

Desenvolvimento de um meio de cultura seletivo para o *Lactobacillus fermentum*.

Rodrigo Chohfi Castelli (IC) e José Luiz Caldas Wolff (Orientador)

Apoio: PIVIC Mackenzie

RESUMO

Um dos problemas mais importantes ligados à produção em larga escala de biocombustível é a contaminação bacteriana nas dornas de fermentação, embora a população bacteriana nas dornas em geral ser complexa, a predominância de alguns microrganismos é comum, entre estes o *Lactobacillus fermentum*, uma bactéria láctica heterofermentativa, que pode causar sérios problemas no processo fermentativo alcoólico. Para estudos aprofundados sobre esta espécie bacteriana e sua relação com a fermentação em dornas, métodos que facilitem o isolamento da mesma são necessários para aumentar a gama de conhecimento na área, portanto, o objetivo deste trabalho foi de criar um meio seletivo para facilitar o isolamento de *L. fermentum*.

O meio apresentado teve como base o meio criado por Gao, cunhado pelo mesmo de “meio econômico. As mudanças feitas no mesmo foram: variações no pH; alterações nas concentrações de sal; e mudança na fonte de carbono fermentável.

O crescimento de *L. fermentum* foi mais eficaz na concentração 5% de manitol, o pH do meio em que o crescimento foi mais efetivo foi o de 5.0, e a salinidade que apresentou maior seletividade foi entre 5% e 6% . Apesar do crescimento em meio líquido ter ocorrido , não foi observado crescimento de *L. fermentum* em meio sólido.

É necessária uma maior gama de conhecimento sobre as reações presentes nos compostos utilizados para a criação do meio seletivo para *L. fermentum*, assim como testar diferentes características para a seleção desta espécie que não foram realizadas neste experimento.

Palavras-chave: *L. fermentum*; fermentação; crescimento.

ABSTRACT

One of the biggest problems involved in the large scale production of biofuel is the bacterial contamination in fermentation domes, despite the bacterial population complexity, the predominance of some microorganisms is common, among these the *Lactobacillus fermentum* an heterofermentative lactic acid bacteria that can cause serious problems in the alcoholic fermentative process. For in-depth studies of this bacterial species and its relation to fermentation process in domes, facilitating processes of *L.fermentum* isolation become necessary to improve the range of knowledge in this area. Thus, the goal of the work in question is to create a selective medium to facilitate the isolation of *L.fermentum*.

The presented medium took Gao's medium as bases, which was dubbed by himself as "economic medium". Alterations made in the medium were: a range of pH variations; a range of salt concentrations; and an alteration in the fermentative carbon source.

The efficacy of *L.fermentum* growth was best in the 5% concentration of mannitol, the best pH for growth was 5.0, and the salt concentration that displayed the most selectivity was between 5% and 6%.Despite the presence of growth in the broth medium, when added agar in the solution, it ceased to present growth of the bacteria at hand.

A deeper depth of knowledge about the reactions present in compounds utilized for the creation of the medium and its relation to the *L.fermentum* metabolism, is necessary, as well as testing of different characteristics to select the species, that were not present in this study. **Keywords:** fermentation; *L.fermentum*; medium

1. INTRODUÇÃO

É de conhecimento geral que quaisquer meios de transporte são dependentes de combustíveis fósseis, em especial combustíveis derivados de petróleo tais como gás natural prensado, gasolina e diesel, porém é contra intuitivo se pensar que os principais combustíveis utilizados são aqueles que apresentam um limite com relação a sua capacidade, e também possuem efeitos nocivos ao ambiente proporcionais a sua quantia de utilização (DERMIBAS, 2009). Devido a estes fatores a pesquisa e utilização de biocombustíveis teve um grande crescimento nos últimos 15 anos (GUO et al., 2015). O Brasil é um dos maiores produtores de etanol do mundo, estando em primeiro lugar até o ano de 2005 (DERMIBAS, 2009), tendo assim uma grande dependência econômica ligada à produção de biocombustíveis, assim como evidencia Hofstrand (2015).

Um dos problemas mais importantes ligados à produção em larga escala de biocombustível é a contaminação bacteriana nas dornas de fermentação. Embora a população bacteriana nas dornas em geral possa ser complexa, observa-se a predominância marcante de alguns microrganismos. Dentre eles destaca-se o *Lactobacillus fermentum* (VAN BEEK; PRIEST, 2003). Estudos mostram que esta bactéria láctica heterofermentativa, abundante no ambiente, pode causar sérios problemas no processo fermentativo alcoólico (BASSO et al., 2014). O isolamento e multiplicação das bactérias contaminantes desse processo são usualmente feitos com o ágar MRS (DE MAN et al., 1960), um meio que permite o crescimento de bactérias do ácido láctico em geral, o que inclui os lactobacilos e membros de outros grupos bacterianos.

Gao et al.(2009) desenvolveram um meio alternativo para o crescimento de lactobacilos. Esse meio, que provou-se adequado para o crescimento de *L. fermentum*, é chamado de “meio econômico”, devido ao seu baixo custo. No entanto, ainda não foi desenvolvido um meio que facilite o isolamento de *L. fermentum*. Tal meio de cultura, seria de grande interesse para a avaliação da contaminação por *L. fermentum* nas dornas de fermentação. Além disso, esse meio também seria de

interesse para outros tipos de investigação com *L. fermentum*, pois, essa espécie é considerada probiótica (GAO et al., 2009).

2.REFERENCIAL TEÓRICO

Lactobacilos são bastonetes gram-positivos, não produtores de endósporos e catalase positivos (HAMMES; HERTEL, 2009). Esses organismos são anaeróbios facultativos e usam açúcares como fonte de carbono, sendo que pelo menos metade dos produtos finais da fermentação é constituída de ácido láctico (HAMMES; HERTEL, 2009). Outros produtos como acetato, etanol, gás carbônico, formato e succinato também podem ser produzidos (HAMMES; HERTEL, 2009). Os membros do gênero são classificados em três grupos fermentativos: A. Os homofermentativos obrigatórios (produzem exclusivamente ácido láctico); B. Heterofermentativo facultativo (podem produzir apenas ácido láctico ou ácido láctico e outros produtos; C.). Heterofermentativos obrigatórios (sempre produzem ácido láctico e outros produtos) (HAMMES; HERTEL, 2009).

Os lactobacilos são encontrados em muitos tipos de ambientes diferentes, onde haja disponibilidade de carboidratos. Por exemplo, fazem parte da microbiota humana, estão presentes em produtos lácteos, nas frutas e nos sucos de frutas, no solo e na água (FELIS; DELLAGLIO, 2007). Esses microrganismos não são considerados patogênicos e nos raros casos que são associados a alguma doença, sempre constata-se alguma condição que causou comprometimento imunológico (HAMMES; HERTEL, 2009).

A importância dos lactobacilos em geral, e do *L. fermentum* em particular, como contaminantes na produção de etanol é amplamente reconhecida (BASSO et al., 2011). A presença do *L. fermentum* nas dornas de fermentação foi detectada, por exemplo, no trabalho de doutorado de (GALLO, 1990), no qual foi determinada a microbiota bacteriana no mosto e em dornas de fermentação da Usina Costa Pinto, em Piracicaba, São Paulo. Neste trabalho foram isoladas 334 culturas bacterianas durante os meses de julho a dezembro de 1986. A identificação destas

culturas mostraram uma alta ocorrência de membros do gênero *Lactobacillus* (59,75%), *Bacillus* (26,56%) e *Staphylococcus* (8,76%) (GALLO, 1990). As espécies mais frequentes dentro do gênero *Lactobacillus* foram o *L. fermentum* e o *L. helveticus*, com a ocorrência de 15% e 14% da totalidade de espécies, respectivamente. A predominância de *L. fermentum* também foi observada em amostras de leveduras que haviam sido previamente utilizadas no processo fermentativo (OLIVA, 1990 *apud* CHERUBIN, 2003). Neste material, que é normalmente reutilizado após um tratamento com ácido sulfúrico para reduzir a carga bacteriana, foi constatado que *L. fermentum* era a espécie predominante com uma ocorrência de 62% entre as bactérias contaminantes (OLIVA, 1990 *apud* CHERUBIN, 2003). Embora *L. fermentum* não seja a única espécie de lactobacilos frequentemente encontrada nas dornas de fermentação, estudos recentes mostram evidenciam o alto potencial de dano apresentado por essa espécie heterofermentativa (BASSO et al., 2014).

No entanto, vale ressaltar que *L. fermentum* também pode ser uma espécie favorável ao homem. Por exemplo, estudos mostram que essas bactérias podem ser usadas como probióticos na criação de frangos, reduzindo a necessidade de administração de antibióticos (REQUE et al., 2000). Em outro estudo, (COX et al., 2010) foi demonstrado que a implantação de *L. fermentum* como suplemento alimentar para atletas causa uma redução significativa no número de problemas respiratórios. O efeito no sistema imunológico também foi observado por (WEST et al., 2011), em estudo que indica um aumento na concentração de substâncias anti-inflamatórias após a suplementação de *L. fermentum*. Além desses efeitos, o consumo desse microrganismo também pode resultar na redução do colesterol (PEREIRA et al., 2003).

A estratégia aqui proposta para o isolamento do *L. fermentum*, através do desenvolvimento de um meio de cultura seletivo, já foi aplicada por Bujulance et al. (2006), para *L. plantarum*. Nesse estudo, um meio de cultura suplementado com o antibiótico ciprofloxacina e com sorbitol como fonte de carbono foi eficiente no isolamento de *L. plantarum* de fezes humana (BUJULANCE et al., 2006). Outro exemplo da utilização de meios seletivos é no trabalho de (SULUTA et al., 2012), onde é desenvolvido um meio de cultura específico para o *L. casei* pela modificação do meio MRS (DE MAN, 1960).

3. METODOLOGIA

3.1. Material biológico

As cepas 4420 e 0840 de *L. fermentum* foram usadas nesse trabalho. Essa cepas foram adquiridas da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, em projeto anterior, e ambas originam-se de material coletado em usinas de produção de etanol. O Estoque das cepas são mantidos congelados a -80°C em meio de cultura suplementado com 15% de glicerol. Amostras desses estoques serão semeadas na superfície de placas de Petri (com meio econômico sólido) usando uma alça bacteriológica e a técnica de esgotamento. A placa será transferida para uma jarra de anaerobiose e mantida a 37°C por até 48 horas em uma estufa bacteriológica. As colônias que se formarem nas placas servirão de fonte de inóculo para os ensaios propostos no projeto.

3.2 Estimativas do número de células viáveis

A contagem bacteriana pelo método que estima unidades formadoras de colônias por mL foi empregada na avaliação da eficácia do meio modificado. A primeira etapa nesse procedimento é a diluição seriada do material analisado. Para isso, 450 µL de água salina peptonada será transferida de forma asséptica para 6 microtubos esterilizados. Esses tubos serão rotulados de 1 a 6. Um volume de 50 µL do material analisado será transferido para o tubo 1. Após homogeneização, 50 µL do material do tubo 1 será transferido para o tubo 2. Esse processo se repetirá até o tubo 6. Um volume de 60 µL de cada diluição será semeado de forma homogênea em placas de Petri contendo ágar MRS e incubado a 30 °C por até 48 horas em jarras de anaerobiose. A concentração bacteriana que foi determinada pela UFC/mL seguinte fórmula:
$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colônias} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume da diluição (mL)}}$$
 Será levado em consideração o fato que apenas uma fração do mL é usada na inoculação das placas.

3.3 Meio de cultura para o crescimento de *L. fermentum*

As cepas de *L. fermentum* foram multiplicadas no meio de cultura descrito por GAO et al., (2009). A composição desse meio de cultura, denominado “meio

econômico”, é apresentada na tabela 2. O “meio econômico” será modificado com o intuito de torná-lo um meio seletivo e de enriquecimento para *L. fermentum*.

Tabela 1 Composição do meio de cultura econômico

Composição do meio	Qtd. (em gramas)
Xarope de açúcar de milho	30
Glicose	15
Peptona	14,4
NH ₄ (2)SO ₄	7
Ureia	0,5
Acetato de sódio	3
Composição do meio	Qtd. (em gramas)
Citrato de sódio	4
MnSO ₄ .(4)H ₂ O	0,1
MgSO ₄ .(7)H ₂ O	0,5
Extrato de levedura	7,3
K ₂ HPO ₄	0,5

3.4 Modificações no meio econômico

3.4.1 Alterações no pH

Estudos anteriores de (SULE et al., 2014), mostraram que *L. fermentum* é uma espécie bastante resistente à acidez. Essa característica poderá ser útil no preparo de um meio de cultura seletivo, já que outras espécies de lactobacilos não são tão resistentes à acidez. O pH original do meio econômico é de 6,5. Nessa etapa do trabalho ocorreu a alteração do pH para os seguintes valores 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 e 6.0. O desempenho das duas cepas de *L. fermentum* nessas condições será avaliado (procedimento descrito abaixo, na seção 3.5).

3.4.2 Alterações na concentração de sal

Estudos anteriores de (ELIZETE et al., 2000) mostraram que a adição de até 4% de NaCl em meio MRS não resultou em redução significativa no crescimento de

L. fermentum, já em 8% houve uma redução de 100%. Novamente, como a tolerância à presença de NaCl é uma característica que varia entre as espécies, é provável que a adição de NaCl reduza o número de espécies capazes de se desenvolver no meio econômico. Nessa etapa do trabalho, o meio econômico foi preparado com as seguintes concentrações de NaCl: 3%, 4%, 5%, 6% e 7%. O desempenho das duas cepas de *L. fermentum* nessas condições será avaliado (procedimento descrito abaixo, na seção 3.5).

3.4.3 Alteração na fonte de carbono

A fonte de carbono do meio econômico é o xarope de milho e a glicose. Essas fontes foram substituídas pelo manitol, um carboidrato que *L. fermentum* tem capacidade bioquímica para utilizar (GAUTHIER et al., 1995). Vários lactobacilos comumente encontrados nas dornas de fermentação, como por exemplo: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei tolerans* e *Lactobacillus plantarum* não são capazes de utilizar manitol (MITAL; GARG, 1990; MCFEETERS; CHEN, 1986) e, conseqüentemente, não devem ser capazes de se multiplicar em meio cuja principal fonte de carbono será esse composto. A adequação da inclusão de diversas concentrações (10%, 20% e 30%) de manitol no meio econômico foi avaliada nas cepas 4420 e 0840 de *L. fermentum* (procedimento descrito abaixo, na seção 3.5).

3.5 Avaliações das modificações

Cada uma das modificações no meio econômico indicadas acima foram avaliadas usando duas linhagens de *L. fermentum* disponíveis no laboratório. Essas avaliações serão realizadas semeando uma mesma quantidade de *L. fermentum* em meio econômico original e no meio modificado. Um total de 5 mL do meio econômico e do meio testado foram preparados e transferidos para tubos de ensaio esterilizados. Cem microlitros de solução salina peptonada contendo *L. fermentum* foram transferido para esses tubos, após isso foram imediatamente transferidos para uma incubadora de bancada, com agitação. O crescimento da cultura no meio original e no meio modificado será avaliado após um período de crescimento de 24 e 48 horas. O crescimento da cultura será realizado a 37°C e com agitação de 120 RPM. Os testes realizados em triplicatas e o crescimento foram avaliados através

do aumento da turbidez avaliado pela absorvância medida a 600 nanômetros (OD^{600}).

3.6 Formulações do meio de cultura para isolamento de *L. fermentum*

O meio de cultura para isolamento do *L. fermentum* utilizará os fatores anteriormente testados: pH, fonte de carbono, concentração de NaCl e temperatura, para preparar um meio de cultura o crescimento de *L. fermentum* ao mesmo tempo que inibe o crescimento de outras espécies para um maior isolamento do mesmo.

3.7 Análises preliminar da efetividade do meio para o isolamento de *L. fermentum*

O meio econômico foi testado em um ensaio no qual sua capacidade para promover o crescimento de *L. fermentum* e de outras bactérias do ácido láctico será comparada com aquela do meio econômico. Para isso as culturas utilizadas de *L. fermentum* e de *L. plantarum* foram em fase exponencial de crescimento e caldo de cana, uma fonte de bactérias do ácido láctico. Um total de 100 μ L de inóculo proveniente das culturas e do caldo de cana foram semeados em 9,9 mL do meio de cultura modificado ou econômico (Tabela 2). Após a semeadura, as culturas foram incubadas sob agitação (90 rpm) em um agitador de bancada (modelo C24 incubator shaker, New Brunswick Scientific®) à 30°C por um período de 4 horas. A técnica que determina unidades formadoras de colônia foi utilizada para a avaliação do número de células viáveis no momento da inoculação e 4 horas após a inoculação. A expectativa inicial era de o meio modificado se mostre tão eficiente quanto o meio modificado na multiplicação da cultura de *L. fermentum*, mas, pouco eficaz na multiplicação de *L. plantarum* e das bactérias lácticas presentes no caldo de cana.

Tabela 2: Análise da eficácia do meio modificado

Tubo de ensaio	Material inoculado (100 µL)	Meio de cultura (9,9 mL)
1	<i>L. fermentum</i>	Modificado
2	<i>L. fermentum</i>	Econômico
3	<i>L. plantarum</i>	Modificado
4	<i>L. plantarum</i>	Econômico
5	Caldo de cana	Modificado
6	Caldo de cana	Econômico

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

O crescimento de *L.fermentum* foi presente nas concentrações 5%, 7,5% e 10% de manitol, tendo uma maior eficácia na concentração 5%, sendo esta a utilizada para todos os futuros experimentos. O pH do meio em que o crescimento foi existente e com maior eficiência foi o de 5.0, e a salinidade do meio que apresentou maior seletividade foi entre 5% e 6%, sendo assim, as modificações do meio econômico são: 5% manitol, pH 5.0 e salinidade de 6%.

Apesar do crescimento em meio líquido de bactéria de *L.fermentum* ser presente, quando adicionado ágar para a solidificação do mesmo, o crescimento de *L.fermentum* se torna nulo, mesmo se utilizando diferentes concentrações do agente solidificador.

O crescimento de *L.fermentum* quando comparada ao meio padrão MRS nos testes obteve resultados semelhantes, o pH que apresentou maior crescimento de biomassa bacteriana foi entre 5.0 e 5.5(LEBLANC et al.,2004), demonstrando assim uma semelhança com o meio manitol criado no estudo. Estudos indicando a criação de meios de cultura seletivos para uma ou poucas espécies são de difícil criação

devido a comportamentos inesperados entre determinadas substancias (SILVA et al., 2013), além do fato de que diferentes espécies bacterianas podem ter capacidade biosintética muito semelhante.

A adição de sal e provou ser um fator intimamente ligado a inibição da ação de síntese de cascatas metabólicas, devido a isso, a adição de NaCl, mesmo que em baixas quantidades pode ter um efeito sinérgico com outras substancias, causando uma grande redução ou incapacitação no crescimento de *L.fermentum* (SILVA et al.,2013).

A fonte de carbono manitol não apresenta nenhuma sinergia negativa relacionada ao crescimento de *Lactobacillus* quando usada em conjunto com NaCl, meios seletivos de alguns *Lactobacillus* incluem a adição de ambos os compostos (SAHA, 2006).

Um meio com 3 características seletivas para uma espécie bacteriana poderia se tornar viável, mesmo que apenas em sua forma líquida, devido a capacidade de bactérias lácticas de impedirem o crescimento de outros grupos e espécies bacterianas (DE VUYST;VANDAMME,1994).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a obtenção de um meio seletivo para *L.fermentum* seria necessário uma maior gama de conhecimento sobre as reações presentes nos compostos utilizados para a criação do meio com o metabolismo bacteriano da *L.fermentum*, assim como diferentes características para a seleção desta espécie que não foram realizadas neste experimento, necessitando uma maior quantidade de testes.

6.REFERÊNCIAS

BASSO, T.O.; GOMES, F.S.; LOPES, L.M.; AMORIN, V.H.; EGGLESTON, G.; BASSO, L.C. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 169-177, 2014.

BASSO, C.L.; BASSO, T.O.; ROCHA, N.S. **The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation**. Croácia: Intech. 2011. 596 p.

BUJALANCE, C.; VALERA, M.J.; MORENO, E.; BRAVO, A.R. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of microbiological methods**, v. 66, n. 3, p. 572-575, 2006.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COX, A.J.; PYNE, D.B.; SAUNDERS, P.U.; FRICKER, P.A. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 4, p. 222-226, 2010.

DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S.; FELIS, G.E. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 3, p. 809-812, 2004.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E.: A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of applied Bacteriology**, v.21, n.1, p.130-135, 1960. DEMIRBAS, A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. **Applied energy**, v. 86, p. 108-117, 2009.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In **Bacteriocins of lactic acid bacteria** (pp. 91-142). Springer, Boston, MA.1994.

EGERV, M.; DANIELSEN, M.; ROOS, E.; LINDMARK, H.; LINDGREEN, S. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. **Journal of food protection**, v. 70, n. 2, p. 412-418, 2007.

FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 8, n. 2, p. 44, 2007.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica.** 1989. Tese de doutorado. Universidade de Campinas.

GAO, X.; QIAO, S.Y.; LU, W.Q. Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 5, p. 556-561, 2009.

GAUTHIER, M.; BROCHO, D.; ELTIS, L.D.; THOMAS, S. Replacement of isoleucine₄₇ by threonine in the HPr protein of *Streptococcus salivarius* abrogates the preferential metabolism of glucose and fructose over lactose and melibiose but does not prevent the phosphorylation of HPr on serine₄₆. **Molecular microbiology**, v. 25, n. 4, p. 695-705, 1997. GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J.. **Renewable and Sustainable Energy Reviews: Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective.** 42. ed. Dover: Publishing Ethics Resource Kit, p.712-725, 2015.

HAMMES, W.; HERTEL, C. *Lactobacillus*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, v. 3, n. 2, p. 465-530, 2009.

HEIMBURGER, N.; SCHWICK, G. Fibrin agar electrophoresis. 1. Description of the method. **Thrombosis et diathesis haemorrhagica**, v. 7, p. 432-443, 1962. HOFSTRAND, D. Tracking biodiesel profitability. **Ag Decision Maker Newsletter**, v. 13, n. 9, p. 2, 2015.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.; THOMAS, K. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 284-291, 1997.

KÜMMERER, Klaus. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 5-7, 2003.

LEBLANC, J.G.; GARRO, M.S. AND DE GIORI, G.S. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α -galactosidase activity and fermentation products. **Applied microbiology and biotechnology**, 65(1), pp.119-123, 2004.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.S.; MOREIRA, A.P.B.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F.; MORAIS, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.

MCFEETERS, R. F.; CHEN, K.H. Utilization of electron acceptors for anaerobic mannitol metabolism by *Lactobacillus plantarum*. Compounds which serve as electron acceptors. **Food microbiology**, v. 3, n. 1, p. 73-81, 1986.

OLIVA, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 1990. 207 p. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas.

PEREIRA, D.I.A.; MCCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4743-4752, 2003.

REQUE, E.F.; PANDEY, A.; FRANCO, S.G.; SOCCOL, C.R. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 303-307, 2000.

RIZZELLO, C.G.; NIONELI, L.; CODA, R.; CAGNO, R.D.; GOBBETTI, M. Use of sourdough fermented wheat germ for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of the white bread. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 4, p. 645-654, 2010.

SAHA, B. C. Effect of salt nutrients on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 33(10), 887-890, 2006.

SILVA, F. C., SOUZA, R. D., ZACARONI, A. B., LELIS, F. M. V., & FIGUEIRA, A. D. R. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, 39(1), 45-50, 2013.

SRINIVAS, D.; MITAL, B.K.; GARG, S.K. Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. **International journal of food microbiology**, v. 10, n. 1, p. 51-57, 1990.

SÜLE, J.; KÖROSI, T.; HUCKER, A.; VARGA, L. Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1023-1030, 2014.

SUTULA, J.; COULTHWAIT, L.; VERRAN, J. Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. **Journal of microbiological methods**, v. 90, n.1, p. 65-71, 2012.

VAN BEEK, S.; PRIEST, F. G. Bacterial diversity in scotch whisky fermentations as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 61, n. 1, p. 10-14, 2003.

VRANCKEN, G., RIMAUX, T., WOUTERS, D., LEROY, F., & DE VUYST, L. The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt. **Food microbiology**, 26(7), 720-727, 2009.

WEST, N.P.; PYNE, D.B.; CRIPPS, A.W.; HOPKINS, W.G.; ESKESEN, D.C.; JAIRATH, A.; CHRISTOPHENSEN, C.T.; COLON, M.A.; FRICKER, P.A. *Lactobacillus fermentum* (PCC®) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomised control trial in athletes. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 30, 2011.

Contatos: rodrigochohfic@hotmail.com; joseluiz.wolff@gmail.com .