

Efeito do etanol no crescimento de bactérias lácticas

L. FERNANDES¹, V. LOUREIRO² e ARLETE MENDES FAIA¹

¹ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

² Instituto Superior de Agronomia

Recebido: Outubro de 1990

Resumo

Neste trabalho foi estudado o efeito do etanol no crescimento-taxa de crescimento, duração da fase lag e produção de biomassa total (medida em absorvância a 600 nm) - de espécies dos géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*, isoladas de vinhos. Para baixas concentrações de etanol, variáveis com a espécie e o pH do meio, verificou-se um efeito estimulante do etanol nas taxas de crescimento. Para concentrações mais elevadas de etanol ocorreu um efeito repressivo sobre todos os parâmetros medidos, embora mais evidente em *Leuconostoc* do que em *Lactobacillus* e *Pediococcus* e fortemente dependente do pH.

Abstract

This study deals with the effect of ethanol on the growth rate, lag phase and biomass production by several strains classified under the genera *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus*. Low concentrations of ethanol significantly increased the growth rate of all strains, which intensity was variable with the pH and among the strains. The repressive effect of ethanol, at higher concentrations, on the bacterial growth was more relevant in *Leuconostoc* than with *Lactobacillus* and *Pediococcus*. Besides, this effect was significantly dependent of the initial pH of the culture medium.

INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico constituem o mais importante grupo de bactérias que se desenvolvem nos vinhos. Descarboxilam o ácido L-málico a ácido L-láctico, fenómeno designado por fermentação maloláctica, o que constitui importante factor de qualidade nos vinhos muito ácidos e particularmente nos vinhos tintos de mesa (1,3 4). Além do ácido málico, outros substratos podem ser metabolizados (9) podendo conduzir ou não à alteração do vinho. No caso particular do vinho do Porto, é atribuído às bactérias lácticas o aumento da acidez volátil que se verifica nalguns vinhos, particularmente em anos especiais.

Devido às exigências nutritivas das bactérias lácticas (12), o vinho constitui um ambiente pouco favorável ao seu crescimento devido aos elevados

teores de etanol e de dióxido de enxofre e aos valores reduzidos de pH e de nutriente que contém (3, 4, 5, 7). Numerosos têm sido os estudos efectuados sobre o efeito do pH no crescimento bacteriano, sabendo-se que afecta a duração da fase lag, a taxa de crescimento, a produção de biomassa final e, concomitantemente, a produção de ácido láctico (6, 7, 8). O pH condiciona ainda o tipo de microflora que se desenvolve no vinho (6).

Pelo contrário, o efeito do etanol no crescimento bacteriano tem sido assunto menos estudado. Várias são as referências na literatura (1, 3, 4, 5) sobre o efeito inibidor do etanol no crescimento de certas espécies de bactérias lácticas. No entanto, não existem estudos sistemáticos sobre o assunto, nomeadamente sobre a cinética do cresci-

mento. Sabe-se, porém, que a sensibilidade ao etanol é variável com o género (3), com a espécie e com as condições do meio (4, 5).

A fermentação maloláctica dificilmente ocorre em vinhos cujo teor em etanol seja superior a 13% (3, 4, 5). LAFON-LAFOURCADE (5) verificou que a enzima maloláctica de *Leuconostoc oenos* era tanto mais inibida quanto mais elevado era o teor do etanol do vinho. Há, porém, outras espécies isoladas de vinhos alcooolizados, com percentagens de álcool da ordem dos 20%, cujo crescimento é não só estimulado pelo etanol como também por outros álcoois nomeadamente, o metanol, o propanol, o butanol, vários poliálcoois e ainda a acetona (10).

O objectivo deste trabalho (2) foi avaliar o efeito do etanol no crescimento de várias espécies de bactérias lácticas dos géneros *Leuconostoc* e *Pediococcus*, agentes da fermentação maloláctica, e a espécie *Lactobacillus spp* 48, isolada de um vinho do Porto alterado.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. - Microrganismos

As bactérias utilizadas neste trabalho fazem parte da colecção da UTAD e foram isoladas de vinhos de mesa da região - *Leuconostoc oenos* 8 A e *Pediococcus damnosus* 12 A - após a ocorrência da fermentação maloláctica. A estirpe *Lactobacillus spp.* 48 foi isolada de vinho do Porto alterado. A estirpe *Leuconostoc oenos* ML34 foi cedida pelo Departamento de Viticultura e Enologia da Universidade da Califórnia, Davis.

2.2 Meios de cultura

TGB caldo de sumo de tomate com extracto de fígado e glicose - Este meio de cultura é essencialmente o meio apresentado por PILONE e KUNKEE (7) e tem a seguinte composição: Bactotriptonna 2%, Bactopeptona 0,5%, extracto de levedura 0,5%, glicose 0,5%, extracto de fígado 0,1% e Tween 80 0,005%. Estes ingredientes foram dissolvidos em sumo de tomate diluído (1:5). O pH foi acertado a 4,5, a não ser nos casos devidamente assinalados no texto.

TGB agar - Este meio sólido tem composição igual ao anterior, tendo sido adicionado 2,5% de agar e o pH final acertado a 5,5.

GB - Este meio de cultura tem a mesma composição do meio TGB, sem adição de sumo de tomate e com pH de 4,5.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O pH foi acertado, antes da esterilização, num potenciómetro ORION 601A previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

2.3. - Condições de crescimento

Antes de cada ensaio, as bactérias foram repicadas de TGB agar, mantidas no frigorífico (2-8°C), para TGB caldo e incubadas a 25°C durante 7 dias, sendo em seguida repicadas para GB caldo. Após 7 dias de incubação a 25°C, procedeu-se à sua centrifugação a 10 000g durante 15 minutos, numa centrífuga refrigerada SORVALL 33. Eliminou-se o líquido sobrenadante e ao sedimento adicionou-se um volume de água estéril igual ao volume inicial de meio de cultura e procedeu-se à inoculação dos meios (1%) com a suspensão bacteriana. A temperatura de incubação foi de 25°C.

2.4. - Resistência das bactérias ao etanol

A resistência das bactérias ao etanol foi observada em TGB-caldo, com vários níveis de pH (3, 5, 4, 0, 4, 5,) e de etanol (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14%). O álcool foi adicionado após esterilização. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

O crescimento foi controlado pela avaliação da absorvância a 600nm, em intervalos de tempos regulares, com um espectrofotómetro BAUSCH LOMB, Spectronic 21, até à obtenção do crescimento máximo. Utilizou-se o meio não inoculado como branco e o espectrofotómetro foi acertado a 100% de transmitância com água destilada. Em seguida, foi analisado o pH final do meio de cultura após filtração por membranas de 0,2µm. O filtrado foi congelado (-18°C) para análises posteriores.

a) Cálculo das taxas de crescimento

As taxas de crescimento foram calculadas com base em curvas semi-logarítmicas, nas quais se relacionou o ln das absorvâncias com o tempo, obtidos nas diferentes condições experimentais ensaiadas. A taxa específica de crescimento é, numericamente, o coeficiente angular da recta, que corresponde à fase exponencial de uma curva de crescimento.

b) determinação da fase lag

Quando as células bacterianas são transferidas para um novo meio de cultura, elas necessitam

de um certo período de adaptação até que se inicie o crescimento. Este período, de duração variável, designa-se por fase lag. Após a inoculação, a absorvância (DO) manteve-se praticamente sem alteração durante algumas horas. A partir de um determinado momento verificou-se um aumento brusco na densidade óptica. Neste caso, considerou-se o tempo imediatamente anterior como correspondente à fase lag.

Casos houve em que esta variação não foi nítida, pelo que se considerou como fase lag o tempo em horas correspondente à intercepção entre o prolongamento das rectas correspondentes à fase lag e à fase exponencial.

2.5. - Análise estatística

Os efeitos do etanol no crescimento das várias estirpes foram avaliados por análise de variância, de acordo com STEEL e TORRIE (11). A significância das diferenças entre médias foi avaliada pela MDS (diferença significativa mínima) e pelo teste de TUKEY (11) para 95% de probabilidade.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que obtivemos, sumarizados nas Figs. 1, 2 e 3, demonstram que a concentração de etanol do meio de cultura afecta significativamente a variação da taxa específica de crescimento, da biomassa final e da duração da fase lag (Quadro I). Globalmente, detectou-se um efeito repressivo do etanol nos vários parâmetros de crescimento, em todas as estirpes. Em *Leuconostoc oenos* a contribuição do etanol na variação de todos os parâmetros referidos foi superior à do pH, ao contrário do que aconteceu nas espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Isto deve-se ao facto das estirpes de *Leuconostoc oenos* serem mais acidófilas que as espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

Todavia, observou-se um aumento significativo, embora de intensidade variável, na taxa específica de crescimento na presença de 2 a 4% de etanol em todas as estirpes (Fig. 1).

Em *Leuconostoc oenos*, 8A e ML34, o efeito estimulante de concentrações reduzidas de etanol foi tanto mais evidente quanto mais baixo foi o pH inicial do meio de cultura. Além disso, a concentração mínima inibitória foi de 8% a pH 3,5 e de 6% a pH 4,0 e 4,5.

Em *Pediococcus damnosus* 12A e *Lactobacillus spp* 48 o efeito inibitório do etanol foi gradualmente diminuindo com o incremento do pH do meio de cultura.

A duração da fase lag só foi prolongada de modo mais relevante a pH 3,5 e para valores de etanol compreendidos entre 4 e 8%, consoante o género (Fig. 2).

Não se observou nenhum efeito repressivo do etanol sobre a produção de biomassa até 6% de etanol, excepto em *Pediococcus damnosus* 12A a pH 3,5 (Fig. 3).

O efeito estimulante do etanol, quando adicionado em baixas concentrações, poderá ser devido a alterações na permeabilidade da membrana plasmática, que facilitarão a entrada de nutrientes. Do ponto de vista prático, este estímulo do etanol poderá ter grande significado, não só por poder vir a ser utilizado na formulação de meios de cultura, mas também na multiplicação de fermentos. No caso concreto de *Leuconostoc oenos*, o efeito estimulante do etanol, particularmente a pH 3,5, associado à elevada resistência desta espécie a baixos valores de pH, poderá ser aproveitado na formulação de meios de cultura selectivos que permitam o isolamento desta espécie, em detrimento de outras, a partir dos vinhos.

Os resultados sugerem ainda que a actividade bacteriana em vinhos alcoolizados poderá ser evitada através de correções adequadas dos valores de

QUADRO I

ANOVA (valores de F) dos vários parâmetros de crescimento, para vários níveis de pH e etanol, para cada estirpe.

Fontes de variação	ML34			8A			12A			48		
	u	lag	D.O.	u	lag	D.O.	u	lag	D.O.	u	lag	D.O.
Etanol	605,6	1117,7	1264,4	309,1	2828,3	1450,2	614,1	4926,4	405,5	124,5	4292,6	106,3
pH	138,6	417,3	283,9	199,2	13101,8	174,9	1831,1	22162,6	1277,4	1202,4	114996,1	700,1
pH x etanol	16,0	174,6	25,4	13,5	4651,4	17,5	82,3	4229,7	39,8	46,6	2801,9	40,6

u - taxa de crescimento h⁻¹; lag - duração da fase lag em horas; D.O. - absorvância a 600 nm

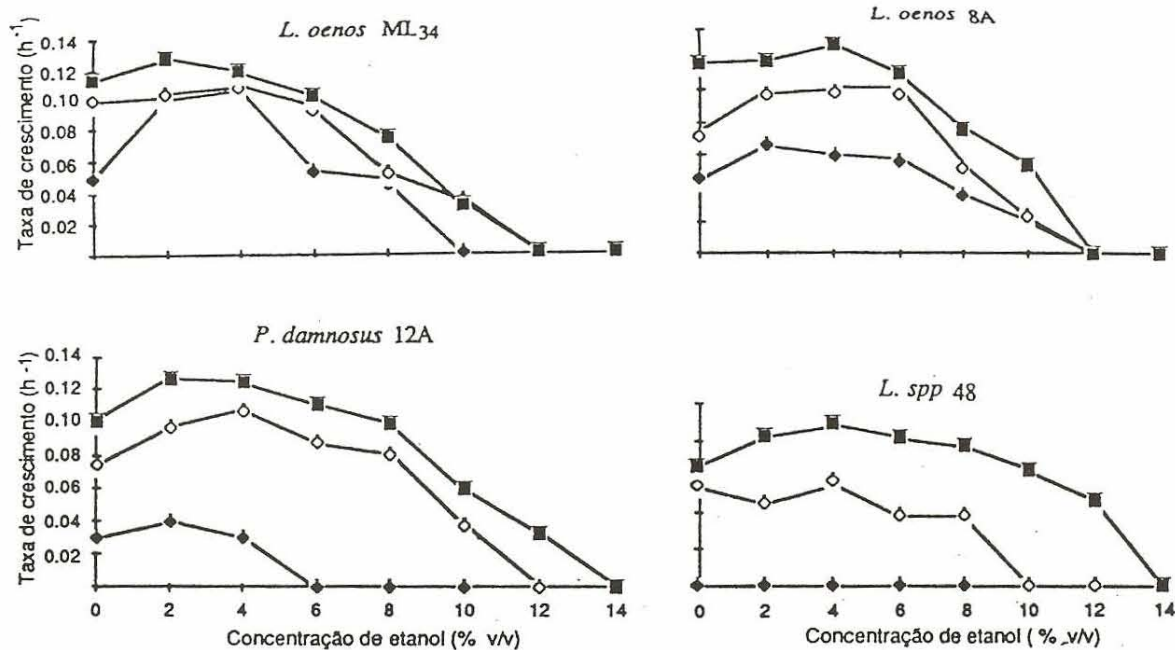


Figura 1 - Efeito do etanol nas taxas de crescimento (h⁻¹) de várias estirpes para vários níveis de pH: ● 3,5; ○ 4,0; ■ 4,5

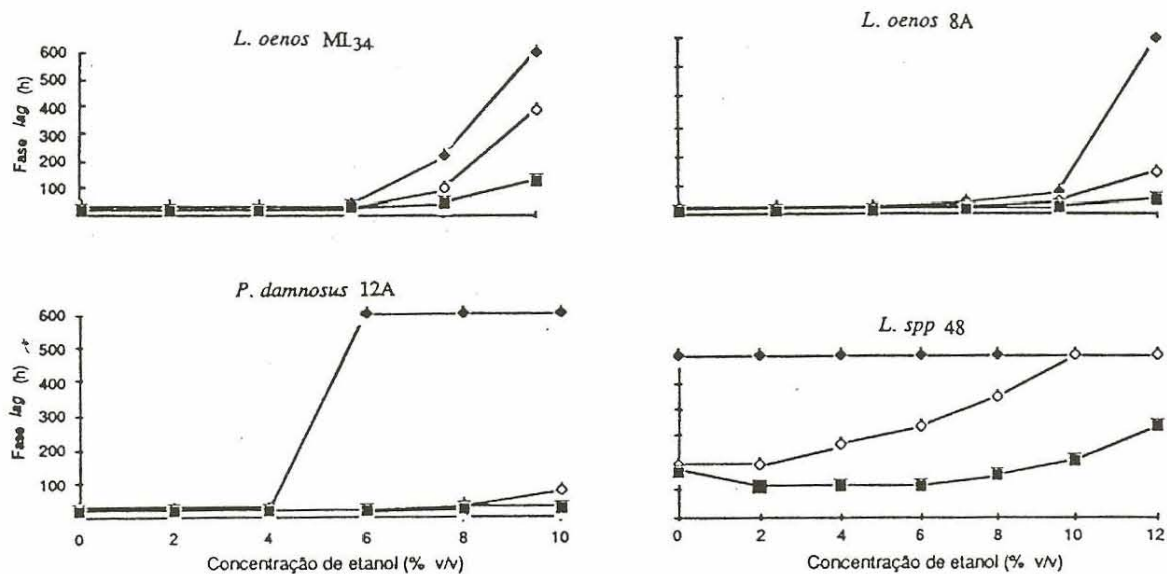


Figura 2 - Efeito do etanol na duração da fase lag (h) de várias estirpes para vários níveis de pH: ● 3,5; ○ 4,0; ■ 4,5

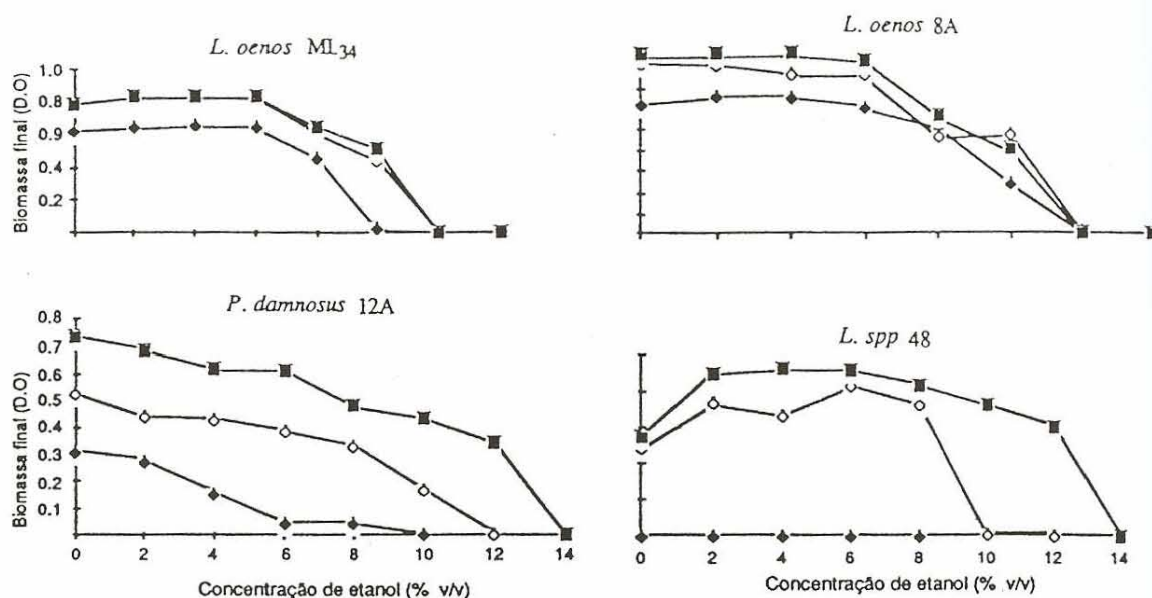


Figura 3 - Efeito do etanol na biomassa (D.O) de várias estirpes para vários níveis de pH: 3,5; ● 4,0; ○ 4,5 ■

pH, na medida em que as espécies mais frequentes em tais condições - *Lactobacillus spp* - são as que se mostraram mais sensíveis à acidez do meio.

5 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - DAVIS, C.R., D. WIBOWO, T.H. LEE e G.H. FLEET, 1986. Food Technol. Aust. 38 (1): 35-40.
- 2 - FERNANDES, L., 1988. Tese de Mestrado em Biotecnologia do Instituto Superior Técnico, Lisboa.
- 3 - KUNKEE, R.E., 1967. Adv. Appl. Microbiol., 9: 235-279.
- 4 - KUNKEE, R.E., 1974. Em: Chemistry of wine making. A.D. Webb (ed.). Advances in Chemistry series 137: 151-170.
- 5 - LAFON-LAFOURCADE, S. 1975. Em: Lactic

acid bacteria in beverages and food. J.G. Carr. C. V. Cutting e G.C. Whiting (eds): 43-53.

6 - MENDES FAIA MASCARENHAS FERREIRA A. 1987. Tese de doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Serviços de Documentação U.T.A.D., Vila Real, 163 pgs..

7 - PILONE G. e R.E. KUNKEE. 1972. Am. J. Enol. Vitic. 23 (2): 61-67.

8 - PILONE, G. e R.E. KUNKEE, 1976. Appl. Environ. Microb. 32 (3): 405-408.

9 - RADLER, F., 1986. Experientia 42: 884-893.

10 - RADLER, F. e S. HARTEL, 1984. Wein wiss. 106-112.

11 - STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1981. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, 2nd ed., MacGraw-Hill Int. Book. Co.

12 - WEILLER, H. e F. RADLER, 1972. Mitt. Klosterneuburg 21: 4-18.