

PRODUÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO, ETANOL E DOS ISÔMEROS ÓTICOS DO ÁCIDO LÁTICO POR LINHAGENS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DE FERMENTAÇÕES ALCOÓLICAS INDUSTRIAIS

Production of acetic acid, ethanol and optical isomers of lactic acid by *Lactobacillus* strains isolated from industrial ethanol fermentations

Vanessa Moreira Costa¹, Thiago Olitta Basso², Luis Henrique Poletto Angeloni³,
Marília Oetterer⁴, Luiz Carlos Basso⁵

RESUMO

Avaliaram-se no presente trabalho, as produções de etanol e dos ácidos acético e lático, bem como das proporções dos isômeros óticos D(-) e L(+) desse último, por 17 linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações industriais de produção de etanol. As linhagens foram crescidas a 32°C por 24 horas, em meio contendo 1% de glicose, 1% de frutose, 1% de extrato de levedura, sais nutrientes (K, Mg e Mn) e tampão fosfato. Foram estimados os teores de ácido lático, ácido acético e etanol mediante cromatografia líquida de alta eficiência, assim como dos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido lático mediante espectrofotometria ao ultra-violeta, empregando desidrogenases lácticas estereoespecíficas. O crescimento bacteriano foi inferido pela absorvância a 600 nm. Os resultados obtidos mostraram, pelos perfis de excreção dos metabólitos, a presença de 8 linhagens homofermentativas obrigatórias (produzindo unicamente ácido lático), 8 linhagens heterofermentativas obrigatórias (com produções de ácidos lático, acético e etanol) e 1 linhagem supostamente heterofermentativa facultativa. Observou-se também, em relação à formação dos estereoisômeros, que 12 linhagens foram incluídas no grupo DL, 4 no grupo L e 1 no grupo D. Os resultados permitem concluir que os *Lactobacillus* que contaminam processos fermentativos industriais de produção de etanol, podem se apresentar nos 3 biotipos fermentativos e produzindo as mais variadas proporções dos dois estereoisômeros do ácido lático, com relevantes implicações biotecnológicas. Este é o primeiro relato sobre as produções dos isômeros óticos do ácido lático por bactérias do gênero *Lactobacillus* isoladas de fermentações industriais baseadas na cana-de-açúcar.

Termos para indexação: *Lactobacillus*, Fermentações Homo- e Heterolática, Ácido Acético, Ácidos D(-) e L(+) Lático, Etanol.

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the metabolism type of 17 *Lactobacillus* strains isolated from industrial ethanol fermentation plants. The strains were grown at 32°C for 24 hours on a mixture of equal amounts of glucose and fructose as the carbon source, and supplemented with yeast extract, mineral nutrients and buffer. Bacterial growth was estimated by absorbance at 600nm and the main end products of bacterial metabolism (lactate, acetate and ethanol) were measured by high performance liquid chromatography, while the stereoisomers, D(-)- and L(+)-lactate, were assayed by an enzymatic methodology using stereospecific lactate-dehydrogenases. According to the results, all the three types of metabolism were found among the bacteria investigated: obligately homofermentative (8 strains), facultative heterofermentative (1 strain) and obligately heterofermentative (8 strains). The results have showed a predominance of DL strains regarding the stereoisomers production, but it was also found strains producing a single type of the isomeric form. These findings suggest the possibility to explore the lactobacilli biodiversity in fuel ethanol fermentation plants for lactate production of chemically pure optical isomers. This is the first report on lactic acid isomers formation by *Lactobacillus* strains isolated from sugar cane based-industrial fermentations.

Index terms: *Lactobacillus*, Homo- and Heterolactic fermentation, (-)-D and (+)-L Lactate, Acetate, Ethanol.

(Recebido em 10 de agosto 2006 e aprovado em 14 de setembro de 2007)

INTRODUÇÃO

A transformação de açúcar em lactato pelas bactérias lácticas (BLs) pode ser considerada o mais

importante processo fermentativo empregado na tecnologia dos alimentos e embora a conceituação sobre tais microrganismos venha sofrendo constantes alterações, é consenso as características Gram-positivas, forma de

¹Bacharel em Biologia – Fermentec Ltda – Av. Antônia Pizzinato Sturion, 1155 – 13420-640 – Piracicaba, SP – vcosta@fermentec.com.br; vansmc@hotmail.com.br

²Mestre em Biotecnologia – Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, USP-IPT-I BUTANTAN, São Paulo, SP – Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 20 – Cx. P. 61.548 – 05424-970 – São Paulo, SP – thiagobasso@usp.br

³Bacharel em Biologia, Depto de Ciências Biológicas – ESALQ – Universidade de São Paulo – Av. Pádua Dias, 11 – Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – angeloni@esalq.usp.br

⁴Professora Doutora do Departamento de Agroindústria – Alimentos e Nutrição – ESALQ – Universidade de São Paulo – Av. Pádua Dias, 11, Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – moettere@esalq.usp.br

⁵Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas – ESALQ – Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11 – Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – lucbasso@esalq.usp.br

cocos ou bastonetes, não formadoras de esporos, microaerofílicas e tendo o ácido láctico como principal produto (KANDLER, 1983). No *lato sensu* congregam vários gêneros sendo que o *Lactobacillus* encerra o maior número de espécies, tolerantes a meios ácidos e freqüentemente associadas às fermentações de frutas, hortaliças, laticínios, carnes, etc. (KANDLER, 1983; KANDLER & WEISS, 1986; YOKOYA et al., 1997). Podem também congregam grupos distintos quanto ao metabolismo degradativo das hexoses, ou seja, homo- e heterofermentativos (KANDLER, 1983; KANDLER & WEISS, 1986). Os *Lactobacillus* representaram a maioria dos isolados bacterianos de ambiente industrial de produção de etanol (GALLO, 1990; SKINNER & LEATHERS, 2004), onde a contaminação bacteriana é responsável por vários problemas operacionais como queda de rendimento, floculação e morte da levedura (AMORIM & OLIVEIRA, 1982; SERRA et al., 1979; YOKOYA et al., 1997).

As diferenças nas atividades enzimáticas de desidrogenases de lactato estereoespecíficas (GARVIE, 1980; KANDLER, 1983; VIANA et al., 2005), assim como, em alguns casos a presença de racemase (GOFFIN et al., 2005), permitem a produção dos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico, em diferentes proporções, sendo tais parâmetros utilizados com finalidades taxonômicas para identificação de linhagens de LBs (MANOME et al., 1998). Outros interesses nas proporções dos isômeros do lactato seriam na produção de ácido polilático, plástico versátil e biodegradável (HOFVENDAHL & HAHN-HAGERDAL, 2000; ZHOU et al., 2003) e na recomendação do incremento do isômero L(+) nos alimentos fermentados destinados à alimentação humana (GARMINIE et al., 2005; KANDLER, 1983; PANESAR et al., 2007). Adicionalmente, metabólitos bacterianos têm sido empregados como indicadores da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica, tanto o lactato (ALVES, 1994; NARENDRANATH et al., 1997), como recentemente o manitol (EGGLESTON et al., 2007). Tais considerações motivaram o presente trabalho em que objetivou-se a avaliação de *Lactobacillus* isolados de ambiente industrial quanto às produções de ácido acético, etanol e dos isômeros D(-) e L(+) do ácido láctico, na busca de um indicador bioquímico da contaminação bacteriana.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e crescimento: foram utilizadas 17 linhagens de *Lactobacillus*, isoladas de processos industriais de produção de etanol, pertencentes à coleção da Fermentec Ltda. (Piracicaba) e mantidas na forma liofilizada. Após reativação a 32°C por 24 horas em 5 mL de meio MRS, 0,1 mL da suspensão foram inoculadas em 5 mL de meio de cultivo líquido (pH=6,5) contendo 0,5% peptona,

1% glicose, 1% frutose, 0,5% extrato de levedura, 0,2% K_2HPO_4 , 0,02% $MgSO_4$ e 0,001% $MnSO_4$. Após metabolização por 24 horas a 32°C, amostras foram removidas e imediatamente analisadas quanto ao crescimento mediante plaqueamento e absorvância a 600 nm, enquanto outra porção foi armazenada a -20°C para as análises químicas. **Ácido láctico (total), ácido acético e etanol:** as amostras foram degeladas, centrifugadas (5000 x g, por 15 minutos), diluídas (1:10) e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se o Cromatógrafo CG-480C, com detector de índice, conforme Alves (1994). **Isômeros D(-) e L(+) do ácido láctico:** a discriminação dos isômeros óticos foi obtida mediante reações enzimáticas empregando-se desidrogenases láctica estereoespecíficas, mediante espectrofotometria ao UV, empregando o sistema de reações Cat. No. 11112821035 da Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG (D-64293, Darmstadt).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com diferentes propósitos taxonômicos e biotecnológicos, *Lactobacilli* já foram avaliados e se mostraram tanto com metabolismo homo- como heterofermentativo (HOFVENDAHL & HAHN-HAGERDAL, 2000; KANDLER, 1983). Os resultados obtidos mostram que as linhagens de *Lactobacillus* FT059B, FT085B, FT086B, FT243B, FT260B, FT337B, FT382B e FT401B (Tabela 1) podem ser consideradas do tipo metabólico homofermentativo obrigatório, pois se mostraram produtoras, quase que unicamente, de lactato. As produções de acetato estão no limite de detecção da metodologia empregada, de sorte que se pode afirmar, do ponto de vista prático, que o lactato foi o único produto observado nessa análise que visava também à quantificação de acetato e etanol. Segundo Kandler & Weiss (1986) nesse tipo metabólico as hexoses são convertidas quase exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof, sendo que 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico. Essas 8 linhagens representaram cerca de 50% da população avaliada e, curiosamente, todas as espécies de *L. plantarum* foram incluídas nesse tipo metabólico, em concordância com o que já foi observado para *L. plantarum* H4 (HOFVENDAHL & HAHN-HAGERDAL, 2000).

A linhagem FT209B produziu quantidades pequenas, porém mensuráveis de ácido acético e etanol, valores esses dentro dos limites de detecção da metodologia empregada (Tabela 1). Assim pode-se especular que tal linhagem pertença ao grupo das heterofermentativas facultativas. Tal grupo apresenta a característica de se comportar como heterofermentativa (produzindo acetato e etanol) quando em condições de limitação de glicose (KANDLER & WEISS, 1986). Dessa forma, na fase final de crescimento, sob

limitação de glicose no meio, a linhagem FT209B poderia ter dirigido o seu metabolismo para a produção de acetato e etanol, conjuntamente ao lactato.

Por outro lado, as linhagens FT008B, FT124B, FT188B, FT282B, FT292B, FT383, FT421B e FT432B, que produziram além de lactato, o ácido acético e o etanol como produtos finais, podem ser classificadas como do tipo heterofermentativo obrigatório (Tabela 1), pois, nesse tipo de metabolismo, as bactérias utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfoacetolase para a fermentação de hexoses, que em condições de anaerobiose são convertidas em quantidades equimolares de ácido láctico e etanol + acetato (KANDLER, 1983). De fato observa-se uma estequiometria balanceada, ou seja, a soma dos teores de acetato e etanol e de aproximadamente 80% da de lactato. Outro aspecto interessante vem a ser a relação estequiométrica de cerca de 1:1 entre acetato e etanol produzidos (Tabela 1). Observa-se que todas as linhagens de *L. fermentum* avaliadas se enquadraram no grupo heterofermentativo, como também

observado para a linhagem *L. fermentum* NRRL-B-1932 por Weymarn et al. (2002).

O gênero *Lactobacillus* foi o mais abundante entre os isolados bacterianos de ambiente de destilaria, especificamente de vinho bruto (GALLO, 1990) e os resultados obtidos mostram que no processo fermentativo industrial de produção de etanol coexistem as linhagens homo- e heterofermentativas em proporções quase idênticas (Tabela 1). Como o ácido acético é mais tóxico que o láctico (GUTIERREZ et al., 1991; MAIORELLA et al., 1983; NODA et al., 1980; PAMPULHA & LOUREIRO, 1989), pode-se inferir que as bactérias heterofermentativas possam exercer uma ação tóxica mais pronunciada que as homofermentativas sobre as leveduras durante a fermentação alcoólica, pois essas não produzem ácido acético.

Correlações entre o crescimento das diferentes linhagens e os teores finais de ácido láctico produzidos mostraram resultados distintos para os dois tipos de metabolismo, sendo praticamente inexistente no grupo

Tabela 1 – Valores médios e respectivos desvios-padrões das concentrações dos ácidos láctico e acético e de etanol (mM), bem como a densidade ótica (DO₆₀₀) após 24 horas de crescimento.

Código	Espécie	Ac. Láctico (mM)	Ac. Acético (mM)	Etanol (mM)	DO (600nm)
FT008B	<i>L. fermentum</i>	59,3 ± 6,32	25,4 ± 2,30	25,6 ± 2,29	2,36 ± 0,05
FT059B	<i>L. plantarum</i>	97,9 ± 6,17	2,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,97 ± 0,51
FT085B	<i>L. plantarum</i>	67,6 ± 8,02	1,7 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,60 ± 0,06
FT086B	<i>L. plantarum</i>	120,0 ± 10,7	2,7 ± 0,97	0,0 ± 0,00	2,57 ± 0,09
FT124B	<i>L. fermentum</i>	54,8 ± 6,98	23,6 ± 2,52	23,3 ± 3,13	2,30 ± 0,02
FT188B	<i>L. buchneri</i>	64,8 ± 5,48	27,1 ± 9,93	27,3 ± 2,59	2,22 ± 0,09
FT209B	<i>L. vaccinostercus</i>	67,9 ± 6,11	9,0 ± 3,09	2,37 ± 1,12	1,52 ± 0,20
FT243B	<i>L. fructosus</i>	61,4 ± 1,64	1,9 ± 0,48	0,0 ± 0,00	0,94 ± 0,03
FT260B	<i>L. coryniformis</i>	59,1 ± 9,79	1,9 ± 0,48	0,0 ± 0,00	1,13 ± 0,24
FT282B	<i>L. fermentum</i>	61,5 ± 2,03	25,9 ± 0,87	26,2 ± 0,69	2,50 ± 0,06
FT292B	<i>L. fermentum</i>	66,4 ± 2,88	28,0 ± 1,38	28,1 ± 1,55	2,46 ± 0,02
FT337B	<i>L. plantarum</i>	100,2 ± 14,8	2,2 ± 0,97	0,0 ± 0,00	1,85 ± 0,15
FT382B	<i>L. plantarum</i>	72,1 ± 4,95	3,1 ± 0,67	0,0 ± 0,00	1,02 ± 0,04
FT383B	<i>L. fructosus</i>	62,9 ± 3,40	19,8 ± 0,74	28,5 ± 2,80	1,43 ± 0,08
FT401B	<i>L. fructivorans</i>	98,7 ± 8,54	3,0 ± 0,48	0,0 ± 0,00	1,91 ± 0,09
FT421B	<i>L. fructivorans</i>	59,1 ± 3,13	23,8 ± 0,70	23,6 ± 1,50	1,44 ± 0,12
FT432B	<i>L. fructosus</i>	59,4 ± 4,31	25,3 ± 0,47	20,7 ± 2,44	1,38 ± 0,08

das heterofermentativas (Figura 1). Nas linhagens heterofermentativas, a formação de lactato a partir da fonte de carbono é restringida pelo desvio do esqueleto carbônico para acetato e etanol, o que não ocorre com as homofermentativas, podendo resultar que, para um mesmo crescimento em biomassa bacteriana, correspondam valores bem distintos de lactato produzido, conforme observado para as linhagens FT008B e FT086B na Tabela 1.

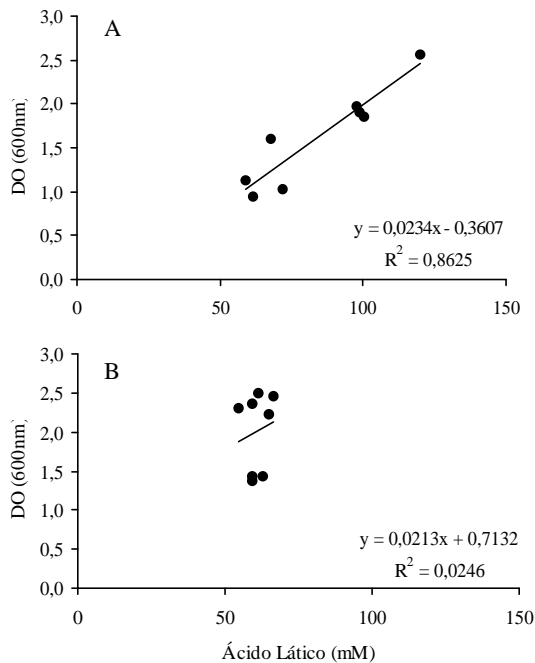


Figura 1 – Correlação linear entre crescimento bacteriano (DO_{600}) e teores de ácido lático (mM). A: bactérias homofermentativas; B: bactérias heterofermentativas.

A redução enzimática do piruvato a lactato é processada por desidrogenases estereoespecíficas, sendo que o L(+)-lactato é formado pela enzima LdhL (EC 1.1.1.27) enquanto o D(-)-lactato é formado pela enzima análoga LdhD (1.1.1.28), permitindo que as BLs possam ser agrupadas de acordo com a proporção dos isômeros produzidos (GARVIE 1980; KANDLER, 1983; MANOME et al., 1998; VIANA et al., 2005). Assim as BLs podem ser divididas entre aquelas que produzem mais de 75% do isômero L(+)-lactato, sendo referidas como do tipo L; as que produzem mais que 75% do isômero D(-)-lactato, referidas como tipo D; ou aquelas que produzem os dois isômeros em proporções intermediárias, classificadas como tipo DL (MANOME et al., 1998).

Observou-se, no presente estudo, apenas uma linhagem do tipo D (FT124B), quatro linhagens do tipo L (FT085B, FT243B, FT260B e FT382B) e 12 linhagens do

tipo DL (Tabela 2), em conformidade com os dados de Garvie (1980) e Manome et al. (1998) que igualmente observaram predominância das linhagens DL. Adicionalmente, foram encontradas linhagens bacterianas produzindo isômeros opticamente puros, tanto L(+) como D(-)-lactato, podendo se prestar para finalidades biotecnológicas que requeiram proporções definidas dos estereoisômeros (PANESAR et al., 2007; ZHOU et al., 2005).

As correlações entre o crescimento bacteriano (DO_{600}) e a formação de ácido lático, considerando-se o conjunto das linhagens avaliadas, foram positivas para o lactato total (soma dos isômeros) e para o D(-)-lactato (Figura 2), mas negativa para o isômero L(+), sugerindo

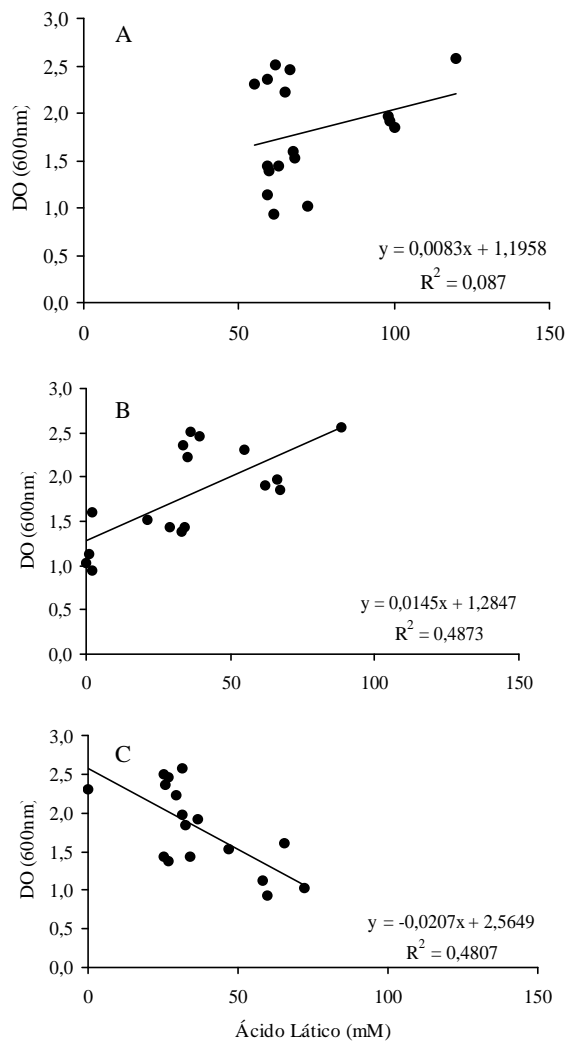


Figura 2 – Correlação linear entre crescimento bacteriano (DO_{600}) e teores de ácido lático (mM). A: ácido lático total; B: ácido D(-)-lático; C: ácido L(+)-lático.

Tabela 2 – Valores médios e respectivos desvios-padrões das concentrações do ácido láctico total, bem como de seus isômeros D(-) e L(+)-lactato após 24 horas de crescimento.

Código	Espécie	Ac. Láctico (mM)	D(-)-Lactato (%)	L(+)-Lactato (%)	Tipo do Metabolismo*
FT008B	<i>L. fermentum</i>	59,3 ± 6,32	56,9 ± 1,01	43,0 ± 1,01	Hetero (DL)
FT059B	<i>L. plantarum</i>	97,9 ± 6,17	67,7 ± 2,04	32,2 ± 2,04	Homo (DL)
FT085B	<i>L. plantarum</i>	67,6 ± 8,02	2,77 ± 0,70	97,2 ± 0,70	Homo (L)
FT086B	<i>L. plantarum</i>	120,0 ± 10,7	73,7 ± 1,82	26,2 ± 1,82	Homo (DL)
FT124B	<i>L. fermentum</i>	54,8 ± 6,98	100,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	Hetero (D)
FT188B	<i>L. buchneri</i>	64,8 ± 5,48	54,3 ± 0,20	45,7 ± 0,20	Hetero (DL)
FT209B	<i>L. vaccinostercus</i>	67,9 ± 6,11	29,9 ± 14,3	70,1 ± 14,3	Hetero** (DL)
FT243B	<i>L. fructosus</i>	61,4 ± 1,64	3,43 ± 1,24	96,5 ± 1,24	Homo (L)
FT260B	<i>L. coryniformis</i>	59,1 ± 9,79	1,30 ± 1,18	98,7 ± 1,18	Homo (L)
FT282B	<i>L. fermentum</i>	61,5 ± 2,03	59,1 ± 2,55	40,8 ± 2,55	Hetero (DL)
FT292B	<i>L. fermentum</i>	66,4 ± 2,88	60,0 ± 1,18	40,0 ± 1,18	Hetero (DL)
FT337B	<i>L. plantarum</i>	100,0 ± 14,8	67,2 ± 1,57	32,8 ± 1,57	Homo (DL)
FT382B	<i>L. plantarum</i>	72,1 ± 4,95	0,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	Homo (L)
FT383B	<i>L. fructosus</i>	62,9 ± 3,40	46,3 ± 1,69	53,6 ± 1,69	Hetero (DL)
FT401B	<i>L. fructivorans</i>	98,7 ± 8,54	62,5 ± 1,82	37,4 ± 1,82	Homo (DL)
FT421B	<i>L. fructivorans</i>	59,1 ± 3,13	57,4 ± 0,95	42,6 ± 0,95	Hetero (DL)
FT432B	<i>L. fructosus</i>	59,4 ± 4,31	55,2 ± 2,65	44,8 ± 2,65	Hetero (DL)

*O tipo do metabolismo, homofermentativo (homo) ou heterofermentativo (hetero) é deduzido pelas produções de acetato e/ou etanol, no presente estudo (Tabela 1).

**Metabolismo heterofermentativo facultativo.

que, na ocorrência de uma população bacteriana flutuante, tal parâmetro pode não refletir a magnitude da contaminação bacteriana.

CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que as espécies e linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, isoladas de processos industriais de produção de etanol, congregam os tipos metabólicos homofermentativo obrigatório e heterofermentativos facultativo e obrigatório, sugerindo que a dosagem de ácido láctico, como indicadora da contaminação, seja considerada com reservas. Adicionalmente, a utilização dos teores do isômero ótico L(+) do ácido láctico para essa finalidade é ainda mais limitada quando da presença de uma biodiversidade bacteriana. Em relação às formas isoméricas do ácido láctico, observou-se

predominância de linhagens qualificadas como DL, ou seja, formadores dos dois isômeros óticos, L(+) e D(-) lactato, mas linhagens de *Lactobacillus*, produtoras de isômeros óticamente puros, podem ser isoladas de processos industriais para atender a outras finalidades biotecnológicas.

AGRADECIMENTOS

À Fermentec Ltda (Piracicaba, SP), pelo apoio financeiro e concessão das linhagens bacterianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** 1994. 251 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982.
- EGGLESTON, G.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; PAULILLO, S. C. D.; BASSO, T. O. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **Zuckerindustrie**, Berlin, v. 132, n. 1, p. 33-39, 2007.
- GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1990. 338 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1990.
- GARMIENE, G.; SAIKAUSKIENE, V.; KULIKAUSKIENE, M. Lactic acid isomers in milk products. **Milk Science International**, Kempten, v. 60, n. 3, p. 259-262, 2005.
- GARVIE, E. I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 44, p. 106-139, 1980.
- GOFFIN, P.; DEGHORAIN, M.; MAINARDI, J. L.; TYTGAT, I.; CHAMPOMIER-VERGE'S, M. C.; KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P. Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 19, p. 6750-6761, 2005.
- GUTIERREZ, L. E.; ANNICHINO, A. V. K. O.; LUCATTI, L.; STIPP, J. M. S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 34, n. 2, p. 235-242, 1991.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 26, p. 87-107, 2000.
- KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 49, p. 209-224, 1983.
- KANDLER, O.; WEISS, N. *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1209-1234.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, p. 103-121, 1983.
- MANOME, A.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, Curitiba, v. 44, p. 371-374, 1998.
- NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of *Lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4158-4163, 1997.
- NODA, F.; HAYASHI, K.; MIZUNUMA, T. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeast in brine fermentation of soy sauce. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 40, p. 452-457, 1980.
- PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic-acid and ethanol on inhibition of fermentation in *saccharomyces-cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, London, v. 11, n. 4, p. 269-274, 1989.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; KOSSEVA, M. R. Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 1, p. 35-42, 2007.
- SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. T. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 6, p. 26-31, 1979.
- SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 31, n. 9, p. 401-408, 2004.
- VIANA, R.; YEBRA, M. J.; GALAN, J. L.; MONEDERO, V.; PEREZ-MARTINEZ, G. Pleiotropic effects of lactate dehydrogenase inactivation in *Lactobacillus casei*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 5/6, p. 641-649, 2005.
- WEYMARN, N.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 1207-1213, 2002.

YOKOYA, F.; MANFIO, G. P.; VARIANE, S. F. **Curso de treinamento:** bactérias lácticas na fermentação alcoólica. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1997. 167 p.

ZHOU, S.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Functional replacement of the Escherichia coli D(-)-lactate dehydrogenase gene (ldhA) with the L(+)-lactate

dehydrogenase gene (ldhL) from Pediococcus acidilactici. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, n. 4, p. 2237-2244, 2003.

ZHOU, S.; YOMANO, L. P.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Fermentation of 10% (w/v) sugar to D(-)-lactate by engineered Escherichia coli B. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 23/24, p. 1891-1896, 2005.