerebezem, M. Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annual Review Food Science Technology*.**2014**, 5: 313 – 26.

Sun, Z.; Yu, J.; Dan, T.; Zhang, W.; Zhang, H. Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: fundamental and practice*. Zhang, H.; Cai, Y. (Eds) Dordrecht: Springer Science. **2014**, p 1 – 101.

Von Wright, A.; Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria: an introduction. In: *Lactic Acid Bacteria – Microbiological and Functional Aspects* 4 Ed. Lahtinen, S.; Ouwehand, A.C.; Salminen, S.; Von Wright, A. (Eds) 4th. Boca Raton: CRC Press (Taylor & Francis Group). **2012**, 1 – 16.

Walker, G.M. Metals in Yeast Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology*.**2003**, 197 – 229.

Wang, Y.; Tashiro, Y.; Sonomoto, K. Fermentative production from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **2015**, 119 (1): 10 – 18.

Yokoya, F.; De Oliva-Neto, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*. **1991**, 22(1): 12 – 16.

## 5. ANEXO 1

### **Avaliação do potencial de assimilação açúcares da bactéria *Lactobacillus vini* a partir meios de cultivo sintéticos.**

Paula Kathanina Nogueira da Silva<sup>1</sup>, André Ribas de Miranda<sup>1</sup>, Brigida Thaís Luckwu de Lucena<sup>3</sup> & Marcos Antonio de Moraes Junior<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo Interdepartamental de Pesquisa em Engenharia Metabólica e <sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, PE, Brasil. <sup>3</sup> Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba.

## Resumo

A produção de etanol combustível em destilarias do nordeste brasileiro apresenta constantemente o seu rendimento em etanol comprometido pela presença de bactérias, como a *Lactobacillus vini*. Esta espécie foi recentemente identificada na produção de vinho e etanol, estando associada a presença de leveduras contaminantes, como a *Dekkera bruxellensis*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a assimilação de diversos açúcares presentes nos diferentes substratos industriais nos quais esta bactéria está presente. A linhagem industrial *L. vini* JP 7.8.9, isolada de destilarias do Nordeste brasileiro, foi utilizada como modelo de estudo. Os ensaios de assimilação foram realizados utilizando o kit API 50 CHL, o que resultou em um perfil de assimilação de açúcares muito semelhante ao da linhagem tipo. Entretanto, a variabilidade fenotípica intra-específica observada não permitiu a identificação de fatores que sugerissem adaptação a quaisquer dos tipos de substratos industriais, mas sugere a possibilidade de que estas variações sejam produto de uma diversidade genômica causada pela presença de elementos móveis identificados recentemente no seqüenciamento de seu genoma. Ensaios de crescimento em anaerobiose em que houve variação das fontes de carbono e de nitrogênio mostraram que celobiose é um dissacarídeo facilmente metabolizado por esta espécie, fato que deve estar associado à presença de vários genes que codificam a enzima  $\beta$ -glicosidase e de transportadores do tipo PTS-celobiose em seu genoma. O presente estudo abre, portanto, importante perspectiva para o início da elucidação das características bioquímicas desta bactéria, ainda pouco conhecido, o que permite compreender como este microrganismo consegue se manter no processo de produção de etanol como contaminante, bem como, abre a perspectiva do emprego de *L. vini* na produção de metabólitos de alto valor agregado, como o ácido láctico, possibilitando ainda o melhoramento de suas habilidades industriais.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus vini*, assimilação de açúcar, metabolismo, celobiose, citrato, fermentação, lactato

## Introdução

No Brasil, a cana-de-açúcar é processada na grande maioria das destilarias de etanol sem prévio tratamento (Andrietta *et al.*, 2007). Estas condições assépticas dos substratos do processo (caldo de cana e/ou melaço) possibilitam uma série de contaminações por microrganismos indesejáveis, podendo ameaçar a estabilidade da população de *Saccharomyces cerevisiae* do processo e interferir no rendimento e produtividade da fermentação, gerando significativas quedas na produção de etanol (Skinner e Leathers 2004; Andrietta *et al.*, 2007; Lucena *et al.*, 2010; Beckner *et al.*, 2011). As bactérias ácido lácticas (LAB) são os contaminantes bacterianos mais comumente encontrados na de produção de etanol (Beckner *et al.*, 2011). Dentre estas, o gênero *Lactobacillus sp.* geralmente é predominante (Lucena *et al.*, 2010; Beckner *et al.*, 2011), e isso se deve por estarem bem adaptados para a sobrevivência sob alta tolerância a etanol, baixo pH e condições de baixa concentração de oxigênio, encontrados durante a fermentação industrial (Beckner *et al.*, 2011).

Dentre a população de bactérias consideradas contaminantes do processo industrial, a espécie *Lactobacillus vini* tem sido frequentemente encontrada nas usinas do nordeste brasileiro (Lucena *et al.*, 2010). Essa espécie foi descrita recentemente, tendo sido encontrada em vinícolas da Espanha (Rodas *et al.*, 2005) e em destilarias de produção de etanol na Suécia (Passoth *et al.*, 2007). Esta é uma bactéria gram-positiva e de acordo com a linhagem descrita é homofermentativa para pentoses e tem a capacidade de fermentar diversos açúcares como: L-arabinose, D-glicose, D-frutose, D-manose, Celobiose, Sacarose, Maltose, Trealose e outros (Rodas *et al.*, 2006). As linhagens *Lactobacillus vini* LMG 23202 (Rodas *et al.* 2006) e a JP7.8.9 (Lucena *et al.*, 2010) foram sequenciadas e as análises genéticas identificaram a presença de genes envolvidos no metabolismo da celobiose, genes que codificam para a  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) (Lucena *et al.*, 2012). Isto abre uma importante perspectiva para o uso industrial desta bactéria que já está plenamente adaptada àquele ambiente.

Portanto, compreender a fisiologia, pouco conhecida de *L. vini* JP7.8.9, permite a elucidação das características bioquímicas deste microrganismo. Esse estudo abre a

perspectiva do emprego de *L. vini* na produção de metabólitos de alto valor agregado, como o ácido láctico, investigando quais os nutrientes são preferivelmente assimilados.

## **Material e Métodos**

### **Microrganismos e condições de crescimento**

As linhagens industriais *Lactobacillus plantarum* 6A, isolada da destilaria Miriri, Santa Rita, PB (dados não publicados) e *L. vini* JP7.8.9 isolada da destilaria Japungú, Santa Rita, PB (Lucena *et al.*, 2010) foram cultivadas em meio MRS líquido (10 g/l peptona, 10g/l extrato de carne, 10 g/l extrato de levedura, 20 g/l glicose, 5 g/l acetato de sódio, 1 g/l Tween 80, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g/l Citrato de amônio, 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g/l MnSO<sub>4</sub> e pH ajustado para 6.2 a 25 °C), da Himedia Laboratórios (Mumbai, Índia) e mantidas a 37 °C por 24 horas, em condições estáticas (De Souza *et al.*, 2012).

### **Teste API 50 CHL**

A capacidade de assimilação dos carboidratos foi determinada utilizando o teste API 50 CHL, um sistema normalizado composto por 50 testes bioquímicos para o estudo do metabolismo de carboidratos por microrganismos (Bio Merieux, França), que contém meios específicos para a identificação de espécies de *Lactobacillus* e gêneros relacionados. O teste foi preparado de acordo com as instruções do fabricante (Biomerieux, Marcy l'Etoile, França). O sistema foi então incubado a uma temperatura de 37°C durante 48h em anaerobiose e as amostras foram analisadas com relação à assimilação dos carboidratos de acordo com a mudança de cor, gerada pela diferença do pH do meio. As espécies foram identificadas através da avaliação com software de identificação apiweb<sup>TM</sup>.

### **Análise de assimilação dos açúcares e diferentes fontes de carbono e nitrogênio, e velocidade de crescimento celular**

Para os ensaios de variação de fonte de carbono e nitrogênio, o meio MRS foi reproduzido em laboratório a partir de seus componentes, segundo o fabricante (Himedia Laboratories), alterando-se os tipos de açúcar a serem testados (glicose, frutose, sacarose, celobiose, maltose e lactose) na concentração de 20 g/l. Três fontes de nitrogênio foram testadas na composição, além do citrato de amônio, que já faz parte da composição do meio comercial: sulfato de amônio, nitrato de sódio e glutamato de sódio na concentração de 2 g/l. Para os ensaios de assimilação e cinética de crescimento celular, as células pré-cultivadas em meio MRS e utilizadas para inocular os meios MRS-específicos para concentração inicial de 0,1 DO<sub>600nm</sub> em volume total de 1 mL em placas do tipo FlowerPlates (mp2Lab, Alemanha). As placas foram seladas com filme permeável e as células foram cultivadas em microfermentador BiolectorNA® (m2p-labs, Alemanha) a 37°C com umidade constante de 85% e velocidade de 800 rpm (equivalente a 250 rpm de incubadoras tipo shaker orbital). Os cultivos foram realizados em anaerobiose com injeção de nitrogênio ultrapuro a 0,5 vvm. As leituras em laser de variação de sólidos em suspensão foram realizadas a cada 20 minutos e os valores de *light scattering* foram transformados em densidade óptica a partir do fator de calibração definido no laboratório para suspensão de células de *L. vini*.

### **Ensaio de fermentação**

As células de bactérias cultivadas em meio MRS foram coletadas e re-suspensas para concentração celular inicial de 10% (m/v) nos diferentes meios MRS contendo glicose ou sacarose. As fermentações foram conduzidas em sistema de batelada simples sem agitação durante 8 horas à 33°C (De Barros Pita *et al.*, 2011, Pereira *et al.*, 2011, De Souza *et al.*, 2012). As amostras coletadas foram centrifugadas e o sobrenadante reservado para análise de consumo dos açúcares e produção de metabólitos conforme protocolo descrito abaixo. Todas as fermentações foram realizadas em triplicatas, e os resultados obtidos foram representados como médias simples ( $\pm$  desvio padrão).

## **Análise metabólica**

As amostras coletadas ao longo das incubações foram centrifugadas para coleta do sobrenadante para determinação da concentração do açúcar residual e dos metabólitos produzidos, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em equipamento Agilent Technologies 1200 Series com a coluna modelo HPX87H (BioRad) em fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mM, a 45°C. A identificação dos metabólitos foi feita por comparação dos tempos de retenção com soluções-padrão e a concentração de cada metabólito foi determinada por integração de picos do cromatograma e relação da área de cada pico com o fator de calibração de cada solução-padrão, através da metodologia de Zhao *et al* (2009) adaptada por De Souza *et al.*, 2012.

## **Resultados e Discussões**

### **Teste API 50 CHL**

O teste API 50 CHL (bioMérieux) é fundamentalmente utilizado para identificação de espécies de bactérias lácticas a partir de um painel com 49 diferentes fontes de carboidratos. Esse teste foi realizado sob as condições de 37°C durante 48 horas gerando um perfil de assimilação de carbonos pela linhagem industrial *L. vini* JP7.8.9 (Tabela 1).

O perfil dos açúcares fermentáveis pela linhagem de *L. vini* JP7.8.9, gerado através do teste API 50 CHL (Tabela 1), apresentou diferenças em cerca de 22% das 49 fontes de carbono testadas, em comparação com a linhagem tipo, Mont<sup>4</sup> (Rodas *et al.*, 2006). Essas diferenças foram encontradas na assimilação por *L. vini* JP7.8.9 de galactose, dulcitol, inositol, manitol,  $\alpha$ -metil manosido, arbutina, melibiose, melezitose, D-rafinoose, turanose e gluconato. Comparando outras linhagens de *L. vini* também é possível observar diferenças no perfil de assimilação. Por exemplo, a galactose e o manosido que não são assimilados pela linhagem Mont<sup>4</sup> são assimilados pela linhagem 116, enquanto a linhagem 154 é capaz de assimilar o manosido. A arbutina é assimilada tanto pela linhagem industrial (JP7.8.9) quanto pela linhagem 154, enquanto que a ribose é assimilada pelas linhagens JP7.8.9 e Mont<sup>4</sup> e as linhagens 116 e 154 não são capazes de assimilar (Rodas

*et al.*, 2006). A linhagem industrial *Lactobacillus plantarum* 6A também foi submetida ao API 50 CHL (Tabela 1). Essa linhagem, assim como a *L. vini* JP7.8.9, foi isolada em uma destilaria de álcool carburante no nordeste brasileiro. Em comparação com a linhagem tipo de *L. plantarum* foi observado apenas uma diferença na assimilação de sorbitol, na qual a linhagem industrial se mostrou capaz de assimilar enquanto a linhagem tipo não assimila este composto.

Essas diferenças observadas no resultado do API 50 CHL entre indivíduos de uma mesma espécie podem ser explicadas pela grande heterogeneidade existente no grupo dos *Lactobacillus*, que engloba espécies com grande variedade fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas (Axelsson, 2004). Esta heterogeneidade é refletida, por exemplo, na variedade do conteúdo GC, que pode apresentar variações entre 32 e 35 mol %, duas vezes mais do que o normalmente aceitável para um único gênero (Schleifer e Stackebrandt, 1983). A adaptação ao ambiente também pode explicar estas diferenças. Estudos que compararam os genomas de linhagens de *L. lactis* provenientes de dois ambientes que diferem bastante em sua composição química, a indústria de laticínios e brotos de feijão, demonstraram que a linhagem proveniente do ambiente vegetal apresenta muitas características adicionais relacionadas com a adaptação de crescimento para substratos derivados da parede celular das plantas, possuindo um maior número de genes envolvidos no transporte e metabolismo de carboidratos, o que resultou em um aumento na capacidade de assimilação de diversos açúcares (Siezen *et al.*, 2008). No caso de *L. vini*, nota-se a grande variedade existente entre as três linhagens comparadas, a linhagem de etanol combustível e as duas linhagens de vinho. Mesmo entre as duas linhagens isoladas de vinho é possível notar essa variabilidade fenotípica. Entretanto, os dados de assimilação pelo teste API50 CHL não revelaram traços específicos para os dois substratos, mostrando que há um componente gerador de variabilidade que é independente do substrato. É possível que isto esteja relacionado à presença de elementos móveis, tais como integrons, transposons ou fagos. Neste sentido, verifica-se a presença de elementos pro-fagos no genoma de *L. vini* (Lucena *et al.* 2012). A inserção e excisão desses elementos poderiam gerar a variabilidade genética que se reflete na variabilidade fenotípica observada.

**Tabela 1.** Comparação fenotípica entre espécies de *Lactobacillus* com relação a assimilação de diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	Linhagem de <i>Lactobacillus</i>					
	<i>L. vini</i> JP 7.8.9	<i>L. vini</i> Mont 4†*	<i>L. vini</i> 116*	<i>L. vini</i> 154*	<i>L. plantarum</i> †**	<i>L. plantarum</i> 6A
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	-	-	+	+
D-Xilose	-	-	-	-	-	-
L-Xilose	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-
β-Metil Xilosido	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	-	+	-	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	+	+	+
D-Manose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	-	-	-	-	-
Inositol	+	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	-	-	-	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	+	-
α-Metil-Manosido	+	-	+	+	+	+
Metil α-D-Glicosido	-	-	-	-	-	-
N-Acetil Glicosamina	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	-	-	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+

Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	-	+	+
Melibiose	+	-	-	-	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-
Melezitose	+	-	-	-	+	+
D-Rafinose	+	-	-	-	+	+
Amido	-	-	-	-	-	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	-	-	-	+	+
D-Lixose	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	+	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-
Gluconato	+	-	-	-	+	+
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-

+, a linhagem consegue assimilar; -, a linhagem não foi capaz de assimilar.

† Linhagem tipo

\* Rodas et al 2006

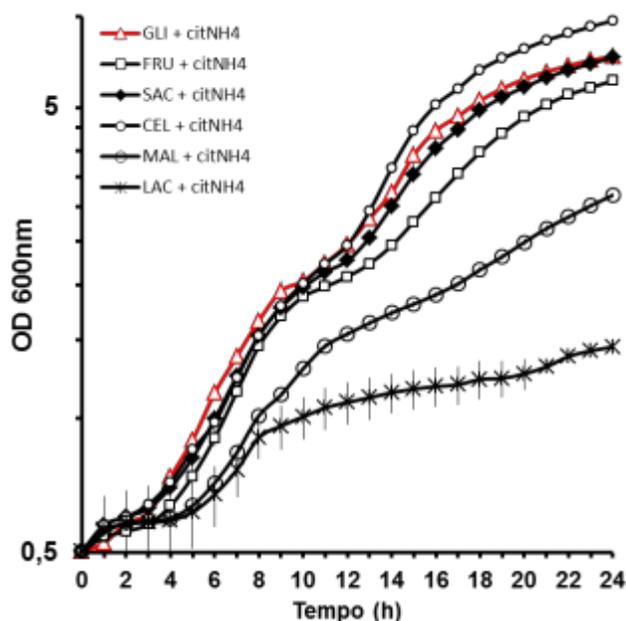
\*\* *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (ATCC® 14917™) (Manual API Teste 50 CHL, Biomerieux, Marcy l'Etoile, França)

## Crescimento celular em diferentes fontes de carbono

Para a avaliação da cinética de crescimento, as células de *L. vini* JP7.8.9 foram inoculadas em meio MRS reconstituído variando a fonte de carbono. Esses experimentos foram realizados em anaerobiose, já que o crescimento desta bactéria em aerobiose é muito lento (dado não mostrado). Foram avaliados os açúcares presentes no mosto de fermentação de cana de açúcar (sacarose e seus produtos de hidrólise glicose e frutose) e dissacarídeos de importância industrial (celobiose da hidrólise da celulose, lactose dos produtos lácteos e maltose do mosto de cevada). O meio com glicose foi utilizado como referência.

No intervalo de 24 horas foi observado um baixo crescimento da bactéria no meio contendo lactose como fonte de carbono (Figura 1). O resultado mostra uma extensa fase lag de adaptação ao meio seguida de uma curta fase exponencial de crescimento e uma fase de crescimento lento. A lactose é um dissacarídeo formado por uma glicose e uma galactose. Sua metabolização é iniciada com a quebra da ligação  $\beta$ -1,4 pela enzima  $\beta$ -galactosidase. Os monômeros resultantes são degradados, a glicose diretamente pela via glicolítica e a galactose sendo metabolizada pela via da tagaturose 6-fosfato, ou alternativamente pela via de Leloir (Monedero *et al* 2007). Os dados da Tabela 1 mostram que a linhagem JP7.8.9 não apresenta deficiência na assimilação de nenhum desses dois monômeros. Portanto, pode-se presumir que o acúmulo de glicose resultante da hidrólise da lactose deva exercer efeito de repressão catabólica sobre o operon *lac* produzido pela ligação da proteína repressora semelhante a CcpA/P-Ser-HPr como acontece em *L. casei* (Monedero *et al* 2007). A maltose foi capaz de promover o crescimento celular lento, também após uma extensa fase lag de adaptação (Figura 1). Este é um dissacarídeo com duas moléculas de glicose em ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica. Sua hidrólise gera apenas glicose, o que poderia gerar um efeito de repressão catabólica já que o operon *mal* também é reprimido por CcpA/P-Ser-HPr (Monedero *et al* 2007). É possível também que no meio com maltose, esse baixo crescimento, provavelmente, é devido a necessidade do gasto de energia (ATP) para o transporte desse açúcar para o interior da célula permeases dependentes de ATP, como ocorre em *Lactococcus lactis* (Law *et al.*, 1995). Já a sacarose e a celobiose permitiram crescimento celular com a mesma eficiência da glicose e da

frutose (Figura 1; tabela 2). Sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose com ligação  $\alpha$ -1,2-frutofuranosídeo, enquanto que celobiose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose unidas por ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica. Seguindo a lógica acima, é possível sugerir que não há em *L. vini* o mecanismo de repressão catabólica sobre o metabolismo tanto da sacarose como da celobiose.



**Figura 1.** Cinética do crescimento anaeróbico a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos com diferentes fontes de carbono. Gli: glicose; Fru: frutose; Sac: sacarose; Cel: celobiose; Mal: maltose; Lac: lactose. O meio MRS reconstituído continha citrato de amônio como fonte de nitrogênio.

Até o momento, a caracterização do transporte de glicose em *L. vini* não foi reportada, mas o transporte de glicose em *Lactococcus lactis*, uma bactéria filogeneticamente relacionada com *L. vini*, foi recentemente elucidado: *L. lactis* possui dois sistemas de transporte do tipo PTS (manose-PTS, PTSMan e celobiose-PTS, PTSCel) e um sistema de transporte ativo secundário (GlcU) (Castro *et al.*, 2009). A bactéria *L. vini* JP7.8.9 contém no seu genoma operons do metabolismo de celobiose e grande quantidade de genes que codificam para  $\beta$ -glicosidasas, além de sistemas específicos celobiose-PTS (Lucena *et al.*, 2012), o que deve propiciar o melhor crescimento de *L. vini* JP7.8.9 em meio contendo celobiose. O sistema de transporte PTS é tido como o principal translocador de glicose em muitas bactérias do filo *Firmicutes* ao qual pertence à família

*Lactobacillaceae* (Jahreis *et al.*, 2008). Assim sendo, é válido assumir que em *L. vini* a celobiose é transportada e concomitantemente fosforilada pelo sistema celobiose-PTS.

### **Crescimento celular em diferentes fontes de nitrogênio**

A cinética do crescimento anaeróbico de *L. vini* em diferentes fontes de carbono foi também avaliada em quatro tipos de fontes de nitrogênio: nitrogênio amoniacal suprido na forma dos sais de citrato (forma base do meio MRS comercial) ou de sulfato (forma base da maioria dos meios de cultura mineral de laboratório), nitrato como segunda fonte mineral de nitrogênio encontrado no caldo de cana, e glutamato como fonte orgânica de nitrogênio presente em outros substratos industriais. De forma geral, o crescimento bacteriano foi menor nas três últimas condições (Figura 2) do que foi observado quando o meio continha citrato de amônio (Figura 1). Portanto, há indicação de que o amônio na forma de sal de citrato se constitui numa fonte de nitrogênio mais assimilável pelas células. Isto não tem relação com o possível uso do citrato como fonte secundária de carbono, já que o crescimento celular não é observado quando este é oferecido como fonte primária, em meio contendo o sal, mas sem açúcar (dados não mostrados).

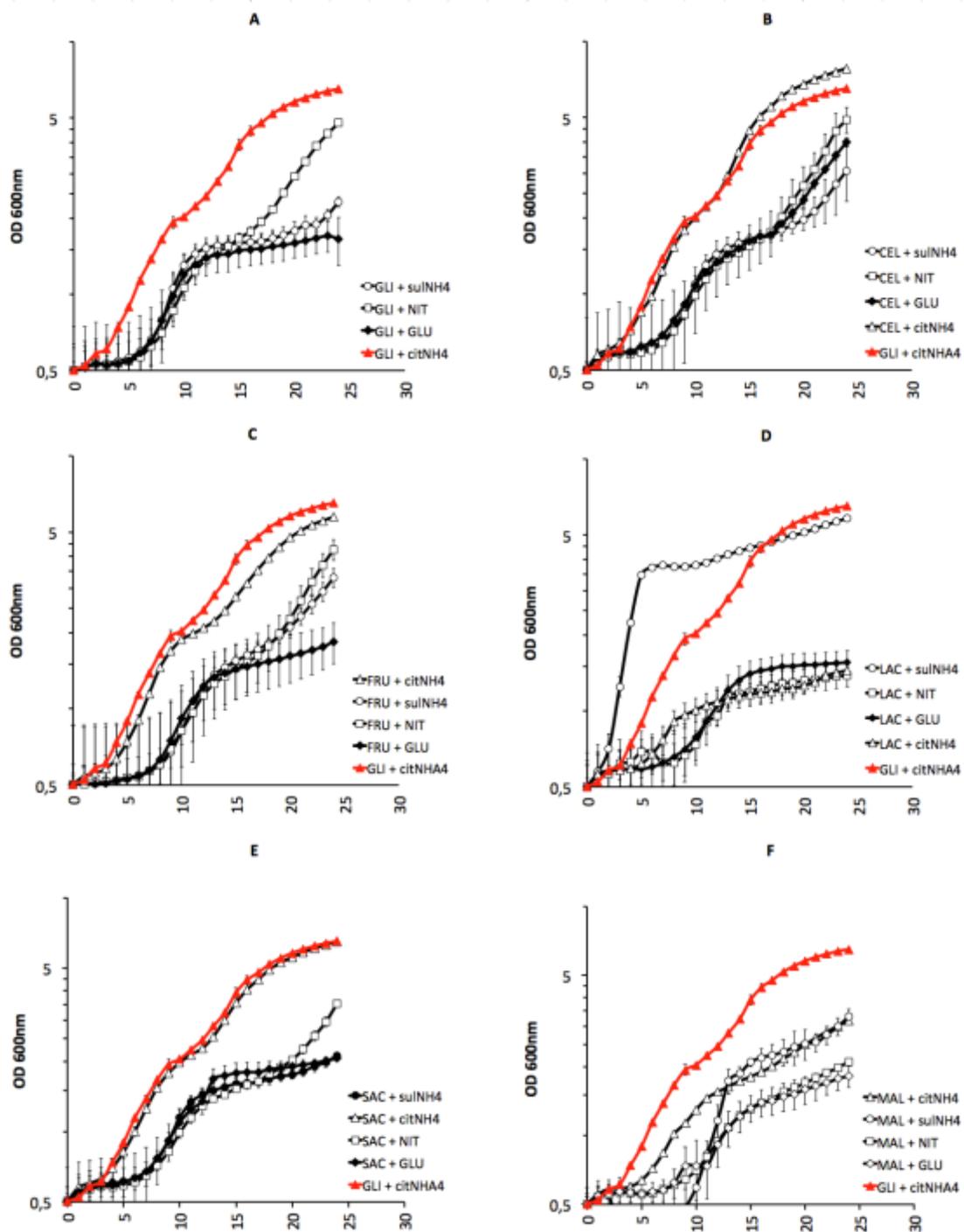
A maior diferença entre o meio contendo citrato de amônio e aqueles com outras fontes de nitrogênio é a menor fase lag apresentada no primeiro meio independente do tipo de açúcar utilizado. Em muitas espécies de LAB, o citrato é metabolizado concomitantemente com os açúcares fermentáveis (Smid e Kleerebezem, 2014). O citrato geralmente é usado como aceptor de elétrons durante o co-metabolismo de açúcares fermentáveis. Entretanto, ele não é precisamente um aceptor direto de elétrons, mas sim o precursor de uma molécula com esse potencial. Por exemplo, esta molécula por sofrer duas reações de descarboxilação para gerar oxalacetato e depois piruvato, e esta última atuar como receptor de elétron na produção de lactato (Zaunmuller *et al.*, 2006). Com isto, o balanço energético é mantido pela reoxidação do NADH gerado durante a assimilação dos açúcares. Em *L. lactis*, a utilização de citrato resulta em uma vantagem de crescimento que é evidente quando o meio possui valores de pH baixos (García-Quintáns *et al.*, 1998; Magni *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2004). Nestas condições, a presença de citrato proporciona uma utilização eficiente de glicose e também auxilia para que as células

possam resistir às elevadas concentrações de lactato gerado como um subproduto metabólico. Este efeito de desintoxicação tem sido atribuído à eficiência do sistema antiporte citrato/lactato catalisada por CITP (Magni *et al.*, 1999), o que aumenta a sua atividade durante o co-metabolismo de glicose e de citrato (García-Quintáns *et al.*, 1998; Magni *et al.*, 1999). Isso pode justificar o melhor desempenho de *L. vini* no meio com citrato de amônio, uma vez que *L. lactis* e *L. vini* são filogeneticamente próximas.

Algumas culturas de lactobacilos podem reduzir nitrato a nitrito e nitrito para óxido nítrico em anaerobiose (Wolf & Hammes, 1988), usando-os como fonte de energia ou aceptores de elétrons (Klander & Weiss, 1986). Algumas culturas de *L. plantarum* são hábeis para reduzir nitrato sob condição limitada de glicose no meio e pH com valor igual ou maior que 6,0 (Klander & Weiss, 1986). Embora tenha havido crescimento de *L. vini* JP7.8.9 no meio contendo nitrato de sódio, não foi possível se identificar no seu genoma os genes que codificam as proteínas da via de assimilação de nitrato, como a enzima nitrato redutase (Lucena *et al.*, 2010).

Nesse contexto vale destacar que o crescimento celular em meio contendo lactose foi muito mais pronunciado quando se utilizou sulfato de amônio (Figura 2a), sendo bastante superior àquele observado quando o amônio foi utilizado na forma de sal de citrato (Figura 1). Assumindo que a glicose liberada pela hidrólise da lactose exerça um efeito de repressão catabólica sobre o operon *lac*, como descrito acima, pode-se supor que essa repressão deve ser potencializada na medida em que o balanço energético da célula seja mantido pela presença do citrato no meio.

Ensaio de fermentação foram realizados em meios contendo citrato de amônio e glicose ou sacarose na concentração de 12% (m/v) cada (Figura 3). Ao longo de oito horas de fermentação a velocidade média de consumo de glicose ( $-q_S$ ) foi calculada em  $-3,3 \text{ g h}^{-1}$  que resultou na produção de lactato como único metabólito de fermentação (Figura 3a). De acordo com Sun *et al.* (2004) esta bactéria pode ser classificada como homofermentadora obrigatória para glicose, o que corrobora com a classificação proposta por Rodas *et al.* (2006) que descreveu a espécie como homofermentadora para pentoses e hexoses, produzindo exclusivamente o lactato como produto final.

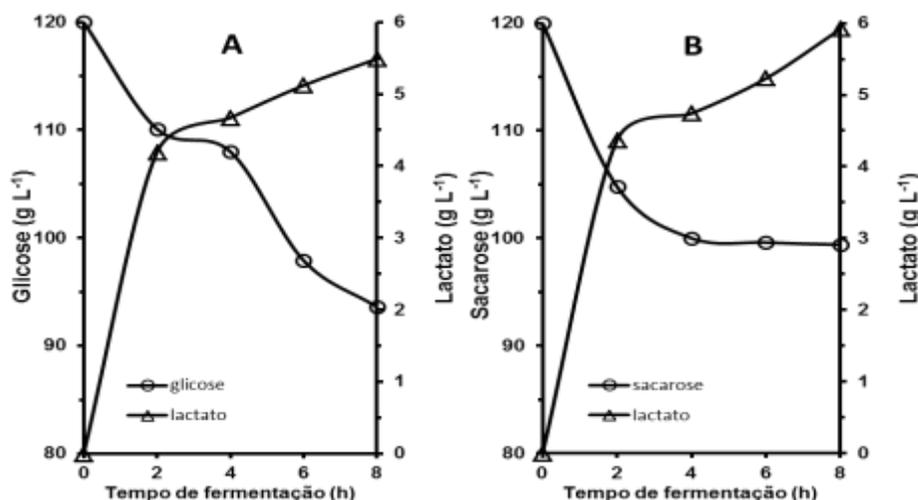


**Figura 2.** Cinética do crescimento anaeróbico a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos com diferentes fontes de carbono Gli: glicose (A); Cel: celobiose (B); Fru: frutose (C); Lac: lactose (D); Sac: sacarose (E); Mal: maltose (F), contendo citrato de amônio, sulfato de amônio, nitrato de sódio ou glutamato como fonte de nitrogênio. O meio contendo glicose e citrato de amônio foi usado como referência.

## Ensaio de fermentação

Ensaio de fermentação foram realizados em meios contendo citrato de amônio (2 g/l) e glicose ou sacarose na concentração de 12% (m/v) cada (Figura 3). Ao longo de oito horas de fermentação a velocidade média de consumo de glicose ( $-q_S$ ) foi calculada em  $3,3 \text{ g h}^{-1}$  que resultou na produção de lactato como único metabólito de fermentação (Figura 3a). De acordo com Sun *et al.* (2004) esta bactéria pode ser classificada como homofermentadora obrigatória para glicose, o que corrobora com a classificação proposta por Rodas *et al.* (2006) que descreveu a espécie como homofermentadora para pentoses e hexoses, produzindo exclusivamente o lactato como produto final.

Entretanto, a produção de lactato não foi uniforme ao longo da cinética de fermentação, apresentando uma elevada produtividade de  $2,1 \text{ g h}^{-1}$  nas primeiras duas horas. Nesse ponto o rendimento foi calculado em  $0,42 \text{ g g}^{-1}$ . Em seguida, observou-se uma menor produtividade e um baixo rendimento na faixa de  $0,28 \text{ g h}^{-1}$  e  $0,078 \text{ g g}^{-1}$ , respectivamente (Fig 3A). No final do período de fermentação o rendimento de produção de lactato foi calculado em  $0,21 \text{ g g}^{-1}$  na base da glicose consumida. Já na fermentação com sacarose como fonte de carbono o rendimento foi de  $0,29 \text{ g g}^{-1}$  (Fig 3B). De forma geral, a fermentação com glicose e sacarose apresentam uma cinética bastante similar, contudo, esse aumento do rendimento em lactato na presença de sacarose precisa ser melhor investigado.



**Figura 3.** Cinética da fermentação de glicose (A) e de sacarose (B) pelas células de *L. vini* JP7.8.9 em meio MRS reconstituído contendo citrato de amônio.

## Conclusão

A bactéria industrial *Lactobacillus vini* JP7.8.9 apresenta particularidades no perfil de assimilação de açúcares em relação a outras linhagens desta espécie isoladas da fermentação de vinho, embora este perfil não possa ser relacionado ao meio industrial da qual essas linhagens foram isoladas. Uma característica interessante é o fato de esta bactéria ser capaz de assimilar celobiose com muita eficiência em anaerobiose, como se pode observar no perfil de crescimento celular. Isto pode indicar um bom potencial desta bactéria de produzir produtos de interesse comercial a partir de hidrolisados de celulose. Como o metabolismo desta espécie foi classificado como homofermentativo, a produção de etanol deve ser descartada. Entretanto, pode-se pensar no aprimoramento da produção de lactato ou mesmo na produção da própria biomassa de células para uso como probióticos. Um fato importante a ser explorado é o efeito do citrato sobre o metabolismo celular, notadamente sobre a eficiência de transporte e assimilação de açúcares, fatores importantes para o aprimoramento do uso deste microrganismo em processos industriais.

## Referencias Bibliográficas

Andrietta, M.G.S.; Andrietta, S.R.; Steckelberg, C.; Stupiello, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. *Internacional Sugar Journal*. **2007**, 109 (1299): 195 – 200.

Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Ed 3. Salminen, S.; Von Wright, A.; Ouwehand, A.C. (eds) New York: Marcel Dekker. **2004**, p 1 – 66.

Beckner, M.; Ivey, M.L.; Phister, T.G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*. **2011**,53: 387 – 394.

Castro, R.; Neves, A.R.; Fonseca, L.L.; Pool, W.A.; Kok, J.; Kuipers, O.P.; Santos, H. Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*:mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. *Molecular Microbiology*. **2009**, 71: 795–806

De Barros Pita, W.; Leite, F.C.B.; De Souza Liberal, A.T.; Simões, D.A.; De Morais, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. Cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2011**, 100: 99 – 107.

De Souza, R.B.; Santos, B.M.; De Souza, R.F.R.; Da Silva, P.K.N.; Lucena, B.T.L.; Morais Jr., M. A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. **2012**, 39 (11): 1645 – 650 .

García-Quintáns, N.; Magni, C.; de Mendoza, D.; López, P. The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis is induced by acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*.**1998**, 64: 850 – 857.

Jahreis, K.; Pimentel-Schmitt, E.F.; Brückner, R.; Titgemeyer, F. Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiological Review*. **2008**, 32: 891-907.

Kandler, O.; Weiss, N. *Lactobacillus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E.; Holt, J. G. (Eds) Baltimore: Williams and Wilkins, **1986**. 2: 103 – 121

Law, J.; Buist, G.; Haandrikman, A.; Kok, J.; Venema, G.; Leenhouts K. A systems to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targets genes. *Journal of Bacteriology*. **1995**, 177: 7011 – 7018.

Lucena, B.T.L.; Santos, B.M.; Moreira, J.L.S.; Moreira, A.P.B.; Nunes, A.C.; Azevedo V.; Miyoshi, A.; Thompson, F.L.; Morais Jr., M.A. Diversity of Lactic Acid Bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, **2010**. 10: 298.

Lucena, B.T.L.; Silva, G.G.Z.; Santos, B.M.; Dias, G.M.; Amaral, G.R.S.; Moreira, A.P.B. Morais Jr. M. A.; Dutilh, B.E.; Edwards, R.A.; Balbino, V.; Thompson, C.C.; Thompson, F.L. Genome sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus vini* Strains LMG 23202T and JP7.8.9. *Journal of Bacteriology*. **2012**, 194: 3018 – 3018.

Magni, C.; de Mendoza, D.; Konings, W. N.; Lolkema, J. S. Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: Resistance against lactate toxicity at low pH. *Journal of Bacteriology*. **1999**, 181: 1451 – 1457.

Martin, M.G.; Sender, P.D.; Peiru, S.; de Mendoza, D.; Magni, C. Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis CRL264. *Journal of Bacteriology*. **2004**, 186: 5649 – 5660.

Monedero, V.; Maze, A.; Boël, G.; Zúñiga, M.; Beaufile, S.; Hartke, A.; Deutscher, J. The Phosphotransferase System of *Lactobacillus casei*: Regulation of Carbon Metabolism

and Connection to Cold Shock Response. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **2007**, 12: 20-32.

Passoth, V.; Blomqvist, J.; Schunürer, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. *Applied Environmental Microbiology*. **2007**, 73: 4354 – 4356.

Pereira, L.P.; Bassi, A.P.G.; Avansini, S.H.; Barbosa - Neto, A.G.; Brasileiro, B.T.R. V.; Ceccato-Antonini, S.R.; Morais Jr., M. A. The Physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2011**, 101(3): 529 – 539.

Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2005**, 55: 197 – 207.

Rodas, A.M., Chenoll, E., Macia, M. C., Ferrer, S. Pardo, I. Aznar, R. *Lactobacillus vini* *sp. nov.*, a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2006**, 56: 513 – 517.

Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E. Molecular systematics of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*. **1983**, 37: 143 – 187.

Skinner KA, Leathers TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **2004**, 31: 401 – 408.

Siezen, R.J.; Starrenburg, M.J.; Boekhorst, J.; Renckens, B.; Molenaar, D.; van Hylckama Vlieg, J.E. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Applied and Environmental Microbiology*. **2008**, 74 (2): 424 – 436.

Smid, E.J.; Kleerebezem, M. Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annual Review Food Science Technology*.**2014**, 5: 313 – 26.

Wolf, G.; Hammes, W.P. Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archives of Microbiology*.**1988**, 149: 220 – 224.

Zaunmüller, T.; Eichert, M.; Richter, H., and Uden, G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology Biotechnology*.**2006**, 72: 421–429.

Zhao, X. Q.; Xue, C.; Ge, X. M.; Yuan, W. J.; Wang, J. Y.; Bai, F. W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*. **2009**, 139: 55–60.