

Produção de *Lactobacillus plantarum* em Melaço de Cana-de-açúcar

Valdemar P. Feltrin², Ernani S. Sant'Anna^{1*}, Anna C. S. Porto¹ and Regina C. O. Torres¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos UFSC/CCA/CAL Av. Admar Gonzaga, 1346 - Itacorubi - 88034-001 Florianópolis, SC. ²Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná – CEFET, Medianeira, PR – Brasil.

ABSTRACT

Comparative studies of *Lactobacillus plantarum* were carried out in MRS broth (control) and in 3% (w/v) sugar cane blackstrap molasses enriched as follows: 0.5% yeast extract, 0.5% ammonium citrate and 0.5% sodium acetate (Medium 1) and 0.5% yeast extract, 0.5% ammonium citrate, 0.5% sodium acetate, 0.5% ammonium phosphate, 0.2% ammonium citrate, 0.1% Tween 80 and 0.005% manganese sulphate (Medium 2). The experiment, was carried out at a 5 L fermentor, with 3.5 L as working volume. At the end of the fermentation period MRS presented the highest viable cells production (28.68 log CFU/mL) while in Medium 2 it was 25.80 and in Medium 1 19.36 log CFU/mL. Biomass productivity was 0.0865 g.L⁻¹.h for MRS (control), 0.0768 and 0.0507 g.L⁻¹.h for Medium 2 and Medium 1, respectively. In Medium 1 total available sugar consume was only 60.11% while in MRS and Medium 2 it was 87.21% and 83.80%, respectively.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, fermentation, molasses.

INTRODUCTION

Bactérias ácido lácticas pertencentes à família Lactobacillaceae (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) exercem um papel importante na fabricação e conservação de alimentos fermentados. Muitos desses microrganismos são usados comercialmente para a produção de leite fermentado, iogurte, produtos cárneos e vegetais (Diez Fernandes, 1983).

Bactérias ácido lácticas podem ser isoladas de produtos lácteos, cárneos, frutas e vegetais. São usadas no processamento de muitas matérias-primas para produzir alimentos com aromas melhorados e aumentar as suas propriedades profiláticas e terapêuticas. Além disso, as bactérias ácido lácticas são conhecidas pelas propriedades antibacterianas, atribuídas aos produtos finais de seu metabolismo, tais como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, componentes peptídicos e bacteriocinas (Sarkar & Banerjee, 1996).

Lactobacillus plantarum é um microrganismo encontrado em silagens e em alguns produtos alimentícios, geralmente são homofermentativos e convertem mais de 80% dos açúcares fermentescíveis à lactato. A produção rápida de ácido láctico é uma característica marcante desse microrganismo (McFall & Monteville, 1989).

O melaço de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentescíveis e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio, sendo considerado um bom substrato para o cultivo de bactérias ácido lácticas (Delgado, 1975).

Para o desenvolvimento ou crescimento de qualquer tipo de microrganismo é preciso que o substrato preencha as necessidades nutricionais do mesmo e que seja economicamente viável. O melaço de cana-de-açúcar, que é um subproduto da indústria de açúcar, possui na sua composição uma grande quantidade de açúcares fermentescíveis e é considerado um resíduo de fácil manipulação, baixo custo, com grande

* Autor para correspondência

potencial e muitas aplicações a nível industrial (Lima, 1987).

Em virtude da sua composição, o melão é utilizado fundamentalmente como fonte de carbono e energia, sendo necessário suplementá-lo com nitrogênio e alguns minerais, especialmente fósforo e magnésio (Diez & Yokoya, 1996).

O presente trabalho teve por objetivo elaborar um meio de cultura usando como substrato principal o melão de cana-de-açúcar, enriquecido para suprir as necessidades nutricionais de *Lactobacillus plantarum*, visando a produção de biomassa e de células viáveis para utilização em processos fermentativos alimentares.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo: *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) cedido por Laboratories Christian Hansen. A cultura liofilizada foi ativada em 10 mL de solução de glicose a 1,5%, incubada a 35°C por 4 horas e ressuspensa em 10 mL de caldo MRS (Man, Rogosa & Sharpe) e incubada a 35°C por 24 horas. O microrganismo foi isolado em agar MRS (Oxoid) por estriamento descontínuo, para observação da morfologia das colônias pela coloração de Gram e realização de provas bioquímicas.

Preparo dos meios experimentais: o melão de cana-de-açúcar foi diluído a 3% (p/v) e centrifugado (Janetzki S60) à 4000 rpm durante 25 minutos para retirada dos sólidos em suspensão, sendo o sobrenadante utilizado para o preparo dos meios experimentais.

O meio experimental 1 (Meio 1) foi constituído de melão de cana-de-açúcar a 3% (p/v), extrato de levedura 0,5%, citrato de amônio 0,5% e acetato de sódio 0,5%. O meio experimental 2 (Meio 2) foi constituído de melão de cana-de-açúcar 3% (p/v), extrato de levedura 0,5%, acetato de sódio 0,5%, fosfato de amônio 0,5%, citrato de amônio 0,5%, Tween 80 0,1% e sulfato de manganês. O fosfato de amônio foi esterilizado separado (para evitar precipitação), e adicionado ao Meio 2 estéril. Como meio controle foi utilizado o caldo MRS (Oxoid). Os

meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Preparo do inóculo: o inóculo foi obtido a partir da cepa ativada em 10 mL de caldo MRS (35±1°C/24 horas) e inoculado em 100 mL nos Meios 1 e 2, incubado a 35°C por 14 horas para adaptação do microrganismo. Foram retiradas alíquotas de 3 mL e colocadas em frascos estéreis, aos quais foi adicionado glicerol estéril a 2% para evitar o ressecamento do meio, e em seguida, armazenadas a -18°C até sua utilização.

A cada fermentação, uma alíquota (3 mL) de inóculo dos diferentes meios eram descongeladas e reativadas em 100 mL do meio do cultivo por 14 horas/35±1°C. A concentração de biomassa foi determinada pelo método de ensaio espectrofotométrico (Kanasaki *et al.*, 1975) e o número de células viáveis através de contagem em placas (semeadura em profundidade) em agar MRS após 24 horas a 35±1°C.

Cultivo de *Lactobacillus plantarum* nos meios controle e experimentais: foram transferidas alíquotas de 3 mL de cada meio, contendo aproximadamente 9 log UFC/mL de *L.plantarum*, para o fermentador (*New Brunswick Cientific*, modelo Bioflo 2000), com volume de 3,5 L do meio de cultivo, com agitação de 150 rpm, temperatura de 35±0,1°C, aeração de 0,7 vvm (L de ar/L de meio/min) e tempo de cultivo de 24 horas. A concentração inicial de *L. plantarum* no fermentador, foi de aproximadamente 6 log UFC/mL. O experimento foi realizado em triplicata.

Avaliação do melão de cana-de-açúcar: a determinação da composição centesimal do melão foi realizada de acordo com as técnicas da AOAC (1984): umidade (técnica n° 9006), cinzas (técnica n° 14006), nitrogênio total (técnica n° 2057), glicídios redutores em glicose (técnica n° 31091) e glicídios não redutores em sacarose (técnica n° 31092)

Avaliação do crescimento: as amostras foram coletadas em triplicata, em frascos estéreis, em intervalos de 2 horas. A contagem de células viáveis foi realizada em placas de agar MRS (Oxoid) por semeadura em profundidade, incubada a 35±1°C por 24 horas.

A biomassa (g/L) foi determinada por espectrofotometria segundo procedimentos de Kanasaki *et al.* (1975), com leitura de densidade ótica (espectrofotômetro MC, modelo 724) a 520 nm usando como referência uma curva de densidade ótica *versus* peso seco, em alíquotas de 3 mL centrifugadas (FANEM, modelo 204-NR) a 3000 rpm por 15 minutos. As células foram ressuspensas em 3 mL de água peptonada a 1%, 3 mL de EDTA a 1% e duas gotas de NaOH 20M.

Para determinação de peso seco, alíquotas de 10 mL foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi separado (estocado a -18°C para posterior determinação do consumo de açúcares totais disponíveis) e o precipitado foi seco a 105°C até peso constante.

O pH foi monitorado no decorrer da fermentação a cada retirada de amostra (SCHOTT GERAT, modelo CG 918).

Consumo de açúcares: o consumo de açúcares foi determinado pelo método de carboidratos totais disponíveis (NOVOA *et al.*, 1993).

Consumo de nitrogênio total e minerais (K, Mn, Mg e P): as análises de nitrogênio total e minerais (K, Mn, Mg e P) foram efetuadas segundo as técnicas da AOAC (1984): nitrogênio total (técnica n° 2057), teor potássio (técnica n° 33103), teor de manganês e magnésio (técnica n° 33088) e fósforo (técnica n° 33111).

Análise estatística: o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três tratamentos (meios de cultura) e três repetições. Os resultados foram avaliados pela análise de variância e o teste de comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição do melão de cana-de-açúcar

A **Tabela 1** apresenta a composição físico-química do melão de cana-de-açúcar bruto utilizado. O pH do melão foi de 5,9.

Tabela 1 - Composição físico-química do melão de cana-de-açúcar bruto.

Composição	Concentração (g %)
Nitrogênio	0,58 p/v
Fósforo	0,015 p/v
Potássio	1,63 p/v
Umidade	9,10 p/p
Cinzas	9,98 p/p
Glicídios redutores em glicose	14,72 p/p
Glicídios não redutores em sacarose	33,78 p/p

O melão de cana-de-açúcar utilizado apresentou 48,50% de açúcares totais, sendo o maior percentual constituído de sacarose. Considerando que para o crescimento de qualquer microrganismo o substrato deve atender as necessidades nutricionais e energéticas do mesmo (carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio), o melão de cana-de-açúcar foi enriquecido com uma fonte de nitrogênio utilizando sais que continham amônia (nitrogênio inorgânico) e extrato de levedura (hidrolisado protéico).

Com relação as fontes de nitrogênio inorgânico e orgânico, é importante ressaltar que os microrganismos consomem ambas as fontes, no entanto, existe uma maior preferência pelo nitrogênio inorgânico e, somente quando a concentração das fontes inorgânicas atingem valores muito baixos ou são esgotados, é que as fontes orgânicas são utilizadas (Esteves, 1988).

O extrato de levedura, adicionado para enriquecer os meios experimentais, é um excelente estimulador do crescimento bacteriano, por apresentar alto conteúdo de vitaminas do complexo B (DIFCO, 1984).

Como o melão de cana-de-açúcar utilizado foi diluído a 3%, a concentração inicial de nitrogênio no meio de cultura foi de 0,17 g/L. A concentração média de nitrogênio no meio controle no início das fermentações foi de 3,07 g/L. O baixo teor de nitrogênio no melão a 3% requer a adição deste elemento para o desenvolvimento de microrganismos.

Contagem do número de células viáveis de *Lactobacillus plantarum* nos meios controle e experimentais

O meio controle apresentou um crescimento máximo de 28,68 log UFC/mL, maior do que os

Meios 1 e 2 (19,63 e 25,80 log UFC/mL, respectivamente), conforme **Figura 1**.

Os resultados indicam que a fase exponencial de crescimento ocorreu em intervalos de tempos diferentes durante as fermentações. No meio controle, a fase exponencial ocorreu entre 4 e 18 horas, no Meio 1, entre 6 e 14 horas e no Meio 2, entre 6 e 18 horas.

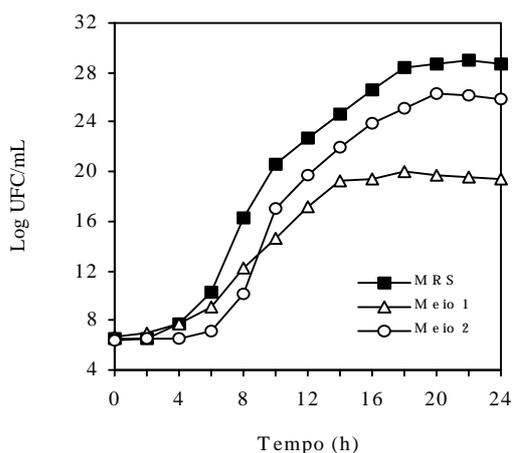


Figura 1 -Número de células viáveis (log UFC/mL) no cultivo de *Lactobacillus plantarum* em meio MRS (controle), Meio 1 (melaço a 3% enriquecido com 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de citrato de amônio e 0,5% de acetato de sódio) e Meio 2 (melaço a 3% enriquecido com 0,5% de citrato de amônio, 0,5% de acetato de sódio, 0,5% de fosfato de amônio, 0,2% de citrato de amônio, 0,1% Tween 80 e 0,005% de sulfato de manganês).

No caldo MRS ocorreu aumento de 22 ciclos de log em 24 horas, seguido pelo Meio 2 com 19 ciclos, enquanto que no Meio 1 o aumento foi de apenas 13 ciclos. O Meio 2 obteve resultados próximos aos do meio controle, enquanto o Meio 1, mostrou-se pouco viável para o cultivo de *L. plantarum*.

Concentração de biomassa de *Lactobacillus plantarum*

A concentração média final da biomassa obtida nas fermentações no meio controle e nos Meios 1 e 2 foi de 2,22 g/L, 1,37 g/L e 2,01 g/L respectivamente, conforme mostra a **Figura 2**.

As concentrações de biomassa estão relacionadas com a composição dos meios utilizados. A concentração de açúcares totais no início das fermentações foi semelhante. Os teores de

nitrogênio total e fósforo no Meio 1 foram muito inferiores ao do meio controle, enquanto o Meio 2 apresentou teores de nitrogênio total e fósforo próximos ao meio controle.

A produtividade de biomassa de *Lactobacillus plantarum* no meio controle (0,0865 g/L.h), Meio 2 (0,0768 g/L.h) e Meio 1 (0,0507 g/L.h) foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

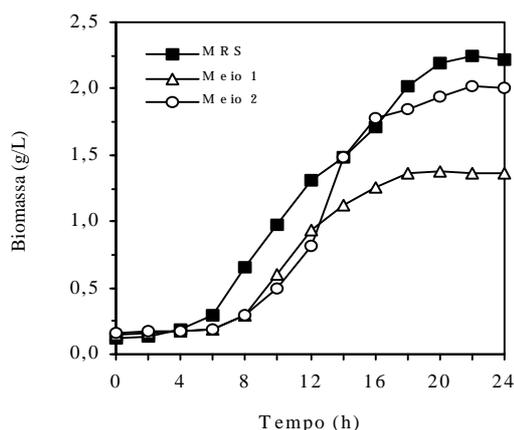


Figura 2 - Concentração média da biomassa de *Lactobacillus plantarum* em meio MRS (controle), Meio 1 (melaço a 3% enriquecido com 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de citrato de amônio e 0,5% de acetato de sódio) e Meio 2 (melaço a 3% enriquecido com 0,5% de citrato de amônio, 0,5% de acetato de sódio, 0,5% de fosfato de amônio, 0,2% de citrato de amônio, 0,1% Tween 80 e 0,005% de sulfato de manganês).

Varição do pH

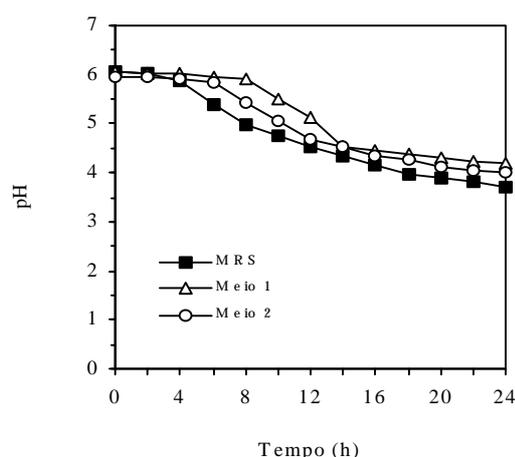


Figura 3 – Valores de pH no cultivo de *Lactobacillus plantarum* em meio MRS (controle), Meio 1 (melaço a 3% enriquecido com 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de citrato de amônio e 0,5% de acetato de sódio) e Meio 2 (melaço a 3% enriquecido com 0,5% de

citrato de amônio, 0,5% de acetato de sódio, 0,5% de fosfato de amônio, 0,2% de citrato de amônio, 0,1% Tween 80 e 0,005% de sulfato de manganês).

O valor do pH inicial nos meios de cultivo foi de $6,0 \pm 0,2$ para todas as fermentações.

No meio MRS o pH final foi de 3,72 após 24 horas de cultivo, sendo que para os Meios 1 e 2 foi de 4,18 e 3,99, respectivamente. No meio MRS (controle) os valores médios de pH foram inferiores ao do Meio 1 devido a maior produtividade de células viáveis. No Meio 2 os valores médios de pH foram próximos aos valores do meio controle, assim como o número de células viáveis.

Na **Figura 3** pode-se observar que ocorreu uma diminuição gradativa dos valores de pH durante as 24 horas de fermentação, confirmando a característica acidificante do microrganismo.

Consumo de açúcares totais disponíveis (AT)

Com relação ao consumo de AT, no meio controle o consumo médio foi de 87,21% e nos Meios 1 e 2 foi de 60,11% e 83,80%, respectivamente, durante as 24 horas de fermentação. O Meio 2, em relação ao consumo de AT, apresentou resultados próximos ao meio controle.

Consumo de nitrogênio total, P, K, Mn e Mg

O consumo médio de nitrogênio total foi de 0,2 g/L (meio controle), 0,13 g/L (Meio 1) e 0,17 g/L (Meio 2), conforme **Tabela 2**.

A diferença verificada pode ser atribuída a maior concentração de nitrogênio no meio controle (3,07 g/L), enquanto que para os Meios 1 e 2, as concentrações de nitrogênio foram inferiores (1,31 e 2,80 g/L, respectivamente).

A concentração inicial de fósforo no meio controle foi de 0,351%, no Meio 1 e 2 foi de 0,045% e 0,028 %, sendo o consumo maior no meio controle (0,024%). O teor inicial de potássio foi de 0,10% no meio controle, 0,221% no Meio 1 e 0,246% no Meio 2. O consumo de potássio no Meio 2 (0,025%) foi próximo ao meio controle.

A determinação do consumo de fósforo e potássio é de suma importância, uma vez que ambos participam da constituição dos ácidos nucleicos, dos fosfolípidos e das substâncias energéticas da série ATP permitindo a acumulação e a distribuição da energia da célula (Bocquet, 1985).

O teor de Mn no meio controle (15,2 ppm) apresentou-se demasiadamente superior ao Meio 1 (1,7 ppm) e equivalente ao Meio 2 (16,5 ppm).

O teor de Mg nos meios experimentais foram 82 ppm (Meio 1) e 87 ppm (Meio 2), superiores ao meio controle (30 ppm). O consumo de Mg dos meios foi também diferenciado, não apresentando uma relação com o número de células viáveis nem com a biomassa produzida.

Tabela 2 - Consumo de P, K, Mn e Mg no cultivo de *Lactobacillus plantarum* no meio MRS (controle) e Meios Experimentais 1 e 2.

Elemento	MRS	Consumo médio *	Meio 1	Consumo médio *	Meio 2	Consumo médio *
P (%)	0,351 ^a 0,327 ^b	0,024	0,045 ^a 0,031 ^b	0,014	0,228 ^a 0,206 ^b	0,022
K (%)	0,10 ^a 0,07 ^b	0,03	0,221 ^a 0,208 ^b	0,013	0,246 ^a 0,221 ^b	0,025
Mn (ppm)	15,2 ^a 12,3 ^b	2,9	1,7 ^a 1,1 ^b	0,6	16,5 ^a 13,8 ^b	2,7
Mg (ppm)	30,0 ^a 18,0 ^b	12,0	82,0 ^a 71,0 ^b	11,0	87,0 ^a 71,0 ^b	16,0
N total (g/L)	3,07 ^a 2,87 ^b	0,20	1,31 ^a 1,18 ^b	0,13	2,80 ^a 2,63 ^b	0,17

* Média de três repetições; ^a

^b final da fermentação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**, 16 ed. Arlington : 1984, 1141 p.

Bocquet, J. Generalidades sobre os microrganismos. In: Scriban, R. **Biotechnologia**. São Paulo : Manole, p. 38-39, 1985, 489 p.

Delgado, A. A. Tecnologia do açúcar e das fermentações industriais. v. 1, p.91. In: **Tecnologia dos produtos agropecuários** Piracicaba : ESALQ. 1975.

Diez Fernandes, V. A. Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas en los alimentos. In: CONGRESO NACIONAL DE MICROBIO-LOGIA, v. 2, n. 9, Valladolid, 1983.

Diez, J. C.; Yokoya, F. Fermentação alcoólica de mosto de melão de cana-de-açúcar por processo descontínuo utilizando *Zymomonas mobilis*. **Arq. Biol. Technol.**, v. 39, n. 2, p. 419-426, 1996.

DIFCO manual: medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología 10 ed. Madrid : [s.n.], p. 1133-1134, 1984, 1166 p.

Esteves, A. F. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro : Interciência, p. 197-199, 1988, 575 p.

Kanasaki, M. *et al.* Effects of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. **Aust. J. Food Protection**, p. 142-144, 1985.

Lima, U. A. **Tecnologia das fermentações**, v. 1. São Paulo : E. Blucher, 285 p., 1987.

McFall, S.M.; Montville, P.E. pH mediated regulation of piruvate catabolism in *Lactobacillus plantarum* chemostat cultures. **J. Industry Microbiology**, n. 4, p. 335-340, 1989.

Novoa, M. A. *et al.* **Manual de técnicas para laboratório de nutrición de peces y crustaceos**. México : ONU, p. 33-35, 1993, 104 p. (Documento de Campo 7).

Sarkar, P.K.; Banerjee, S. Antibacteria activity of acid lactic bacterial isolates obtained from natural habitats. **J. Food Sci. Technol.**, v. 33, n. 3, p. 231-233, 1996.

Received: July 31, 1998;
Revised: August 05, 1998;
Accepted: October 29, 1998.