

III Simpósio Nacional de Olivicultura
Castelo Branco, 29 a 31 de Outubro de 2003

Degradação de compostos fenólicos por estirpes de *Lactobacillus* isoladas de águas russas

Catarina Lourenço^{1,2}, Carla Rafael^{1,3}, Cristina Mello-Sampayo¹, Cristina Pintado², Teresa Santos³, Luís Catulo⁴, M^a Manuela Oliveira⁴, Dulce Brito⁴ e Cidália Peres⁴

¹Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apt. 127, Quinta do Marquês/EAN, 2780 Oeiras, Portugal

²Escola Superior Agrária de Castelo Branco, IPCB, Apartado 119, 6001-909 Castelo Branco, Portugal

³Escola Superior Agrária de Beja, Rua Pedro Soares – Campus, 7800 – 295 Beja, Portugal

⁴Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, L-INIA, Quinta do Marquês/EAN, 2780 Oeiras, Portugal. cperes@itqb.unl.pt

RESUMO

As águas russas, principal resíduo da indústria de extracção do azeite, são caracterizadas por uma elevada carga orgânica poluente constituindo, por esta razão, um dos mais graves problemas ambientais dos países da bacia mediterrânea. São particularmente ricas em compostos fenólicos, lípidos e açúcares e apresentam teores mínimos de compostos azotados. O seu potencial biológico e energético é importante, pelo que se estudou a possibilidade de serem usadas como meio de cultura para produção de inóculos lácticos para a indústria de preparação de azeitona de mesa. Foram estudadas várias fontes de compensação de azoto, bem como vários tipos de meio, líquido ou sistema bifásico, com vista à maximização da capacidade de degradação de compostos fenólicos por bactérias lácticas (BL). Foram também estudados alguns dos factores de adaptação das BL às condições de *stress* fenólico. Concluiu-se que a degradação dos compostos fenólicos e a produção de ácido láctico depende do tipo e da concentração de azoto. Verificou-se que as BL possuem um mecanismo de adaptação ao *stress* fenólico, baseado em alterações dos seus componentes celulares.

Palavras-chave: águas russas, ambiente, potencial biológico e energético, bactérias lácticas, degradação biológica

ABSTRACT

The main residue from olive oil extraction is olive-mill wastewater that is characterized by a high content of organic pollutants and, by consequence, a top environmental issue in Mediterranean countries. These wastewaters are particularly rich in phenolic compounds, lipids and sugars, with low contents of nitrogen compounds. Considering the biological and energetic potentials of olive-mill wastewaters, the possibility of their utilization in a culture medium for the production of lactic starters for table olive industry was studied. Several sources of nitrogen compensation as well as the type of medium (liquid or biphasic) have been tested, with the aim of maximizing the degradation of phenolic compounds by lactic acid bacteria (LAB). Some adaptation factors of LAB to phenolic stress conditions were also studied. It has been concluded that the degradation of phenolic compounds as well as lactic acid production depend on the nitrogen source and its concentration. It was also verified that LAB possess an adaptation mechanism to phenolic stress that is based in alterations of cellular components.

Keywords: olive mill wastewater, environmental, biologic and energetic potential, lactic acid bacteria, biological degradation

INTRODUÇÃO

A indústria de extracção de azeite dá origem a um resíduo, denominado águas russas (AR), em elevada quantidade. Em Portugal, o volume anual de AR pode atingir 350 mil m³ com uma capacidade poluente muito elevada (Rosa e Vieira, 1995). Para o tratamento deste efluente, têm sido preconizadas algumas soluções, entre as quais, a secagem e o tratamento biológico (Hamdi, 1993).

A composição química das AR depende do tipo de extracção de azeite e da cultivar de azeitona, bem como de factores climáticos dos países produtores. A análise da composição fenólica de AR portuguesas revelou a existência de ácido protocatecuico, ácido *p*-hydroxybenzóico, ácido *p*-hydroxyfenilacético, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico e ácido *p*-cumárico (Mello-Sampayo, 1998).

Estudos recentes evidenciaram a capacidade de degradação de AR por *Lactobacillus plantarum* isolado de salmouras de fermentação de azeitona (Rozès e Peres, 1994).

Neste trabalho, estudou-se a capacidade degradativa de AR por uma estirpe de *Lactobacillus plantarum* isolada de salmouras de azeitona, tendo em conta o tipo de fonte de azoto a suplementar, o tipo de meio (líquido e bifásico) e considerando os parâmetros crescimento celular, produção de ácido láctico e alterações dos componentes celulares das bactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

A estirpe ensaiada foi *Lactobacillus plantarum* DSM 10492 e foi usado um sistema bifásico (sólido/líquido), como meio de cultura, cuja composição variou em função das concentrações da fonte de azoto (triptona), do agar e da AR. A viabilidade celular foi avaliada por contagem de colónias em meio de cultura convencional e expressa em unidades formadoras de colónias por mililitro (ufc/mL). Os parâmetros avaliadores do crescimento foram a taxa específica de crescimento das bactérias (μ_{\max}) e o índice óptimo de crescimento (IO) e foram calculados através das equações $\ln X_{(t)} = \ln X_0 + \mu t$, onde $X_{(t)}$ e X_0 são a viabilidade celular nos tempos t e 0, respectivamente, e μ_{\max} é a taxa máxima de crescimento. A equação $(\mu_{\max} + A_{\max} + \text{Lactato}_{\max})/100$, avalia o IO, onde (A_{\max}) é a população máxima atingida na cultura e (Lactato_{\max}) a produção máxima de ácido láctico. O IO varia entre 0 e 3.

A análise dos compostos fenólicos foi feita por cromatografia, segundo adaptação da técnica seguida por Belchior et al. (1993). A análise dos produtos de fermentação, glucose e ácidos orgânicos foi feita por HPLC e as concentrações dos compostos foram calculadas relacionando as áreas dos picos com as de padrões externos, para cada composto.

A composição de ácidos gordos das células foi feita por cromatografia de gás, recorrendo ao método de Rozès et al. (1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de degradação de AR por *L. plantarum* DSM 10492 verificou-se, ao longo do tempo de fermentação/degradação, um aclaramento gradual da cor dos meios utilizados, o que fez supor que alguns compostos fenólicos presentes se teriam degradado por acção daquela estirpe. Para confirmação, foi efectuada por HPLC a análise dos compostos fenólicos presentes. A sua identificação foi feita por comparação

de espectros de retenção, sobrecarga de amostras com padrões e comparação de espectros de absorção molecular no UV-visível, dos componentes separados. Os compostos identificados foram o ácido protocatecuico, ácido *p*-hydroxybenzóico, ácido *p*-hydroxyphenilacético, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico e ácido *p*-cumárico (resultados não apresentados), não sendo esta composição muito distinta da referida na bibliografia (Martinez et al., 1992).

As análises efectuadas ao longo de uma semana de incubação mostraram a degradação sequencial dos compostos fenólicos presentes no meio de AR por acção de *L. plantarum*, deduzindo-se, a partir da análise dos espectros de HPLC, alterações na composição fenólica. Alguns componentes desapareceram completamente dando lugar a outros em quantidade reduzida e não identificados. Dos três principais compostos degradados, apenas um foi possível identificar como sendo o ácido *p*-hydroxyphenilacético.

Relativamente ao estudo do efeito da variação das concentrações de agar (0,50; 0,93 e 1,33 %) no crescimento (população máxima atingida) (Tabela 1), em meio com uma concentração fixa de triptona (2 %), verificou-se um aumento dos teores de ácido cítrico e de açúcares, proporcional à concentração de agar, e um decréscimo da produção de ácido láctico. Na ausência de triptona, não se verificou crescimento de *L. plantarum*.

Ainda na presença de triptona, o crescimento celular foi proporcional ao acréscimo dos seus teores. A população máxima foi atingida na concentração inicial de triptona de 4 e 6 % e a velocidade de consumo dos açúcares foi proporcional ao crescimento (resultados não apresentados).

Os teores de AR ensaiados foram 0; 12,4; 37,1 e 49,4 % do volume total, não sendo registado crescimento, na ausência de AR, apesar da viabilidade das células. O crescimento de *L. plantarum* foi inversamente proporcional ao acréscimo do teor de AR. O aumento de difusibilidade de ácido cítrico e açúcares verificou-se na maior concentração de AR (49,4 %), embora a produção de ácido láctico fosse limitada (Tabela 2), provavelmente devido à maior concentração de compostos fenólicos, nomeadamente a oleuropeína, que reduziu a capacidade de crescimento e a capacidade de produção de ácido láctico pela bactéria (Rozès e Peres, 1996).

Em relação à alteração da composição em ácidos gordos das células, na presença de AR as células incorporaram os ácidos oleico e linoleico presentes e sintetizaram ácido dihydrostercúlico (C19 Δ *cis*-9,10) a partir do ácido oleico. O grau de insaturação da membrana plasmática aumentou, assim, com o acréscimo dos teores de AR (Tabela 3). Este fenómeno é devido à incorporação dos ácidos gordos exógenos, tais como o ácido oleico e o ácido linoleico (Rozès e Peres, 1996).

Os resultados mostraram que o suplemento de triptona é essencial ao crescimento de *b. plantarum* em AR, pelo aumento da disponibilidade de azoto no meio, inicialmente deficitário, sendo o crescimento de *L. plantarum* dependente da concentração de triptona. A AR contém 0,03-0,12 % de azoto total (Rosa e Vieira, 1995) e, conseqüentemente, a suplementação com a triptona contribuiu para compensar a deficiência em azoto. Alguns compostos fenólicos combinam-se com as proteínas da membrana celular, reduzindo a sua toxicidade (Pierpoint, 1983).

AGRADECIMENTOS

Financiado pelo Projecto PIDDAC/INIA/140/01.

REFERÊNCIAS

- Belchior, A.P., Spranger, M.I., Carvalho, E.C. e Leandro, M.C. 1993. Élaboration et connaissance des spiritueux. p. 479. *In*: R. Catangrel (1ª ed.), Recherche de la qualité, tradition et innovation. BNIC, Diffusion Tec et Doc Lavoisier.
- Hamdi, M., 1993. Future prospects and constraints of olive mill waste-waters use and treatment: A review. *Bioresource Technol.* 8: 209-214.
- Martinez-Nieto, L., Ramos-Cormenzana, A., Garcia-Pareja, M.P. e Garrido-Hoyos, S.E. 1992. Biodegradation de compuestos fenolicos de alpechin con *Aspergillus terreus* *Grasas y Aceites*, 43 (2): 75-81.
- Melo-Sampayo, C.L. 1998. Bacteriocinas de bactérias lácticas. Pesquisa, caracterização e produção. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Faculdade de Farmácia de Lisboa. Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos.
- Pierpoint, W. 1983. Reactions of phenolic compounds with proteins and their relevance to the production of leaf proteins. pp. 235-267. *In*: L. Telek e D. Graham (Eds.) Leaf protein concentrates. Avi Publishing, Connecticut.
- Rosa, M.F. e Vieira, A.M. 1995. Perspectivas e limitações no tratamento e utilização das águas residuais de lagares de azeite: situação Portuguesa. *Bol. de Biotecnol.* 52: 8-14.
- Rozès, N., Peres, C. 1996. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 839-843.
- Rozès, N., Garbay, S., Denayrolles, M. e Lonvaud-Funel A. 1993. A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17: 126

TABELAS

Tabela 1 – Efeito da concentração inicial de agar na difusão de ácido cítrico e açúcares no meio e na produção de ácido DL-láctico por *Lactobacillus plantarum* DSM 10492 a 28 °C. (Tryptone: 0,34%; AR: 24,7%)

Tempo de incubação	Agar (%)	Ácido cítrico (g.L ⁻¹)	Glucose (g.l ⁻¹)	Frutose (g.l ⁻¹)	Ácido DL-láctico (g.l ⁻¹)
48 horas	1,5	0,98	3,38	3,02	1,22
	2,8	0,92	3,58	2,63	0,98
	4,0	0,94	3,72	2,73	0,83
96 horas	1,5	1,22	2,46	2,76	3,03
	2,8	1,28	4,20	3,06	1,96
	4,0	1,85	5,27	3,56	1,82

Tabela 2 – Efeito da concentração de AR na difusão de ácido cítrico e açúcares e na produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* DSM 10492 a 28 °C após 4 dias. Agar: 1,5%; Tryptona: 0,67%

AR (%)	Ácido cítrico (g.l ⁻¹)	Glucose (g.l ⁻¹)	Frutose (g.l ⁻¹)	Ác. DL-láctico (g.l ⁻¹)	Ácido acético (mg.l ⁻¹)
12,4	0,20	0,05	0,08	3,51	2,0
24,7	0,89	0,71	2,18	6,02	210
37,1	1,59	6,92	7,18	4,83	204
49,4	1,92	19,50	16,20	3,30	210

Tabela 3 – Efeito da concentração de AR na composição em ácidos gordos de *L. plantarum* DSM 10492 a 28 °C após 4 dias de crescimento (fase estacionária). Agar: 0,51%; Tryptona: 0,67%.

Ácidos gordos (%)	AR (%)			
	12,4	24,7	37,1	49,4
C14	0,82	0,81	0,86	0,70
C16	33,42	33,04	31,30	23,68
C16:1	0,95	1,07	1,12	1,35
C17Δ cis-9,10	0,36	0,90	0,82	0,54
C18	3,68	3,57	3,36	3,85
C18:1 cis-9	12,97	16,22	22,60	46,72
C18:1 cis-11	11,05	8,90	9,18	6,63
C18:2	2,79	2,96	4,60	7,56
C19Δcis-9,10	2,09	2,51	4,98	4,77
C19 Δcis-11,12	29,94	28,03	19,17	7,06
ND	0,31	0,32	0,42	0,70

ND não determinados