

Triagem de bactérias ácido-acéticas para a produção de um vinagre de tamarindo

Screening for acetic acid bacteria for tamarind vinegar production

RESUMO

O presente trabalho teve o intuito de purificar e identificar em nível de gênero bactérias do ácido acético presente em fermentador de vinagre. O fermentador piloto de capacidade de seis litros operada com álcool cereal de milho. A alíquota retirada foi de aproximadamente 200 mL de suspensão a partir do ponto de amostragem do fermentador submerso em funcionamento e imediata inoculação em placas com meio de isolamento, em duplicatas. O tempo entre a retirada da amostra no ponto de coleta da dorna e a inoculação não excedeu 60 segundos. As alíquotas de 0,1 mL foram vertidas nas placas com meio e espalhadas com alça de *Drigalski*. A incubação em estufa bacteriológica foi a 30^o C, por 96 horas. Após o período de crescimento, efetuou-se o isolamento e purificação das colônias. Para a adequada purificação, repetiu-se o procedimento acompanhando-se a pureza da cultura em microscópio ótico e após a coloração de Gram. Posteriormente, as linhagens que apresentaram forma de bastonetes Gram negativos foram submetidas a uma rápida identificação fenotípica para diferenciar os gêneros. Separou-se os microrganismos isolados em dois gêneros *Gluconobarcter* e *Acetobacter*. Os três isolados classificados como *Acetobacter* foram preservadas a temperatura de congelamento em solução crioprotetora para estudos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias ácido-acéticas. Fermentação. Álcool.

ABSTRACT

The presente work aimed to purify and identify at the gender level acetic acid bacteria in vinegar fermenter. The six-liter capacity pilot fermenter operated with corn cereal alcohol. The aliquota taken was approximately 200mL pf suspension from the working submerged fermenter sampling point and immediately inoculated into duplicate isolation plates. The time between sample withdrawal at the collection point and inoculation did not exceed 60 seconds. The 0.1mL aliquots were poured into the médium plates and spread with *Drigalski's* loop. Incubation in a bacteriological oven was at 30°C for 96 hours. After the growth period, the colonies were isolated and purified. For proper purification, the producedure was repeated following the purity of the culture under na optical microscope and after Gram staining. Subsequently, Gram-negative rod-shaped strains underwent rapid phenotypic indentification to differentiate between genders. The isolated microorganism were separated into two genera *Gluconobarcter* and *Acetobacter*. The three isolates classified as *Acetobacter* were preserved at freezing temperature in cryoprotectant solution for future studies.

Larissa De Grande Piccinin
larissapiccinin@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná Londrina, Paraná, Brasil

Lyssa Setsuko Sakanaka
lyssa@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná - Londrina, Paraná, Brasil

Wilma Aparecida Spinosa
wilma.spinosa@uel.br
Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, Paraná, Brasil

Edvaldo Rodrigues de Oliveira Junior
Edvaldojr.lgna@gmail.com
Instituto Tecnológico Federal do Paraná
- Londrina, Paraná, Brasil

Natalia Norika Yassunaka Hata
Naty_ea@hotmail.com
Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, Paraná, Brasil

Ana Elisa Barbosa Siqueira
Siqueira.anaelisa@gmail.com
Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, Paraná, Brasil

Luciana Furlaneto Maia
lyssa@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná - Londrina, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

KEYWORDS: Acid acetic bacterias. Fermentation. Alcohol..



INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia passa por atualizações contínuas devido à grande diversidade e possibilidades de novos alimentos. O vinagre é um alimento antigo e muito comum pois, além de ser utilizado como condimento, tem sido apontado com propriedades biorregulatórias. Pode ser produzido a partir de frutas e, dessa forma, carrega características sensoriais dessas frutas, além de vitaminas e sais minerais, ampliando e diversificando o mercado de tal produto (BORTOLINI et al., 2001).

A fruta que o nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido trabalho e pretende produzir vinagre é o tamarindo, de nome científico *Tamarindus indica L*, originário na África e comum no Nordeste brasileiro. Tal fruta possui propriedades nutricionais e medicinais que são muito bem-vindas na alimentação das pessoas. A árvore do tamarindo é bastante plantada nas cidades nordestinas por gerar grandes sombras e embelezar as ruas da cidade, a fermentação dessa fruta para a produção do vinagre pode ser um meio de evitar o desperdício (BESSA, 2018).

Na produção de vinagre, são necessários dois processos fermentativos, o primeiro é a fermentação alcoólica realizada por leveduras, esses microrganismos metabolizam os açúcares presentes na poupa do vinagre como substrato e produzem, prioritariamente, etanol e outros metabólitos. O segundo processo é a fermentação acética, realizada por bactérias que metabolizam o etanol produzido pelas leveduras e excretam o ácido acético, principal componente característico do vinagre (BORTOLINI et al., 2001).

As bactérias acéticas são conhecidas por serem agentes deteriorantes, principalmente no ramo de bebidas. Seus dois maiores gêneros são: *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Essas bactérias podem ser aplicadas industrialmente para a síntese de vitamina C mas, nacionalmente, sua maior aplicação é para a produção de vinagre realizando a fermentação acética (OLIVEIRA et al., 2010).

Com o objetivo de produzir vinagres mais especiais e diversificados, o trabalho traz a proposta de isolar bactérias de um fermentador acético, realizar a triagem dessas bactérias por meio de análises microbiológicas para, posteriormente, analisar as diferenças no resultado da fermentação acética entre os diferentes conjuntos de bactérias que realizaram a fermentação.

MATERIAIS E MÉTODOS

As bactérias acéticas foram coletadas de fermentador submerso de vinagre que operavam em concentração total variando de 6 a 10%. A capacidade do fermentador piloto instalado nas dependências do laboratório de análise de alimentos, do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina é de seis litros e no momento da coleta estava operando com álcool de cereal (milho) e o produto formado era vinagre de milho. Alíquota de 50 mL de amostra foram inoculadas em caldo MYP. A formulação do meio é de 25g/L de manitol, 5g/L de extrato de levedura e 3g/L de peptona, mantidos por 48 horas em agitador orbital a 30°C. Foram preparadas placas com meio MYP em dupla camada, a camada inferior com meio MYP com 0,5% de ágar e a camada superior com 1,0% de ágar. Sobre as placas foi vertida alíquota de 0,1 mL da amostra vindas do caldo do MYP com o inóculo do fermentador e espalhadas com alça de drigalski. As placas foram mantidas em estufa BOD a 30°C por 96 horas e as bactérias crescidas após esse tempo foram isoladas pela técnica de esgotamento em placas de meio MYP

dupla camada. Para a purificação das bactérias, esse processo se repetiu por, no mínimo, quatro vezes para cada bactéria encontrada (SPINOSA, 2002).

Após o isolamento e purificação das bactérias, foram identificadas fenotipicamente e a classificação em nível de gênero. Iniciou-se pela coloração de gram e para a identificação fenotípica foram testadas as seguintes provas bioquímicas: produção de catalase, produção de ácido a partir de glicose, produção de dihidroxiacetona a partir de glicerol, produção de indol a partir do triptofano, produção de pigmento marrom, produção de celulose e produção de exopolissacarídeos a partir da glicose. Para a identificação em nível de gênero, as análises foram a oxidação do etanol e oxidação de lactato e acetato (SPINOSA, 2002).

Após a triagem das bactérias, foi feito um teste com as bactérias inoculadas em meio Carr com diferentes concentrações de etanol, de 0 a 14% de etanol, com o intuito de observar qual a capacidade de oxidação do etanol das bactérias isoladas (SPINOSA, 2002).

A Tabela 1 apresenta as composições dos meios de cultura feitos para cada análise microbiológica.

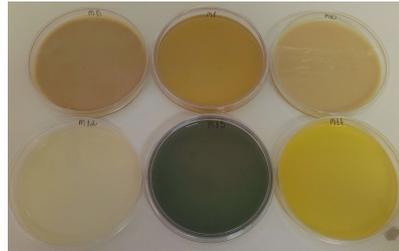
Tabela 1 – Composições dos meios utilizados.

Meio de cultura	Percentual (m/v)
M6 – produção de ácido a partir de glicose	Extrato de levedura 3%
	Glicose 10%
	Carbonato de cálcio 3%
	Ágar 2%
M7 – produção de dihidroxiacetona a partir de glicerol	Extrato de levedura 3%
	Glicerol 3%
	Ágar 2%
M8 – produção de indol a partir do triptofano	Triptona 1%
M10 – produção de pigmento marrom	Extrato de levedura 2%
	Glicose 2%
	Carbonato de cálcio 2%
	Ágar 2%
M11 – HS produção de celulose	Glicose 2%
	Extrato de levedura 0,5%
	Peptona 0,5%
	Na ₂ HPO ₄ 0,27%
	Ácido cítrico 0,115%
M12 – glucanato contendo sacarose	Glucanato de sódio 2%
	Extrato de levedura 0,3%
	Peptona 0,2%
	Glicerol 0,3%
	Manitol 1%
	Sacarose 8%
M13 – meio Carr, oxidação do etanol	Ágar 2%
	Extrato de levedura 3%
	Etanol 2%
	Verde de bromocresol 0,0022%
	Ágar 2%
M14 – DSM, oxidação de lactato a acetato	Proteose peptona 0,1%
	Extrato de levedura 0,3%
	Lactato de cálcio 1,5%
	Dextrose 0,1%
	Sorbitol 0,1%
	Manitol 0,2%
	KH ₂ PO ₄ 0,1%
MnSO ₄ 0,002%	

Meio de cultura	Percentual (m/v)
	Púrpura de bromocresol 0,003%
	Cicloheximida 0,0004%
	Ágar 1,5%

Fonte: Spinosa, 2002.

Figura 1 – Meios de cultura para as análises.



Fonte: A autoria própria.

RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na Tabela 2 e Figura 2. As provas testaram a produção de ácido a partir de glicose, indol negativo a partir do triptofano, oxidação de lactato e produção de ácido acético a partir do etanol. As duas últimas provas citadas, anteriormente, classificam as bactérias isoladas a nível de gênero.

Bactérias que superoxidam o etanol, ou seja, deixam a cor do meio Carr amarela depois de 96 horas e então deixam-na verde novamente são classificadas como *Acetobacter* enquanto que as bactérias que apenas oxidam, deixando a cor amarela mesmo depois de um longo tempo, são classificadas como *Gluconobacter*. A análise da oxidação de lactato é positiva para *Acetobacter* e negativa para *Gluconobacter*. Essas duas análises e a coloração de Gram sendo gram negativo e bastonetes definem as bactérias isoladas como bactérias acéticas (SPINOSA, 2002).

Figura 2 – Resultados das análises de produção de ácido a partir de glicose, indol a partir do triptofano, oxidação de lactato e oxidação do álcool.



Fonte: A autoria própria.

Tabela 2 – Resultados das análises microbiológicas para as 4 bactérias isoladas e purificadas.

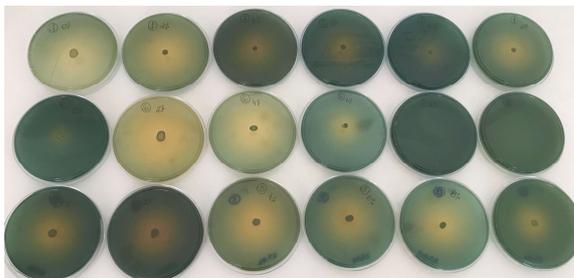
Análise	Bactéria 2	Bactéria 5	Bactéria 6	Bactéria 7
Coloração de gram	Cocobacilo G ⁻¹	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Catalase	+ ²	+	+	+
Ácido a partir de glicose	- ³	+	+	+
Ácido a partir do etanol	V-A ⁴	V-A-V ⁵	V-A-V	V-A-V
Oxidação de lactato	A ⁶	A-R ⁷	A-R	A-R
Produção de celulose	-	-	-	-
Produção de pigmento marrom	-	-	-	-
Produção de EPS	-	-	-	-
Produção de DHA	-	-	+	-

Fonte: Autoria própria.

¹ – Bactérias gram-negativas; ² – Análise com resultado positivo; ³ – Análise com resultado negativo; ⁴ – Transformação da cor verde para a cor amarela; ⁵ – Transformação da cor verde para a amarela e, novamente, para a cor verde; ⁶ – Meio permaneceu amarelo; ⁷ – Meio passou da cor amarela para a cor roxa.

Como resultado das análises realizadas, pode-se concluir que foram obtidas três bactérias do gênero *Acetobacters*: 5, 6 e 7 e apenas uma do gênero *Gluconobacter*: 2.

Figura 3 – Diferentes concentrações de etanol no meio Carr.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 3 apresenta o teste feito com o Meio de Cultura Carr com diferentes concentrações de etanol. As concentrações utilizadas foram de: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, e 14% de etanol. À esquerda da Figura 3 estão as concentrações mais baixas e à direita as maiores, sendo a maior de 10% nesta Figura 3, pois com 12 e 14% não houve oxidação. Sabendo que a cor amarela representa a oxidação do etanol a ácido acético, com base no alo formado nas placas, é possível ver até qual concentração de etanol as bactérias são resistentes e capazes de transformar o álcool presente no ambiente da fermentação em ácido característico do vinagre (SPINOSA, 2002).

Como conclusão dessa análise, tem-se que a maior concentração de etanol suportada pelas bactérias é de 10% e que, quanto maior é a concentração de etanol, menos oxidação é realizada e, conseqüentemente, menos fermentação também, provando a inibição causada pelo álcool para algumas bactérias acéticas.

CONCLUSÃO

As bactérias isoladas e purificadas do fermentador acético que produzia vinagre de milho, foram identificadas como sendo três delas *Acetobacter* e uma *Gluconobacter*. Também, pode-se afirmar que as bactérias encontradas são capazes de realizar a fermentação acética a partir de uma solução de, no máximo, 10% de etanol, caso contrário, ocorrerá a inibição destas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida para o projeto, à UTFPR e à UEL pela infraestrutura e reagentes utilizados.

REFERÊNCIAS

BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRER, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acéticas de sucos de kiwi (*Actindia deliciosa*); composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 236 – 243, mai./ago. 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000200020. Acesso em: 28 jul. 2019.

BESSA, M. M.; SILVA, A. G. F. Elaboração e Caracterização físico-química e sensorial de iogurte prebiótico de tamarindo. **Instituto Lactínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 73, n.4, p. 185-195, out./dez. 2018. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/581>. Acesso em: 25 jul. 2019.

OLIVEIRA, A. L. D.; SANTOS JUNIOR, V.; LIOTTI, R. G.; ZILIOLI, E.; SPINOSA, W. A.; RIBEIRO-PAES, J. T.; Estudo de bactérias do gênero *Gluconobacter*: isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.1, p. 106-112, jan./mar. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612010000100016&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 20 jul. 2019.

SPINOSA, W. A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. 2002. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/256613>. Acesso em: 20 jun. 2018.