

# 28 Microbiologia Industrial e Aplicada

No capítulo anterior sobre microbiologia ambiental, compreendemos que os micro-organismos constituem um fator essencial em muitos fenômenos naturais que tornam possível a vida na Terra. Neste capítulo, veremos como os micro-organismos são aproveitados em aplicações úteis como produção de alimentos e produtos industriais. Muitos desses processos – especialmente a fabricação de pães, vinhos, cervejas e queijos – têm suas origens perdidas na história.

A civilização moderna, com sua grande população urbana, não poderia ser mantida sem os métodos de conservação de alimentos. Na verdade, a civilização surgiu somente depois que a agricultura produziu um suprimento estável de alimentos por ano, de modo que as pessoas foram capazes de abandonar a vida nômade do tipo caça e colheita. Esse fato representa um progresso em microbiologia, com sua contribuição sobre os processos de deterioração de alimentos e a possibilidade de disseminação de doenças em alimentos preservados, tornando-se mais tarde um elemento fundamental dessa ciência.

No Capítulo 9, discutimos as aplicações de micro-organismos geneticamente modificados que representam os atuais avanços em nosso conhecimento em biologia molecular. Muitas dessas aplicações são agora essenciais para a indústria moderna. (Veja o quadro no Capítulo 1, página 3.)



## SOB O MICROSCÓPIO

*Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura amplamente utilizada para finalidades industriais.

## P&R

Para produzir etanol, as leveduras requerem condições anaeróbicas. Em qual processo industrial, amplamente utilizado, o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* exige condições aeróbicas?

*Procure pela resposta neste capítulo.*

## Microbiologia dos alimentos

### OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 28-1** Descrever a deterioração termofílica anaeróbica e a deterioração por acidez plana por bactérias mesofílicas.
- 28-2** Comparar e distinguir preservação industrial de alimentos por enlatamento, empacotamento asséptico, radiação e altas pressões.
- 28-3** Nomear quatro atividades benéficas dos micro-organismos.

Muitos dos métodos de preservação de alimentos utilizados atualmente provavelmente foram descobertos ao acaso nos séculos passados. As pessoas nas culturas primitivas observaram que carnes secas e peixes curados resistiam ao processo de deterioração. Os nômades devem ter observado que o leite azedo dos animais continuava resistindo à decomposição e ainda assim mantinha-se saboroso. Além disso, se o coalho do leite azedo fosse pressionado para remover o líquido e deixado para maturar (na verdade, a produção de queijo), ele seria preservado de maneira eficiente e mais saboroso. Os fazendeiros logo aprenderam que, se os grãos fossem mantidos secos, não mofariam.

### Alimentos e doenças

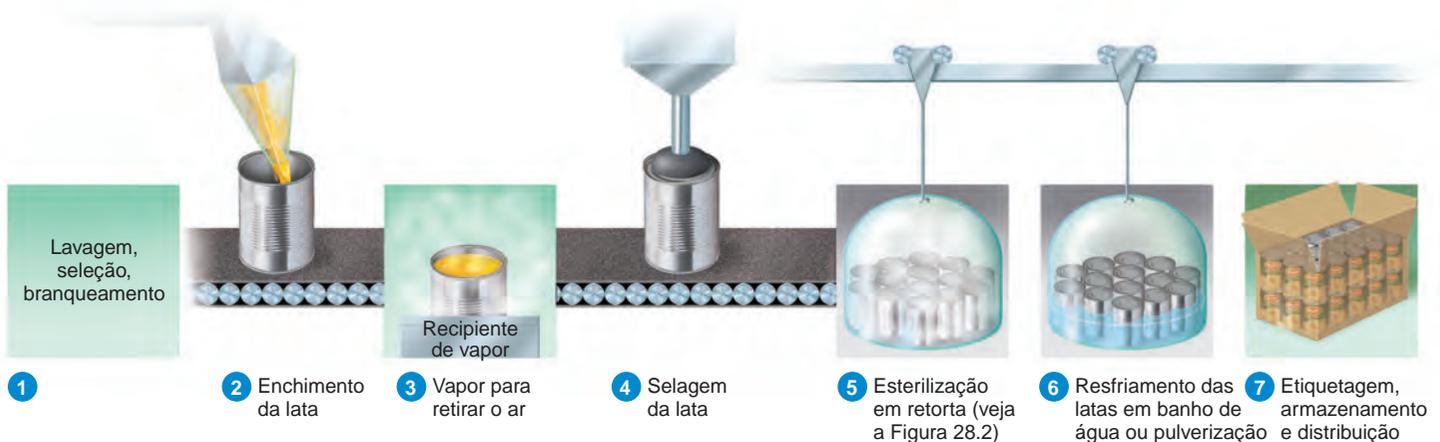
À medida que mais alimentos são preparados em instalações centrais e amplamente distribuídos, é cada vez mais provável que os alimentos, como os suprimentos de águas municipais, podem ser uma fonte de surtos de doenças. Para minimizar o potencial de surtos de doenças, as comunidades norte-americanas estabeleceram agências locais cujo papel é inspecionar laticínios e restaurantes. A Food and Drug Administration (FDA) e o Departamento de Agricultura (USDA) dos Estados Unidos também mantêm um sistema de inspetores em portos e instalações centrais de processa-

mento. Um avanço recente neste campo foi a introdução do sistema de **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC, de Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP)**, o qual pretende garantir os alimentos “da fazenda até o prato”. Antes da introdução do sistema APPCC, o principal papel das agências governamentais era coletar amostras para identificar alimentos contaminados. Essa amostragem para identificar contaminação ainda é realizada, mas o sistema APPCC foi desenvolvido para prevenir contaminações por meio da identificação dos pontos em que os alimentos apresentam maior probabilidade de serem contaminados por micro-organismos patogênicos. O monitoramento desses pontos de controle pode impedir que os micro-organismos sejam introduzidos ou, se estiverem presentes, interromper sua proliferação. Por exemplo, o sistema APPCC pode identificar as etapas durante o processamento nas quais as carnes são mais propensas a serem contaminadas pelos conteúdos intestinais dos animais. O sistema APPCC também necessita do monitoramento das temperaturas adequadas para matar os patógenos durante o processamento e das temperaturas adequadas de armazenamento para prevenir a reprodução dos micro-organismos.

### Alimentos enlatados industrialmente

No Capítulo 7, você aprendeu que preservar alimentos aquecendo recipientes adequadamente vedados, como conservas domésticas, não é difícil. O desafio do processo de enlatamento para fins comerciais é utilizar a quantidade correta de calor necessária para matar organismos decompositores e micro-organismos perigosos, como o *Clostridium botulinum*, formador de endosporos, sem alterar a aparência e a palatabilidade dos alimentos. Assim, muitas pesquisas são realizadas para determinar o aquecimento mínimo exato que irá atingir os dois objetivos.

O enlatamento de produtos industriais é muito mais sofisticado tecnicamente que o enlatamento caseiro (**Figura 28.1**). Os pro-



**Figura 28.1** O processo de esterilização comercial no enlatamento industrial. **1** O branqueamento é um tratamento com água quente ou vapor que amacia o produto para que a lata possa encher-se melhor. Ele também destrói enzimas que podem alterar a cor, o sabor ou a textura do produto e diminuir a população microbiana. **2** As latas são enchidas até sua capacidade, deixando o mínimo de espaço vazio. **3** Para retirar grande parte do ar dissolvido, as latas são aquecidas em um recipiente de vapor. **4** As latas são seladas. **5** As latas são esterilizadas por vapor sob pressão. **6** As latas são resfriadas pela submersão ou pulverização de água. **7** As latas são etiquetadas para venda.

**P** Como a esterilização comercial difere da esterilização completa?

duto enlatados industrialmente passam pela **esterilização comercial** por vapor sob pressão em uma grande **retorta** (Figura 28.2), que opera com base no mesmo princípio da autoclave (veja a Figura 7.2, página 189). A esterilização comercial deve destruir endosporos de *C. botulinum* e não é tão rigorosa quanto a esterilização completa. A razão é que, se os endosporos de *C. botulinum* são destruídos, então quaisquer outras bactérias deteriorantes ou patogênicas significativas também podem ser destruídas.

Para garantir a esterilização comercial, aquecimento suficiente é aplicado ao **tratamento 12 D** (12 reduções decimais, ou cozimento botulínico), pelo qual uma população teórica de endosporos de *C. botulinum* será reduzida em 12 ciclos logarítmicos. (Veja a Figura 7.1 e a Tabela 7.2, páginas 186 e 187.) Isso significa que, se existirem  $10^{12}$  (1.000.000.000.000) endosporos em uma lata, após o tratamento haverá somente um sobrevivente. Como  $10^{12}$  é uma população supostamente grande, esse tratamento é considerado quase seguro. Algumas bactérias termofílicas formadoras de endosporos possuem endosporos que são mais resistentes ao tratamento térmico do que os de *C. botulinum*. Entretanto, essas bactérias são termófilos obrigatórios e geralmente permanecem dormentes em temperaturas abaixo de 45°C. Portanto, elas não são um problema de deterioração em temperaturas normais de armazenamento.

### Deterioração de alimentos enlatados

Se alimentos enlatados são submetidos a altas temperaturas, como em um caminhão sob sol quente ou próximo a um radiador a vapor, as bactérias termofílicas que frequentemente sobrevivem à esterilização comercial podem germinar e crescer. A **deterioração termofílica anaeróbica** é, portanto, uma causa bastante comum de deterioração de alimentos enlatados de baixa acidez. A lata muitas vezes pode estufar com o gás e seu conteúdo ter o pH diminuído, assim como apresentar um odor azedo. Diversas espécies termofílicas de *Clostridium* podem causar esse tipo de deterioração. Quando a deterioração termofílica ocorre, mas a lata não estufa com a produção de gás, ela é denominada **deterioração por acidez plana**. Esse tipo de deterioração é causado por organismos termofílicos como *Geobacillus stearothermophilus*, encontrado no amido e em açúcares utilizados na preparação de alimentos. Muitas indústrias possuem padrões para os números permitidos de cada bactéria termofílica nas matérias-primas. Ambos os tipos de deterioração ocorrem apenas quando as latas são estocadas em temperaturas mais elevadas que as normais, o que permite o crescimento de bactérias cujos endosporos não são destruídos pelo processamento normal.

Bactérias mesofílicas podem deteriorar alimentos enlatados se eles não forem processados corretamente ou se as latas apresentarem vazamentos. Falhas no processamento geralmente resultam em deterioração por bactérias formadoras de endosporos; a presença de bactérias não formadoras de endosporos sugere fortemente que as latas vazaram. Latas com vazamento com frequência são contaminadas durante o resfriamento após seu processamento pelo calor. As latas quentes são pulverizadas com água resfriada ou passam por uma canaleta cheia de água. No resfriamento das latas, forma-se um vácuo no seu interior, e a água externa pode ser sugada através de um buraco do vedador da emenda na tampa plissada (Figura 28.3). As bactérias contaminantes da água de resfriamento entram



**Figura 28.2 Retortas para enlatamento comercial.** Esse processo é mais utilizado do que a esterilização por autoclave, utilizada em muitos laboratórios de microbiologia ou hospitais.

**P** A princípio, existe alguma diferença entre o enlatamento por retorta e a esterilização por autoclave nos hospitais?

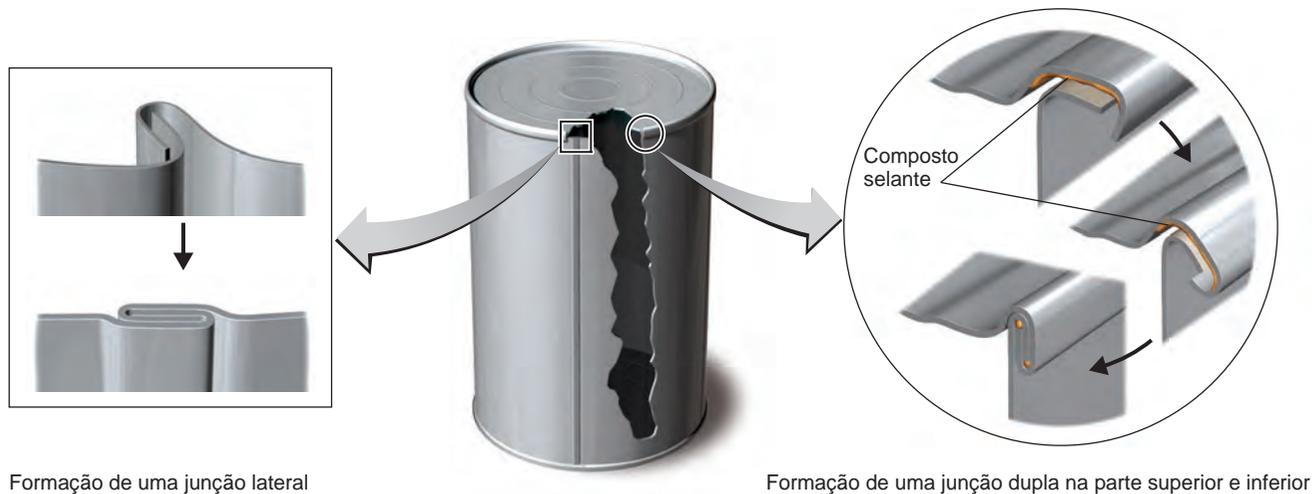
na lata juntamente com a água. A deterioração oriunda de falhas no processamento ou do vazamento da lata pode produzir odores de putrefação, ao menos em alimentos com alto teor de proteínas, e ocorre em temperaturas normais de armazenamento. Em cada um dos tipos de deterioração, existe sempre a possibilidade de que a bactéria do botulismo esteja presente.

Alguns alimentos ácidos, como tomates ou conservas de frutas, são preservados pelo processamento em temperaturas de 100°C ou abaixo. A razão é que os únicos organismos deteriorantes que cresceriam nesses alimentos ácidos são facilmente mortos em temperaturas até 100°C. Os micro-organismos são, principalmente, fungos filamentosos, leveduras e certas bactérias vegetativas.

Problemas ocasionais nos alimentos ácidos desenvolvem-se devido a alguns micro-organismos que são resistentes ao calor e ácido-tolerantes. Exemplos de fungos resistentes ao calor são *Byssochlamys fulva*, o qual produz um *ascósporo resistente ao calor*, e alguns fungos, especialmente espécies de *Aspergillus*, que algumas vezes produzem corpos resistentes especializados denominados esclerócios. Uma bactéria formadora de esporo, *Bacillus coagulans*, é incomum por ser capaz de crescer em pH próximo a 4,0. A Tabela 28.1 lista os tipos de deterioração em alimentos com acidez baixa e média.

### Empacotamento asséptico

O uso de **empacotamento asséptico** para preservar alimentos aumentou nos últimos anos. Os pacotes em geral são feitos de alguns materiais que não suportam o tratamento térmico convencional, como o papel laminado ou o plástico. Os materiais de empacotamento vêm em rolos contínuos, sendo usados em máquinas que esterilizam o material com uma solução quente de peróxido de hidrogênio, algumas vezes auxiliadas pela luz ultravioleta (UV) (Figura 28.4). Recipientes de metal podem ser esterilizados por vapores superaquecidos ou outros métodos de altas temperaturas. Feixes de elétrons de alta energia também podem ser usados para esterilizar materiais de empacota-



Formação de uma junção lateral

Formação de uma junção dupla na parte superior e inferior

**Figura 28.3 A construção de uma lata metálica.** Observe a construção da costura da lata, que foi implementada aproximadamente em 1904. Durante o resfriamento após a esterilização (veja a Figura 28.1, etapa 6), o vácuo formado na lata pode realmente permitir a penetração de micro-organismos contaminantes na lata junto com a água.

**P** Por que a lata não é selada antes de ser colocada no recipiente de vapor?

mento. Enquanto isso, em ambiente estéril, o material é transformado em embalagens, as quais são preenchidas com alimentos líquidos que foram convencionalmente esterilizados pelo calor. A embalagem preenchida não é esterilizada depois de ser selada.

### Radiação e preservação de alimentos industriais

É reconhecido que a radiação é letal para os micro-organismos; na verdade, uma patente foi obtida na Grã-Bretanha em 1905 para o uso de radiação ionizante para melhorar as condições de gêneros alimentícios. Os raios X foram recomendados em 1921 como uma forma de inativar larvas em carne de porco causadoras de triquinose. A radiação ionizante inibe a síntese de DNA e efetivamente previne a reprodução de micro-organismos, insetos e plantas. A radiação ionizante normalmente é raios X ou raios gama produzidos pelo cobalto-60 radioativo. Até certos níveis de energia, elétrons de alta energia, produzidos por acelerador de elétrons, também são

utilizados. A principal diferença prática é a capacidade de penetração. Essas fontes inativam os organismos-alvo e não induzem a radioatividade em alimentos e no material embalado. As doses de radiação relativa necessárias para matar vários organismos são mostradas na Tabela 28.2. A radiação é medida em Grays, nome dado em homenagem a um dos primeiros radiologistas – usualmente em termos de milhares de Grays, abreviado como kGy.

- *Baixas doses de radiação (menores que 1 kGy)* são usadas para matar insetos (desinfestação) e inibir o brotamento, como em batatas estocadas. Da mesma forma, podem ser usadas para retardar o processo de amadurecimento de frutas durante a estocagem.
- *Doses de pasteurização (1 a 10 kGy)* podem ser usadas em carnes de gado e aves para eliminar ou reduzir significativamente o número de bactérias patogênicas específicas.
- *Altas doses (maiores que 10 kGy)* são usadas para esterilizar, ou no mínimo reduzir significativamente, a população bacteriana em vários tipos de especiarias. Especiarias com frequência são

**Tabela 28.1** Tipos comuns de deterioração em alimentos enlatados de acidez baixa e média (pH acima de 4,5)

Tipo de deterioração	Indicação de deterioração	
	Aparência da lata	Conteúdo da lata
Acidez plana ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> )	Não intumescida	Aparência normalmente não alterada; pH acentuadamente baixo; azedo; pode ter um cheiro ligeiramente anormal; algumas vezes com líquido turvo
Anaeróbica termofílica ( <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> )	Intumescida	Fermentado, azedo, aspecto de queijo ou odor de ácido butírico
Anaeróbica putrefativa ( <i>Clostridium sporogenes</i> ; possivelmente <i>C. botulinum</i> )	Intumescida	Pode estar parcialmente digerido; pH ligeiramente acima do normal; odor pútrido típico



**Figura 28.4 Empacotamento asséptico.** Rolos do material de empacotamento em primeiro plano, pacotes cheios no centro à direita.

**P** Por que o uso desse procedimento tem aumentado nos últimos anos?

Tabela 28.2 Doses aproximadas de radiação necessárias para matar vários organismos (prions não são afetados)	
Organismos	Dose (kGy)*
Animais superiores (corpo inteiro)	0,005 a 0,1
Insetos	0,01 a 1
Bactérias não formadoras de endosporos	0,5 a 10
Esporos bacterianos	10 a 50
Vírus	10 a 200

\*Gray é a medida de radiação ionizante; kGy é 1.000 Grays.  
 Fonte: J. Farkas, "Physical Methods of Food Preservation", in *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2ª ed., M.P. Doyle et al. (eds) (Washington, DC: ASM Press, 2001).

contaminadas com 1 milhão ou mais bactérias por grama, embora esses valores normalmente não sejam considerados perigosos para a saúde.

Um uso especializado da radiação é a esterilização de carnes consumidas pelos astronautas norte-americanos, e algumas unidades de saúde têm usado radiação seletivamente para esterilizar comidas ingeridas por pacientes imunocomprometidos. Milhões de aparelhos médicos implantados, como marca-passos, são irradiados. Alimentos irradiados são identificados nos Estados Unidos com um símbolo radura (Figura 28.5) e um aviso impresso. Infelizmente, esse símbolo muitas vezes tem sido interpretado como uma advertência em vez de uma descrição de um processo de tratamen-



**Figura 28.5 Símbolo da irradiação.** Este símbolo, o símbolo radura internacional, indica que um alimento recebeu tratamento por irradiação.

**P** Irradiação é o mesmo que aditivo químico?

to aprovado ou preventivo. Na verdade, alimentos irradiados não são radioativos; considere que a mesa de raios X em um hospital não se torna radioativa após exposições diárias a radiações ionizantes. Recentemente, a FDA permitiu, mediante aprovação específica, a substituição do termo "irradiação" por "pasteurização".

Quando a profundidade de penetração da irradiação é um requisito, o método preferencial é a irradiação por raios gama produzida por cobalto-60. Entretanto, esse tipo de tratamento exige várias horas de exposição em isolamento atrás de paredes de proteção (Figura 28.6).

Aceleradores de elétrons de alta energia (Figura 28.7) são muito mais rápidos e esterilizam em poucos segundos, mas esse tratamento tem baixo poder de penetração e é indicado somente para carnes e bacon fatiados ou produtos finos semelhantes. Além disso, objetos plásticos utilizados em microbiologia geralmente também são esterilizados dessa forma. Outra aplicação recente é a irradiação de cartas para eliminar micro-organismos com potencial para bioterrorismo, como os esporos do antraz.

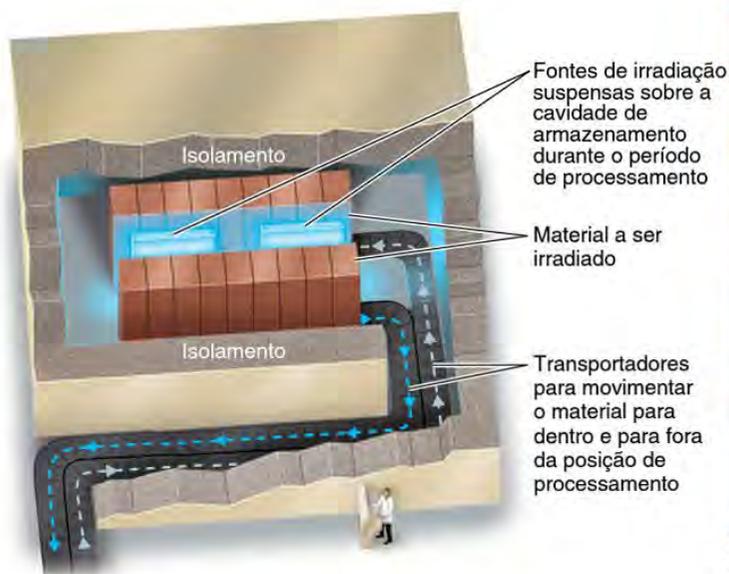
## Preservação de alimentos por alta pressão

Um desenvolvimento recente na preservação de alimentos é o uso de técnicas de processamento de alta pressão. Alimentos embalados como frutas, carnes finas e tiras de frango pré-cozidas são submergidos em tanques de água pressurizada. A pressão pode alcançar 87.000 libras por polegadas ao quadrado (psi) que é equivalente a três elefantes em pé sobre uma moeda de dez centavos. Esse processo mata muitas bactérias, como *Salmonella*, *Listeria* e linhagens patogênicas de *E. coli*, por interromper muitas funções celulares. Ele também mata micro-organismos não patogênicos que tendem a diminuir a data de validade dos produtos.

Devido ao fato de esse processo não exigir o uso de aditivos, não requer aprovação regulamentar. Ele tem a vantagem de preservar as cores e os sabores dos alimentos melhor que outros métodos e não gerar preocupação com os efeitos da irradiação.

## Papel dos micro-organismos na produção de alimentos

No final do século XIX, os micro-organismos usados na produção de alimentos foram cultivados em cultura pura pela primeira vez. Esse rápido desenvolvimento levou a um melhor entendimento das relações entre micro-organismos específicos e seus produtos e atividades. Esse período pode ser considerado o início da microbiologia industrial de alimentos. Por exemplo, uma vez com-



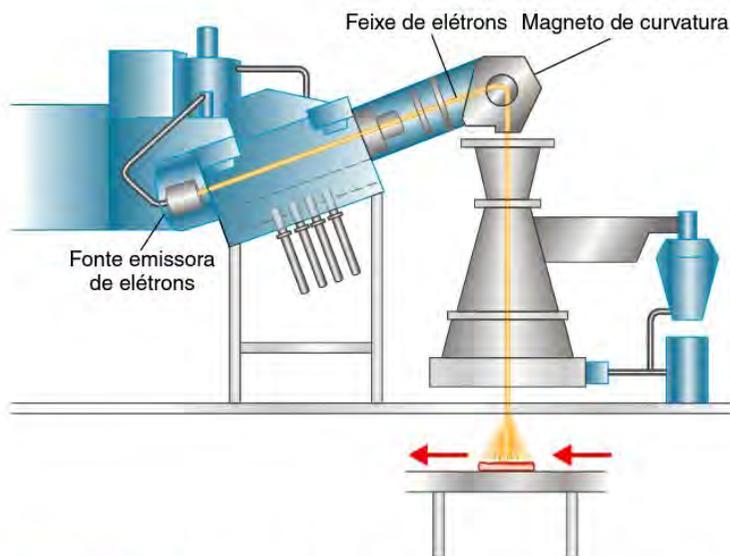
(a) Um equipamento de irradiação mostrando o caminho do material a ser irradiado.



(b) A fonte de irradiação está na posição mais baixa da cavidade de armazenamento. O brilho azul é a radiação Cerenkov causada pelas partículas carregadas que ultrapassam a velocidade da luz na água.

**Figura 28.6** Um equipamento de irradiação por raios gama.

**P** Micro-ondas podem ser utilizadas para esterilizar alimentos?



**Figura 28.7** Acelerador de feixe de elétrons. Estas máquinas geram um feixe de elétrons que é acelerado por meio de um longo tubo por eletromagnetos de carga oposta. No desenho, o feixe de elétrons é desviado por um "magneto curvado". Ele serve para desviar os elétrons de níveis de energia indesejados, fornecendo um feixe de energia uniforme. O feixe vertical varre o alvo para a frente e para trás à medida que passa por ele. O poder de penetração do feixe é limitado: se o material-alvo tem uma espessura equivalente à da água, o limite máximo de penetração é de aproximadamente 3,9 cm. Por outro lado, os raios X penetrarão cerca de 23 cm.

**P** Elétrons de alta energia são radiação ionizante?

preendido que o crescimento de leveduras sob condições específicas produzia cerveja e que certas bactérias poderiam estragar essa cerveja, os cervejeiros conseguiram controlar melhor a qualidade dos produtos. Indústrias específicas tornaram-se ativas na pesquisa em microbiologia e selecionaram alguns micro-organismos por suas qualidades especiais. A indústria cervejeira investigou extensivamente o isolamento e a identificação de leveduras e selecionou aquelas que poderiam produzir mais álcool. Nesta seção, discutiremos o papel dos micro-organismos na produção de vários alimentos comuns.

### Queijo

Os Estados Unidos lidera a produção mundial de queijos, com milhares de toneladas a cada ano. Embora existam muitos tipos de queijos, todos necessitam da formação de um **coalho**, que pode ser separado da fração líquida principal, ou **soro** (Figura 28.8). O coalho é composto de uma proteína, a **caseína**, e comumente é formado pela ação de uma enzima, a **renina** (ou quimosina), a qual é favorecida pelas condições ácidas produzidas por certas bactérias do ácido láctico. As bactérias lácticas inoculadas também fornecem os sabores e aromas característicos dos produtos lácteos fermentados durante o processo de maturação. O coalho passa por um processo de maturação microbiológica, exceto para alguns queijos não maturados, como a ricota e o queijo cottage.

Os queijos geralmente são classificados por sua consistência, produzida durante o processo de maturação. Quanto maior a perda da umidade e mais compactado for o coalho, mais firme o queijo. Os queijos romano e parmesão, por exemplo, são clas-



(a) O leite foi coagulado pela ação da renina (formação do coalho) e inoculado com bactérias de maturação para sabor e acidez. Aqui os trabalhadores estão cortando o coalho em fatias grossas.

**Figura 28.8** Fabricação do queijo cheddar.

**P** Na produção do queijo existem bactérias vivas no produto final?

sificados como queijos muito firmes; o cheddar e o queijo suíço são classificados como firmes. Limburger, azul e Roquefort são classificados como semimacios; Camembert é um exemplo de queijo macio.

Os queijos firmes cheddar e suíço são maturados pelo crescimento anaeróbico das bactérias do ácido lático no seu interior. O interior desses queijos maturados pode ser muito mais firme do que normalmente ocorre. Quanto maior o tempo de incubação, maior a acidez e mais acentuado o sabor do queijo. Uma espécie de *Propionibacterium* produz dióxido de carbono, que forma os buracos no queijo suíço. Queijos macios como Limburger são maturados por bactérias e outros organismos contaminantes que crescem na superfície. Os queijos azul e Roquefort são maturados pelo fungo *Penicillium* inoculado dentro do queijo. A textura do queijo é mole ou macia o bastante para que uma quantidade adequada de oxigênio possa atingir os fungos aeróbicos. O crescimento do fungo *Penicillium* é visualizado como manchas azul-esverdeadas no queijo. O queijo Camembert é maturado em pequenos pacotes, de forma que as enzimas produzidas pelo crescimento aeróbico do fungo *Penicillium* difundam-se no queijo para maturação. O quadro da página 801 descreve um uso do soro como subproduto da indústria de laticínios.

### Outros produtos lácteos

A manteiga é produzida pela nata do leite batida até a gordura ser separada do leite de manteiga (*leitelho*). O sabor e o aroma típicos da manteiga e do leitelho são devidos ao *diacetil*, uma combinação de duas moléculas de ácido acético, que é um produto final metabólico da fermentação de algumas bactérias do ácido lático. Hoje, o leitelho comercializado não é um subproduto da fabricação da manteiga, mas é produzido pela inoculação do leite desnatado com bactérias que formam ácido lático e diacetil. O *creme azedo cultivado* é feito de creme inoculado com micro-organismos semelhantes àqueles utilizados para fabricar o leitelho.



(b) O coalho é cortado em pequenos cubos para facilitar a drenagem eficiente do soro.



(c) O coalho é triturado, para permitir melhor drenagem do soro, e prensado em blocos, para o aumento da maturação. Quanto maior o período de maturação, mais ácido (aroma forte) será o queijo.

Uma grande variedade de laticínios ligeiramente ácidos – provavelmente uma herança do passado nômade – é encontrada ao redor do mundo. Muitos deles são parte da dieta diária dos Balcãs, na Europa oriental e na Rússia. Um desses produtos é o *iogurte*, que também é popular nos Estados Unidos. O iogurte comercial é feito de leite, do qual pelo menos um quarto da água é evaporado em uma panela a vácuo. O leite engrossado resultante é inoculado com uma cultura mista de *Streptococcus thermophilus*, principalmente para a produção de ácido, e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, que contribui para o aroma e o sabor. A temperatura da fermentação é em torno de 45°C por várias horas e, durante esse tempo, o crescimento do *S. thermophilus* ultrapassa o de *L. d. bulgaricus*. A manutenção de um equilíbrio adequado entre os micro-organismos produtores de sabor e de ácido é o segredo da fabricação do iogurte.

O *kefir* e o *kumiss* são bebidas lácteas fermentadas populares na Europa oriental. As bactérias lácticas utilizadas normalmente são suplementadas com leveduras fermentadoras de lactose, para dar a essas bebidas um teor alcoólico de 1 a 2%.

### Outras fermentações

Historicamente, a fermentação do leite permitiu que os laticínios fossem armazenados e então consumidos muito depois. Outras

fermentações microbianas foram usadas para tornar certas plantas comestíveis. Por exemplo, as populações pré-colombianas na América Central e do Sul aprenderam a fermentar as sementes de cacau antes do consumo. Os produtos microbianos liberados durante a fermentação produzem o sabor do chocolate.

Os micro-organismos também são utilizados na produção de pães. Os açúcares na massa do pão são fermentados pelas leveduras. A espécie de levedura utilizada para produzir pães é a *Saccharomyces cerevisiae*. Essa mesma espécie de levedura é utilizada na produção de cerveja a partir de grãos e na fermentação de vinhos a partir de uvas. (Em um determinado momento, *S. cerevisiae* foi classificada em múltiplas espécies, como *S. carlsbergensis*, *S. uvarum* e *S. ellipsoideus*; estes e alguns outros nomes de espécies são encontrados na literatura mais antiga.) *S. cerevisiae* é capaz de crescer facilmente sob condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas, embora, ao contrário das bactérias anaeróbicas facultativas como a *E. coli*, não possa crescer em condições anaeróbicas indefinidamente. Diversas linhagens de *S. cerevisiae* se desenvolveram ao longo dos séculos e estão altamente adaptadas a determinadas utilizações em processos fermentativos.

**P&R** Condições anaeróbicas para a produção de etanol por leveduras são obrigatórias na fabricação de bebidas alcoólicas. Na fabricação de pães, o dióxido de carbono forma as bolhas típicas de pães fermentados. As condições aeróbicas favorecem a produção de dióxido de carbono e são estimuladas o máximo possível. Essa é a razão pela qual a massa de pão é amassada repetidamente. Todo etanol produzido evapora durante o tempo em que o pão é assado. Em alguns pães, como os de centeio e de massa azeda, o desenvolvimento de bactérias lácticas produz um sabor azedo típico.

A fermentação também é utilizada na produção de alimentos como *chucrute*, *picles*, *azeitonas* e mesmo cacau e café, nos quais os grãos são submetidos a uma etapa de fermentação.

### Bebidas alcoólicas e vinagre

Os micro-organismos são utilizados na produção de quase todas as bebidas alcoólicas. As cervejas são produzidas a partir da fermentação do amido de cereais por leveduras. A **cerveja** é fermentada lentamente pelas linhagens de leveduras que permanecem no fundo dos tanques (*leveduras de fundo*). A **cerveja ale** tem fermentação relativamente rápida, a uma temperatura elevada, com linhagens de leveduras que normalmente formam grupos que flutuam até o topo por causa do CO<sub>2</sub> (*leveduras de topo*). Como as leveduras não são capazes de fermentar o amido diretamente, o amido dos grãos deve ser convertido a glicose e maltose, que podem ser fermentadas pelas leveduras em etanol e dióxido de carbono. Nessa conversão, denominada **maltagem**, os grãos contendo o amido, como a maltagem da cevada, são colocados para germinar e então são secos e moídos. O produto, denominado **malte**, possui enzimas degradadoras de amido (amilases), que transformam o amido dos cereais em carboidratos que podem ser fermentados pelas leveduras. Cervejas *light* usam amilases ou linhagens selecionadas de leveduras para converter uma maior quantidade do amido em glicose e maltose fermentável, resultando em menos carboidratos e mais álcool. A cerveja é então diluída para atingir uma porcentagem alcoólica dentro da faixa usual. O **sakê**, o vinho de arroz japonês, é feito a partir do arroz sem a maltagem, pois o fungo *Aspergillus* é inicial-

mente utilizado para converter o amido do arroz em açúcares que podem ser fermentados. (Veja a discussão sobre o koji, página 805.) Para as *bebidas alcoólicas destiladas*, como *whisky*, *vodka* e *rum*, os carboidratos obtidos a partir dos grãos de cereais, batatas e melaço são fermentados até álcool, que é então destilado para a produção de bebidas alcoólicas concentradas.

Os *vinhos* são produzidos a partir de frutas, comumente uvas, que contêm açúcares que as leveduras podem utilizar diretamente para fermentação; a maltagem é desnecessária na produção do vinho. As uvas normalmente não necessitam da adição de açúcares, mas outras frutas devem ser suplementadas com açúcares para garantir a produção suficiente de álcool. As etapas para a produção de vinho são mostradas na **Figura 28.9**. As bactérias do ácido lático são importantes quando o vinho é feito de uvas que são especialmente ácidas devido a altas concentrações de ácido málico. Essas bactérias convertem o ácido málico em ácido lático mais fraco em um processo chamado de **fermentação malolática**. O resultado é um vinho menos ácido, que apresenta sabor melhor do que se fosse produzido de outra forma.

Produtores que deixaram vinho exposto ao ar perceberam que ele azedava devido ao crescimento de bactérias aeróbicas que convertem o etanol do vinho em ácido acético. O resultado é o *vinagre* (*vinu* = vinho; *acre* = azedo). O processo é agora utilizado intencionalmente para produzir vinagre. O etanol é inicialmente produzido pela fermentação anaeróbica de carboidratos pelas leveduras. Ele é então oxidado em condições aeróbicas em ácido acético pelas bactérias produtoras de ácido acético dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ O botulismo é um grande perigo para a deterioração de enlatados sob condições termofílicas ou mesofílicas? **28-1**
- ✓ No enlatamento de alimentos normalmente são utilizadas latas de metal. Que tipo de embalagem é utilizado para o empacotamento asséptico de alimentos? **28-2**
- ✓ Os queijos Roquefort e azul são caracterizados por manchas azul-esverdeadas. O que são essas manchas? **28-3**

## Microbiologia industrial

### OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 28-4** Definir *fermentação industrial* e *biorreator*.
- 28-5** Diferenciar metabólitos primários e secundários.
- 28-6** Descrever o papel dos micro-organismos na indústria de produtos químicos e farmacêuticos.
- 28-7** Definir *bioconversão* e especificar suas vantagens.
- 28-8** Descrever os biocombustíveis que podem ser feitos por micro-organismos.

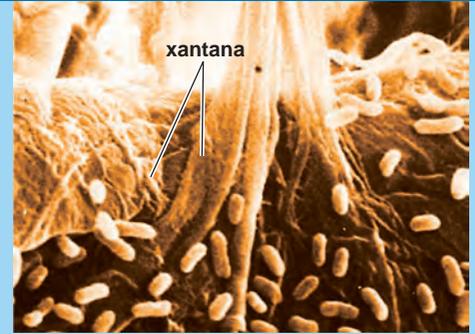
Os usos industriais da microbiologia tiveram início com a fermentação de alimentos em larga escala que produziu ácido lático a partir dos laticínios e etanol a partir da cerveja. Essas duas substâncias químicas também se mostraram úteis em processos industriais não relacionados com a produção de alimentos. Durante a Primeira e Segunda Guerra Mundial, a fermentação microbiana e tecnologias similares foram usadas na produção de armamentos relacionados

## De doenças de plantas a xampus e molhos para saladas

*Xanthomonas campestris* é um bastonete gram-negativo que causa uma doença chamada de podridão negra em plantas. Depois de acessar os tecidos vasculares das plantas, a bactéria usa a glicose transportada nos tecidos para produzir uma substância pegajosa, semelhante a uma goma. Essa substância acumula-se para formar massas gomosas, as quais eventualmente bloqueiam o transporte de nutrientes das plantas. A goma que forma essas massas, a xantana, é composta de um polímero de manose de alto peso molecular (veja a fotografia).

Em contraste com seus efeitos nas plantas, as xantanas não têm efeito adverso quando ingeridas por seres humanos. Conseqüentemente, as xantanas podem ser usadas como espessantes em alimentos, como laticínios e molhos para saladas, e em cosméticos, como cremes e xampus.

O norte-americano consome em média mais de 13 kg de queijo anualmente, e cada 2 kg de queijo produz cerca de 4 L do líquido do subproduto chamado soro. Quando pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) quiseram encontrar algum produto útil que pudesse ser obtido a partir do soro, um resíduo líquido produzido em abundância pela indústria de laticínios, pensaram em transformá-lo em xantana. Entretanto, como o soro é principalmente água e lactose, os pesquisadores tiveram que descobrir como *X. campestris* produz xantana utilizando lactose em vez de glicose.



*Xanthomonas campestris* produzindo xantana pegajosa.  2 µm

Uma equipe de pesquisadores trabalhando com o USDA na *Stauffer Chemical Company* utilizou uma abordagem simples – um enriquecimento com base apenas em duas exigências: que a bactéria crescesse no soro do leite e que produzisse xantana. Inicialmente, eles inocularam *X. campestris* em um meio de soro e incubaram por 24 horas. Então, transferiram um inóculo desta cultura para um frasco de caldo de lactose, para selecionar as células que utilizam lactose. A linhagem não tinha que produzir xantana a partir desse caldo; ela tinha apenas que crescer e utilizar lactose.

A linhagem que utilizou lactose foi isolada por meio de transferências seriadas, e foi selecionada aquela linhagem com melhor habilidade de crescer. Depois da incubação por 10 dias, um inóculo foi transferido para outro frasco de caldo de lactose, e o procedimento foi repetido mais duas vezes. Quando transferidas para um frasco com meio de soro de leite, as bactérias capazes de utilizar lactose multiplicaram-se no soro, e a cultura tornou-se extremamente viscosa – a xantana estava sendo produzida.

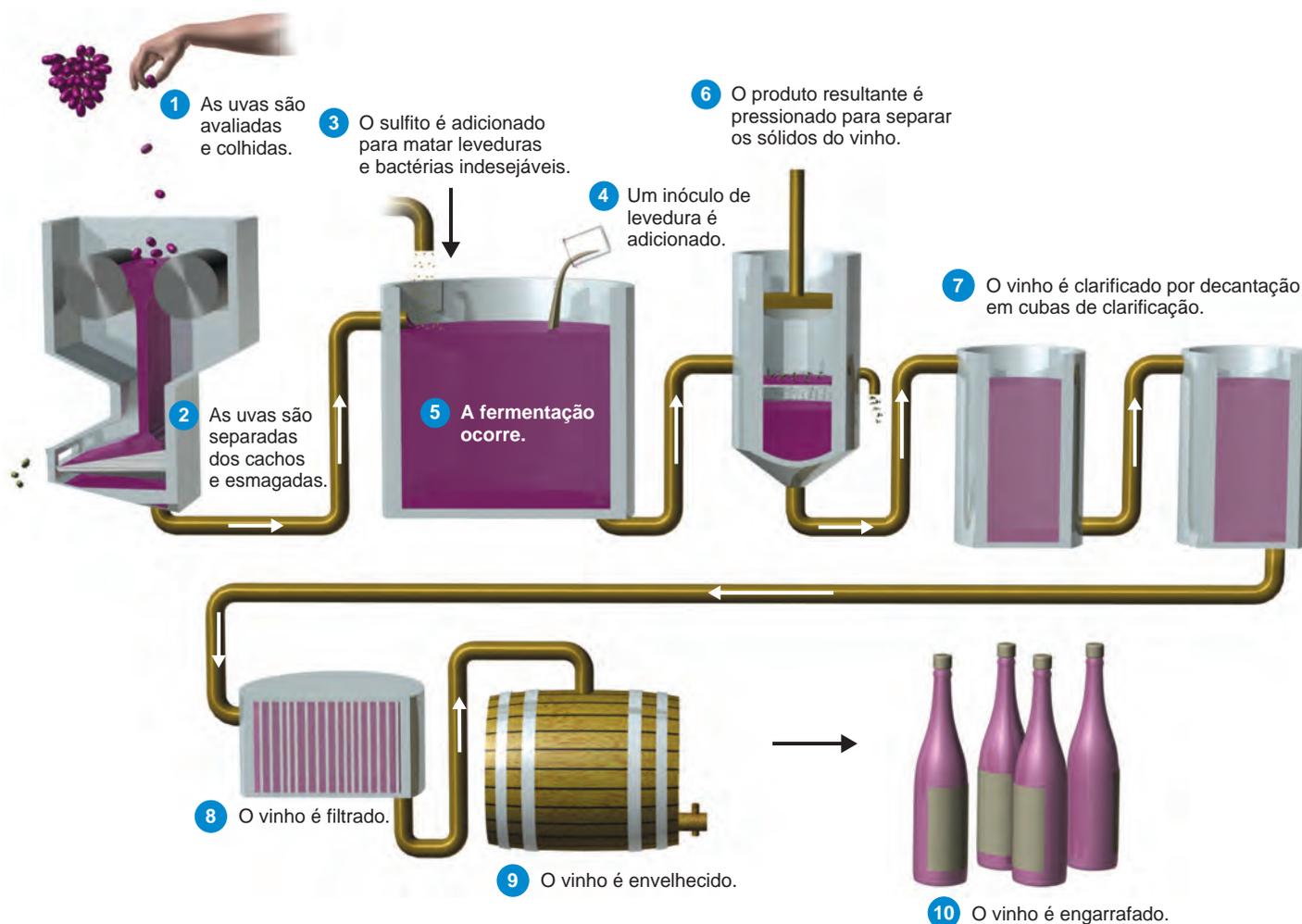
O resultado final foi um processo no qual 40 g/L do soro em pó foram convertidos em 30 g/L de goma de xantana. Uma rápida observação dos rótulos dos produtos nos supermercados de sua vizinhança vai demonstrar o quanto bem-sucedido foi esse projeto.



com componentes químicos, como o glicerol e a acetona. A microbiologia industrial atual utiliza grande parte dessa tecnologia desenvolvida para produzir antibióticos, após a Segunda Guerra Mundial.

Existe agora um interesse renovado em algumas dessas fermentações da microbiologia clássica, especialmente se elas puderem ser utilizadas em matérias-primas, produtos que são renováveis ou, de preferência, produtos que seriam de outra forma descartados.

Nos últimos anos, a microbiologia industrial tem sido revolucionada pela aplicação de organismos geneticamente modificados. Um exemplo de *biossensor* modificado por engenharia genética para detectar poluição é explicado no quadro da página 780. No Capítulo 9, discutimos os métodos para modificar organismos utilizando a tecnologia do DNA recombinante e descrevemos alguns produtos derivados; essa tecnologia agora é conhecida como **biotecnologia**.



**Figura 28.9** As etapas básicas da fabricação do vinho tinto. Para o vinho branco, a prensagem das uvas antecede a fermentação, de modo que a cor não é extraída do material sólido.

**P** Qual é a finalidade de se adicionar leveduras na etapa 4?

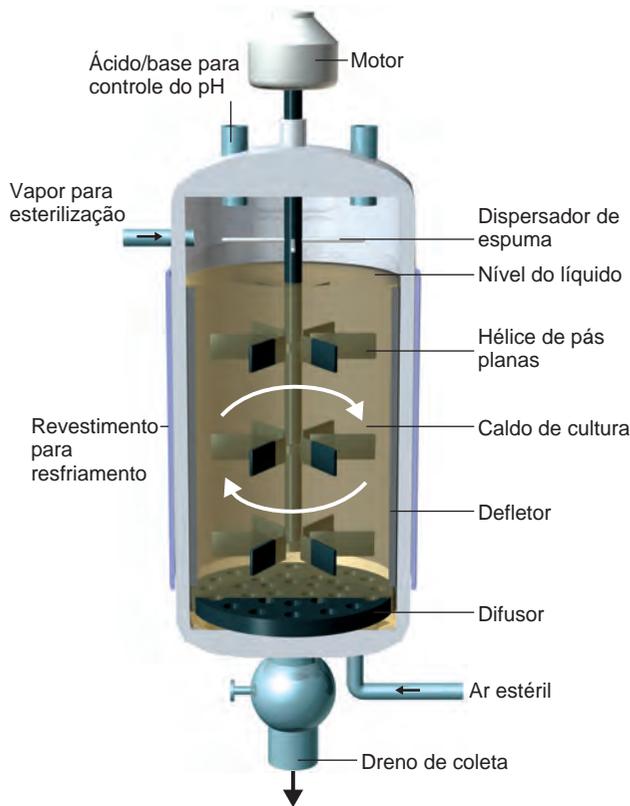
## Tecnologia das fermentações

A fabricação industrial de produtos microbianos normalmente envolve fermentações. A *fermentação industrial* é um cultivo em larga escala de micro-organismos ou outras células únicas para produzir substâncias de valor comercial. (Veja o quadro no Capítulo 5, página 135, para outras definições de *fermentação*.) Discutimos os exemplos mais familiares: as fermentações anaeróbicas de alimentos utilizadas nas indústrias de produção de laticínios, cervejas e vinhos. Muitas dessas tecnologias, com a adição frequente de aeração, foram adaptadas para a fabricação de outros produtos industriais, como a insulina e o hormônio do crescimento humano, a partir de micro-organismos geneticamente modificados. A fermentação industrial também é utilizada na biotecnologia para obtenção de produtos úteis a partir de células geneticamente modificadas de plantas e animais (veja o Capítulo 9). Por exemplo, células animais são utilizadas para a produção de anticorpos monoclonais (veja o Capítulo 18, página 507).

Recipientes para a fermentação industrial são denominados **biorreatores**; eles são projetados com atenção especial para a a-

eração e o controle de pH e de temperatura. Existem muitos tipos de equipamentos diferentes, mas os mais amplamente utilizados são os biorreatores de agitação contínua (**Figura 28.10**). O ar é introduzido por meio de um difusor na base (que quebra o fluxo de ar de entrada para maximizar a aeração), e uma série de pás impulsoras e uma parede defletora que impede a passagem de fluidos mantêm a suspensão bacteriana sob agitação. O oxigênio não é muito solúvel em água, sendo difícil manter a suspensão bacteriana bem aerada. Muitos projetos altamente sofisticados vêm sendo desenvolvidos para atingir uma eficiência máxima de aeração e outras necessidades para o crescimento, incluindo a formulação do meio. O grande valor dos produtos de micro-organismos geneticamente modificados e células eucarióticas estimula o desenvolvimento de novos tipos de biorreatores e controles computadorizados para eles.

Alguns biorreatores são bastante grandes, comportando até 500.000 L. Quando o produto é retirado ao final da fermentação, o processo é conhecido como *produção de lote*. Existem outros projetos de fermentadores. Para o *fluxo de produção contínua*, no qual



(a) Secção de um biorreator de agitação contínua.



(b) Um tanque biorreator à esquerda.

**Figura 28.10** Biorreatores para fermentações industriais.

**P** Identifique uma diferença essencial entre o biorreator ilustrado e uma dorna para a produção de cerveja.

os substratos (em geral uma fonte de carbono) são continuamente introduzidos e passam por enzimas imobilizadas ou por uma cultura de células em crescimento, o meio gasto e o produto desejado são removidos constantemente.

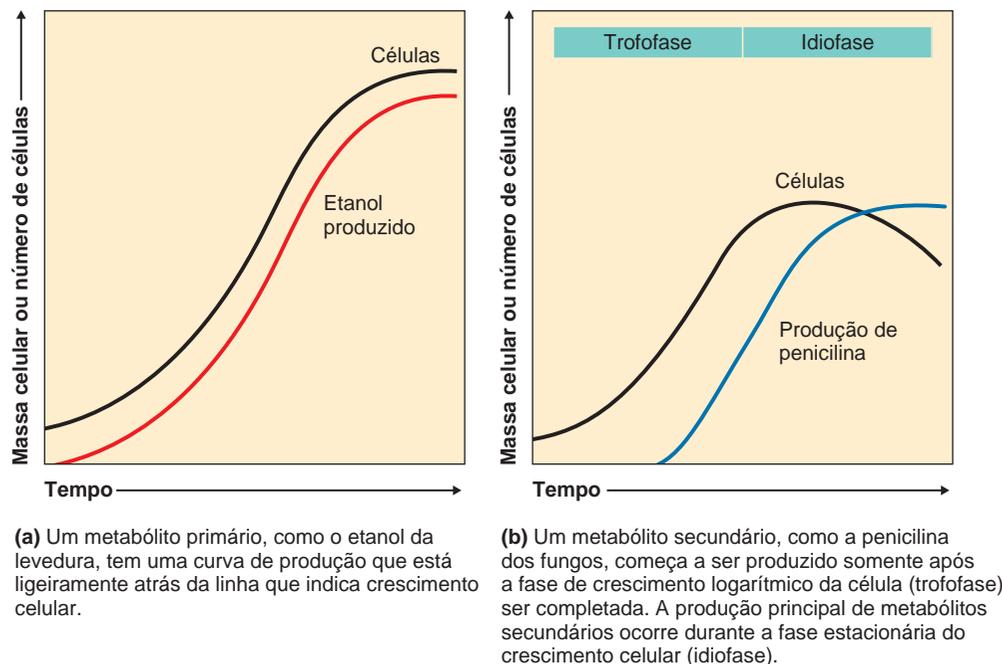
De maneira geral, os micro-organismos na fermentação industrial produzem tanto metabólitos primários, como o etanol, quanto metabólitos secundários, como as penicilinas. Um **metabólito primário** é formado praticamente ao mesmo tempo que as novas células, e a curva de produção acompanha a curva de crescimento celular quase em paralelo, com um atraso mínimo (**Figura 28.11a**). **Metabólitos secundários** não são produzidos até que o micro-organismo tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico, conhecida como **trofofase**, e tenha entrado na fase estacionária do ciclo de crescimento (**Figura 28.11b**). O período seguinte, durante o qual a maioria dos metabólitos secundários é produzida, é denominado **idiofase**. O metabólito secundário pode ser uma conversão microbiana do metabólito primário. Por outro lado, pode ser um produto metabólico do meio original de crescimento que o micro-organismo produz somente depois que um número considerável de células e metabólitos primários tenha sido acumulado.

A melhoria de linhagens também é uma atividade em desenvolvimento na microbiologia industrial. (Uma **linhagem** microbiana difere fisiologicamente de maneira significativa. Por

exemplo, ela tem uma enzima que realiza algumas funções adicionais ou não possui essa habilidade, porém essa não é uma diferença suficiente para mudar sua identidade de espécie.) Um exemplo bem conhecido é o fungo utilizado para a produção de penicilina. A cultura original de *Penicillium* não produz penicilina em quantidade suficiente para uso comercial. Uma cultura mais eficiente foi isolada de um melão cantalupo mofado de um supermercado em Peoria, no estado norte-americano do Illinois. Essa linhagem foi tratada de várias formas, com luz UV, raios X e nitrogênio mostarda (um agente químico mutagênico). A seleção de mutantes, incluindo alguns que surgiram de modo espontâneo, rapidamente aumentou a taxa de produção em um fator maior que 100. Hoje, o fungo original produtor de penicilina produz não apenas 5 mg/L, mas 60.000 mg/L. Melhorias nas técnicas de fermentação chegaram a quase triplicar esse rendimento. Um exemplo de uma linhagem desenvolvida pelo enriquecimento e pela seleção é descrito no quadro da página 801.

### Enzimas imobilizadas e micro-organismos

Em muitos casos, os micro-organismos são considerados pacotes de enzimas. As indústrias estão aumentando o uso de enzimas livres isoladas de micro-organismos para fabricar vários produtos, como xaropes com alto teor de frutose, papel e têxteis. A demanda para tais enzimas é alta porque elas são específicas e não ge-



**Figura 28.11** Fermentação primária e secundária.

**P** Qual é a origem de um metabólito secundário?

ram produtos residuais caros ou tóxicos. Além disso, diferente dos processos químicos tradicionais que requerem calor ou ácido, as enzimas atuam sob condições moderadas e são seguras e biodegradáveis. Para a maioria dos propósitos industriais, as enzimas devem estar imobilizadas na superfície de algum suporte sólido ou então ser manipuladas para que possam converter um fluxo contínuo de substrato para produzir sem que ocorram perdas.

Técnicas de fluxo contínuo também são adaptadas para células vivas íntegras e às vezes para células mortas (Figura 28.12). Sistemas de células íntegras são difíceis de aerar e não possuem a especificidade de uma enzima imobilizada. Entretanto, células íntegras são vantajosas se o processo requer uma série de etapas que podem ser realizadas por uma enzima do micro-organismo. Elas também apresentam a vantagem de permitir os processos de fluxo contínuo com grandes populações de células operando em altas taxas de reação. Células imobilizadas, que em geral estão ancoradas a pequenas esferas ou fibras microscópicas, atualmente são usadas na fabricação de xaropes com alto teor de frutose, ácido aspártico e vários outros produtos de biotecnologia.

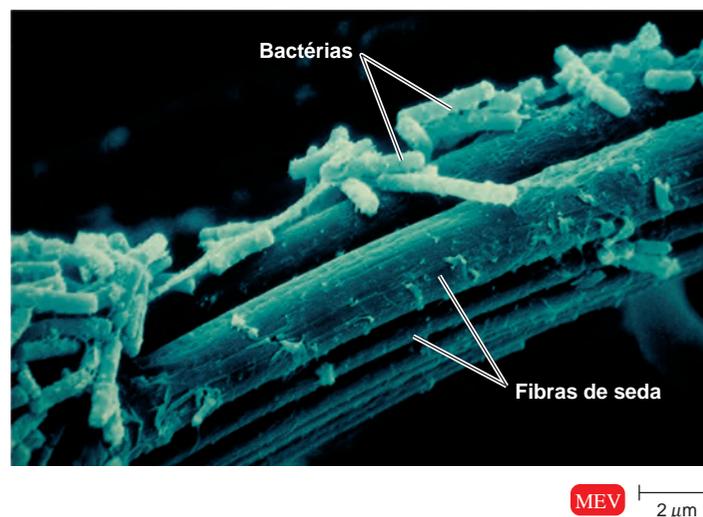
**TESTE SEU CONHECIMENTO**

- ✓ Os reatores são desenvolvidos para funcionar aeróbica ou anaerobicamente? **28-4**
- ✓ A penicilina é produzida em maior quantidade depois da trofofase da fermentação. Isso faz com que ela seja um metabólito primário ou secundário? **28-5**

**Produtos industriais**

Como mencionado anteriormente, a fabricação do queijo produz um resíduo orgânico chamado de soro, que deve ser descartado no

esgoto ou seco e queimado como resíduo sólido. Esses dois processos são dispendiosos e ecologicamente problemáticos. Entretanto, os microbiologistas descobriram uma aplicação alternativa para o soro, como discutido no quadro da página 801. Dessa forma, eles estão criando novos usos para produtos antigos e gerando novos produtos. Nesta seção, discutiremos alguns dos produtos microbia-



**Figura 28.12** Células imobilizadas. Em alguns processos industriais, as células são imobilizadas em superfícies como as fibras de seda mostradas aqui. O substrato flui pelas células imobilizadas.

**P** Como este processo assemelha-se à ação de um filtro bacteriano em uma estação de tratamento de esgoto?

nos comerciais mais importantes e o crescimento da indústria de energia alternativa.

### Aminoácidos

Os aminoácidos tornaram-se o principal produto industrial de micro-organismos. Por exemplo, mais de 600 mil toneladas de *ácido glutâmico* (L-glutamato), utilizado para fazer o realçador de sabor glutamato de sódio, são produzidas todos os anos. Certos aminoácidos, como a *lisina* e a *metionina*, não podem ser sintetizados por animais e estão presentes somente em baixos níveis em uma dieta normal. Entretanto, a síntese comercial de lisina e alguns outros aminoácidos essenciais como suplemento alimentar na forma de cereais é uma indústria importante. Mais de 70 mil toneladas de lisina e metionina são produzidas todos os anos.

Dois aminoácidos sintetizados microbiologicamente, a *fenilalanina* e o *ácido aspártico* (L-aspartato), tornaram-se importantes como ingredientes no adoçante livre de açúcar aspartame (NutraSweet). Cerca de 3.000 a 4.000 toneladas de cada um desses aminoácidos são produzidas anualmente nos Estados Unidos.

Na natureza, os micro-organismos raramente produzem aminoácidos que excedem suas próprias necessidades porque a inibição por retroalimentação previne o desperdício da produção de metabólitos primários (veja o Capítulo 5, página 120). A produção microbiana comercial de aminoácidos depende de mutantes especialmente selecionados e, algumas vezes, de manipulações engenhosas das vias metabólicas. Por exemplo, em aplicações em que somente o L-isômero de um aminoácido é desejado, a produção microbiana que forma somente o L-isômero tem uma vantagem sobre a produção química, que forma tanto o **D-isômero** quanto o **L-isômero** (veja a Figura 2.13, página 43).

### Ácido cítrico

O *ácido cítrico* é um constituinte de frutas cítricas, como as laranjas e os limões, e por muito tempo essa foi sua única fonte industrial. Entretanto, nos últimos 100 anos, o ácido cítrico foi identificado como um produto do metabolismo de fungos. Essa descoberta foi utilizada pela primeira vez como um processo industrial quando a Primeira Guerra Mundial interferiu no cultivo do limão italiano. O ácido cítrico tem uma grande variedade de usos, além de dar acidez e sabor aos alimentos. Ele é um antioxidante e é usado para ajustar o pH em muitos alimentos, sendo utilizado com frequência em laticínios como emulsificador. Mais de 550 mil toneladas de ácido cítrico são produzidas todos os anos nos Estados Unidos. A maior parte é produzida por um fungo, *Aspergillus niger*, utilizando melado como substrato.

### Enzimas

As enzimas são amplamente utilizadas em diferentes indústrias. Por exemplo, as *amilases* são usadas na produção de xaropes a partir de amido de milho, na produção de papéis especiais (como o revestimento liso desta página) e na produção de glicose a partir de amido. A produção microbiológica de amilase é considerada a primeira patente de biotecnologia expedida nos Estados Unidos, a qual foi concedida ao cientista japonês Jokichi Takamine. O processo básico pelo qual os mofos eram usados para fazer uma preparação enzimática conhecida como **koji** já era utilizado há séculos no Japão para fabricar produtos fermentados à base de soja. Koji

é uma abreviação da palavra japonesa que significa “florescer do mofo”, significando a infiltração de um substrato de cereal, como arroz ou uma mistura de trigo e soja, por um fungo filamentosos (*Aspergillus*). Inicialmente, as amilases no koji transformam o amido em açúcares, mas os preparados de koji também contêm enzimas proteolíticas que convertem a proteína da soja em uma forma mais digerível e saborosa. Esta é a base das fermentações de soja, que é o principal componente da dieta japonesa, como o *molho de soja* e o *missô* (uma pasta de soja fermentada com sabor de carne). O *saquê*, o conhecido vinho de arroz japonês, faz uso das amilases do koji para transformar os carboidratos do arroz em uma forma que as leveduras possam usar para produzir álcool. Isso equivale aproximadamente ao malte Barley (página 800) usado na produção de cerveja.

A *glicose-isomerase* é uma enzima importante; ela converte a glicose que a amilase forma a partir do amido em frutose, usada na substituição da sacarose como adoçante em muitos alimentos. Provavelmente a metade dos pães fabricados nos Estados Unidos seja produzida com o auxílio das *proteases*, as quais ajustam a quantidade de glúten (proteína) no trigo, de maneira que os pães fabricados apresentam melhor qualidade ou são feitos de modo uniforme. Outras enzimas proteolíticas são utilizadas como amaciadores de carne ou em detergentes como um aditivo para remover manchas de origem proteica. Cerca de um terço de toda a produção industrial de enzimas tem essa finalidade. A *renina* é uma enzima utilizada para formar o coalho no leite, sendo normalmente produzida em escala comercial por fungos e mais recentemente por bactérias geneticamente modificadas. Um exemplo de um produto do vestuário popular que utiliza enzimas é descrito no quadro do Capítulo 1, página 3.

### Vitaminas

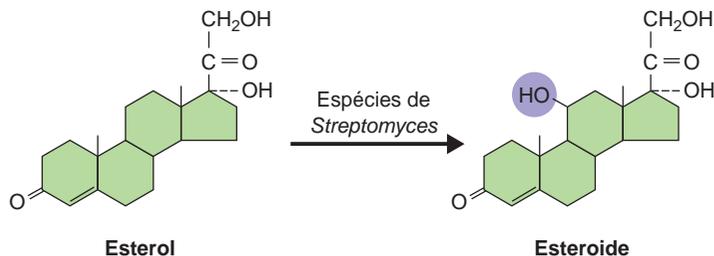
As vitaminas são vendidas em grandes quantidades combinadas na forma de pastilhas e são utilizadas como suplementos alimentares. Os micro-organismos podem fornecer uma fonte de baixo custo de algumas vitaminas. A *vitamina B<sub>12</sub>* é produzida por espécies de *Pseudomonas* e *Propionibacterium*. A *riboflavina* (*B<sub>2</sub>*) é outra vitamina produzida por fermentação, principalmente por fungos como *Ashbya gossypii*. A *vitamina C* (ácido ascórbico) é produzida em uma taxa de 20.000 toneladas por ano por uma complexa modificação da glicose por espécies de *Acetobacter*.

### Produtos farmacêuticos

A microbiologia farmacêutica moderna foi desenvolvida depois da Segunda Guerra Mundial, com a introdução da produção de antibióticos.

Todos os antibióticos eram originalmente produtos do metabolismo microbiano. Muitos ainda são produzidos por fermentações microbianas, e o trabalho continua na seleção de mutantes mais produtivos por manipulações nutricionais e genéticas. Pelo menos 6.000 antibióticos foram catalogados. Um organismo, o *Streptomyces hygroscopicus*, possui linhagens diferentes que produzem quase 200 antibióticos diferentes. Os antibióticos são comumente produzidos na indústria pela inoculação de uma solução de meio de crescimento com esporos dos fungos apropriados ou estreptomicetos, seguida de aeração vigorosa.

As vacinas são um produto da microbiologia industrial. Muitas vacinas antivirais são produzidas em massa em ovos de galinha ou



**Figura 28.13 A produção de esteroides.** Aqui é mostrada a conversão de um componente precursor como o esteroide em um esteroide por *Streptomyces*. A adição de um grupo hidroxila ao carbono de número 11 (destacado em roxo no esteroide) requer mais de 30 etapas por métodos químicos, mas o micro-organismo pode adicioná-lo em apenas uma etapa.

**P** Dê o nome de um produto comercial que é um esteroide.

cultura de células. A produção de vacinas contra as doenças bacterianas normalmente necessita do crescimento de grandes quantidades de bactérias. A tecnologia do DNA recombinante é cada vez mais importante no desenvolvimento e na produção de vacinas de subunidade (veja o Capítulo 18, página 502).

Os esteroides são um importante grupo de substâncias químicas que incluem a *cortisona*, que é utilizada como droga anti-inflamatória, e os *estrógenos* e as *progesteronas*, que são utilizados como contraceptivos orais. Recuperar esteroides de fontes animais ou sintetizá-los quimicamente é difícil, mas os micro-organismos podem sintetizá-los a partir de esteróis ou compostos relacionados, facilmente obtidos. Por exemplo, a **Figura 28.13** ilustra a conversão de um esteroide em um esteroide de valor comercial.

### Extração de cobre por lixiviação

O *Thiobacillus ferrooxidans* é utilizado na recuperação de classes de minério de cobre não lucrativas, que algumas vezes contêm somente 0,1% de cobre. Pelo menos 25% do cobre no mundo são produzidos dessa forma. As bactérias *Thiobacillus* retiram sua energia de oxidação da forma reduzida do ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o sulfeto ferroso, para uma forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), o sulfato férrico. O ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) também é um produto da reação. A solução ácida de  $\text{Fe}^{3+}$  contendo água é aplicada por borrifadores, e ocorre a percolação pelo minério (**Figura 28.14**). O íon ferroso,  $\text{Fe}^{2+}$ , e o *T. ferrooxidans* normalmente estão presentes no minério e continuam contribuindo para as reações. O  $\text{Fe}^{3+}$  na água dos borrifadores reage com o cobre insolúvel ( $\text{Cu}^0$ ) no sulfeto de cobre no minério para formar o cobre solúvel ( $\text{Cu}^{2+}$ ), que assume a forma de sulfatos de cobre. Para manter um pH bastante baixo, mais ácido sulfúrico pode ser adicionado. O sulfato de cobre desce para os tanques de coleta, onde entra em contato com fragmentos de ferro metálico. Os sulfatos de cobre reagem quimicamente com o ferro e se precipitam como cobre metálico ( $\text{Cu}^0$ ). Nessa reação, o ferro metálico ( $\text{Fe}^0$ ) é convertido em íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que é reciclado para um tanque de oxidação aerado, onde as bactérias *Thiobacillus* o utilizam como energia para reiniciar o ciclo. Esse processo, embora bastante demorado, é econômico e pode recuperar até 70% do cobre no minério. Minérios de urânio, ouro e

cobalto são processados de maneira similar. O processo completo assemelha-se a um biorreator de fluxo contínuo.

### Micro-organismos como produtos industriais

Os micro-organismos, por si mesmos, podem constituir um produto industrial. A *levedura do pão* (*S. cerevisiae*) é produzida em grandes tanques de fermentação aerados. Ao final da fermentação, o conteúdo dos tanques é de cerca de 4% de massa de leveduras. As células são coletadas por centrifugação contínua e são prensadas em pacotes vendidos para preparação de bolos caseiros. As padarias compram as leveduras por atacado em caixas de aproximadamente 23 kg.

Outros micro-organismos importantes vendidos industrialmente são as bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Esses micro-organismos normalmente são misturados com musgo de turfa para preservar a umidade; o fazendeiro mistura o musgo de turfa e o inóculo bacteriano com as sementes de leguminosas para garantir a infecção da planta com linhagens fixadoras de nitrogênio (veja o Capítulo 27). Por muitos anos, os jardineiros utilizaram o patógeno de insetos *Bacillus thuringiensis* para controlar a larva de insetos comedora de folhas. Essa bactéria produz uma toxina (toxina Bt) que mata algumas traças, besouros e moscas quando ingerida por suas larvas. A subespécie *israelensis* de *B. thuringiensis* produz a toxina Bt especialmente ativa contra larvas de mosquitos e é muito utilizada nos programas de controle municipais. Produtos comerciais contendo a toxina Bt e endosporos de *B. thuringiensis* estão disponíveis em quase todas as lojas de acessórios para jardinagem. Para um exemplo de micro-organismos que estão sendo desenvolvidos para detectar produtos químicos, veja o quadro da página 801.

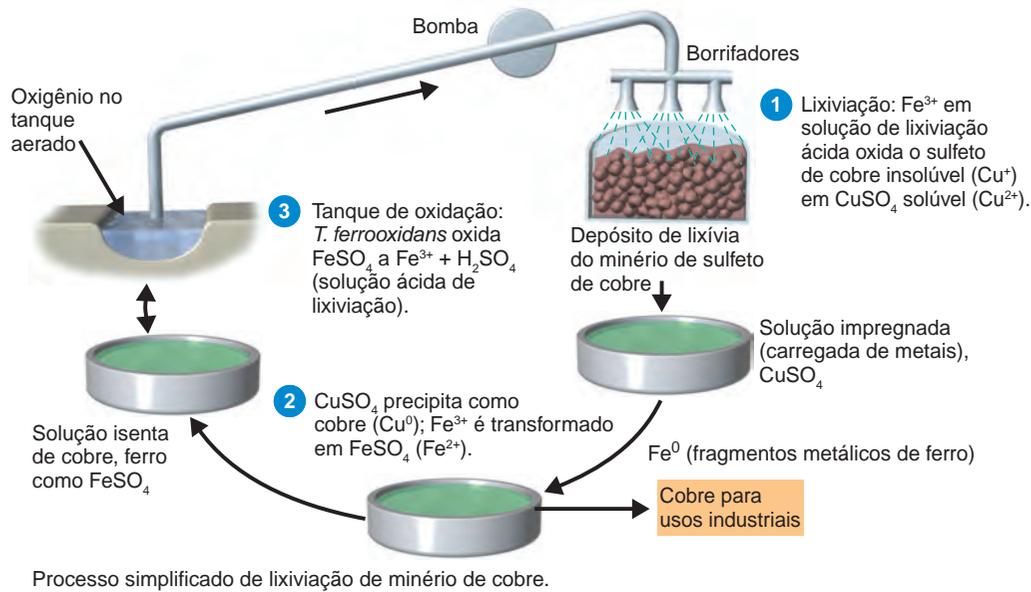
### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Há um tempo, o ácido cítrico era extraído em escala industrial de limões e outras frutas cítricas. Qual organismo é usado para produzi-lo hoje? **28-6**

### Fontes alternativas de energia que utilizam micro-organismos

À medida que nossas fontes de combustíveis fósseis diminuem ou tornam-se mais caras, o interesse no uso de fontes de energia renováveis aumenta. A **biomassa**, a principal dessas fontes, é a matéria orgânica total produzida por organismos vivos, incluindo culturas, árvores e resíduos municipais. Os micro-organismos podem ser usados para a **bioconversão**, o processo de converter biomassa em fontes de energia alternativa. A bioconversão também pode diminuir a quantidade de resíduo material que necessita de descarte.

O **metano** é uma das mais convenientes fontes de energia produzidas pela bioconversão. Muitas comunidades produzem quantidades úteis de metano a partir de resíduos de aterros (**Figura 28.15**). Grandes lotes de alimentação de gado devem desfazer-se de imensas quantidades de esterco animal, e muitos esforços têm sido empregados na elaboração de métodos práticos para a produção de metano a partir desses resíduos. O maior problema com qualquer projeto de produção de metano em larga escala é



**Figura 28.14 Lixiviação microbológica de minério de cobre.** A química do processo é muito mais complicada do que mostrado aqui. Essencialmente, as bactérias *Thiobacillus ferrooxidans* são usadas em um processo químico/biológico que transforma o cobre insolúvel no minério em cobre solúvel, que é lixiviado e precipitado como cobre metálico. As soluções recirculam continuamente.

**P** Cite outro metal recuperado por um processo similar.

a necessidade de concentrar de maneira econômica o material da biomassa espalhado. Se pudessem ser economicamente concentrados, os resíduos animais e humanos dos Estados Unidos poderiam produzir muito da energia atualmente fornecida por combustíveis fósseis e gás natural.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Os aterros são locais onde ocorre uma importante forma de bioconversão – qual é o produto? **28-7**

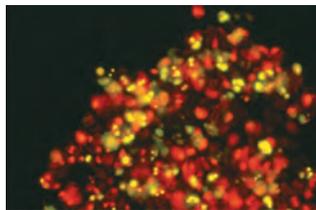
### Biocombustíveis

À medida que o abastecimento de combustíveis fósseis com base em petróleo torna-se mais caro, e algumas vezes incerto, o interesse na substituição por combustíveis renováveis, os **biocombustíveis**, tem aumentado. O interesse inicial centrou-se no **etanol**, o qual já é amplamente utilizado como um suplemento para a gasolina (90% gasolina + 10% etanol), e a tecnologia é bem estabelecida. O Brasil, por exemplo, produz uma grande quantidade de etanol a partir da cana-de-açúcar, cerca de um terço do combustível para transporte. Nos Estados Unidos, um número limitado de automóveis é adaptado para usar E85 (15% gasolina + 85% etanol). O etanol tem, entretanto, alguns problemas: ele não pode ser transportado por gasodutos convencionais (por absorver água muito facilmente) e tem 30% de perda de energia em relação à gasolina. Também, produzir etanol a partir do milho cria pressões no suprimento e nos preços de um gênero alimentício de valor comercial.



**Figura 28.15 Produção de metano a partir de resíduos sólidos em aterros.** O metano acumula-se nos aterros e pode ser usado para energia. Esta instalação perto de Los Angeles tem 50 microturbinas que geram eletricidade a partir do metano produzido em um aterro. Logo atrás das microturbinas estão cinco pilhas de queima de gás que encobrem o excesso de metano queimado – uma exigência para que as aeronaves não confundam isso com a iluminação do aeroporto.

**P** Como o metano é produzido em um aterro?



MO | 10 μm



**Figura 28.16 Biorreatores de algas.** Uma concepção artística de um campo de biorreatores de algas que poderiam produzir biocombustíveis em escala industrial. Micrografia: esta cultura manchada de algas verdes mostra gotículas de óleo como áreas amarelas; as áreas vermelhas indicam clorofila.

**P** Os campos de produção para os biorreatores de algas seriam encontrados no Arizona ou em Iowa?

Estes inconvenientes têm aumentado o interesse em biocombustíveis derivados de materiais celulolíticos, como espiga de milho, madeira e resíduo de papel, e a partir de culturas não alimentares, como a grama do tipo *switchgrass* – que constituiu as pradarias do Midwest. Tais gramas são perenes e requerem um pouco mais de atenção na colheita. A tecnologia para a produção de etanol a partir de celulose é pouco conhecida e seu custo é mais alto do que a produção a partir de milho e cana-de-açúcar. As moléculas de açúcar que compõem a celulose devem ser quebradas e separadas por enzimas – uma possibilidade que é o foco de intensificação das pesquisas. As fontes dessas enzimas podem ser os cupins ou os fungos que atacam as barracas de algodão do exército na Segunda Guerra Mundial. Fontes de *celulose* também contêm quantidades significativas de um componente similar, a *hemicelulose*, que vai requerer organismos capazes de digeri-la – provavelmente micro-organismos geneticamente modificados. O componente da celulose resistente à digestão, a *lignina*, poderia ser queimado, gerando calor para as etapas iniciais do processo fermentativo.

Alcoóis “superiores” com longas cadeias de carbono, e especialmente alcoóis “ramificados”, podem apresentar vantagens sobre o etanol convencional. Eles podem ter uma baixa capacidade de ab-

sorção de água e um alto conteúdo energético. Atualmente, há pelo menos uma bactéria geneticamente modificada capaz de produzir várias formas de alcoóis superiores a partir de glicose. Alcoóis superiores também podem ser unidos por processamento químico a partir de hidrocarbonetos de cadeia curta.

Um organismo teoricamente atraente na produção de biocombustíveis é a alga. As algas oferecem diversas vantagens; por exemplo, elas não ocupam terras necessárias para a produção de alimentos. Além disso, produzem 40 vezes a energia por acre em relação à produção do milho – e a terra na qual as algas crescem pode ser improdutivo, desde que tenha luz solar abundante (Figura 28.16). Os sites de produção experimental de algas têm utilizado as emissões de dióxido de carbono das usinas para acelerar o crescimento. As algas podem ser colhidas quase que diariamente. O óleo retirado delas pode ser transformado em biodiesel e possivelmente combustível para motor a jato: algas típicas produzem 20% do seu peso em óleo e algumas até mais. Depois da extração do óleo, o remanescente, rico em carboidratos e proteínas, pode ser usado para produzir etanol ou como alimento para animais.

O hidrogênio é um forte candidato para substituir os combustíveis fósseis, especialmente se puder ser produzido pela hidrólise da água. Ele pode ser usado em células combustíveis para gerar eletricidade e ser queimado para gerar energia, pois não produz resíduos prejudiciais. A maioria das pesquisas na produção de hidrogênio tem o foco nos métodos físicos e químicos, mas existe também a possibilidade da utilização de bactérias ou algas para produzir hidrogênio a partir da fermentação de vários produtos residuais ou por alterações da fotossíntese.

As metodologias destacadas levarão tempo para desenvolver seu potencial. Atualmente, a ciência está nas fases iniciais do processo de aprendizagem, nas quais todas as novas tecnologias se baseiam.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Como os micro-organismos podem fornecer combustíveis para carros e eletricidade? 28-8

### Microbiologia industrial e o futuro

Os micro-organismos têm sido extremamente úteis para a humanidade, mesmo quando sua existência era desconhecida. Eles irão continuar sendo parte essencial de muitas tecnologias de processamento de alimentos. O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante intensificou o interesse na microbiologia industrial, expandindo o potencial para novos produtos e aplicações (veja o quadro no Capítulo 1, página 3). À medida que o suprimento de energia fóssil torna-se mais escasso, o interesse em fontes renováveis de energia, como o hidrogênio e o etanol, aumenta. O uso de micro-organismos especializados para a produção em escala industrial provavelmente se tornará cada vez mais importante. À medida que novas aplicações biotecnológicas e produtos entram no mercado, irão afetar nossas vidas e nosso bem-estar de modo inimaginável.

## RESUMO PARA ESTUDO

### Microbiologia dos alimentos (p. 794-800)

1. Os primeiros métodos para a conservação dos alimentos foram secagem, adição de sal ou açúcar e fermentação.

### Alimentos e doenças (p. 794)

2. A segurança dos alimentos é monitorada pela FDA, pelo USDA e também pelo uso do sistema APPCC.

### Alimentos enlatados industrialmente (p. 794, 795)

3. A esterilização comercial de alimentos é realizada por vapor sob pressão em uma retorta.
4. A esterilização comercial aquece os alimentos enlatados a uma temperatura mínima necessária para destruir os endosporos de *Clostridium botulinum*, diminuindo a alteração do alimento.
5. O processo de esterilização comercial utiliza calor suficiente para reduzir a população de *C. botulinum* por 12 ciclos logarítmicos (tratamento 12D).
6. Os endosporos de termófilos podem sobreviver à esterilização comercial.
7. Alimentos enlatados estocados acima de 45°C podem ser estragados por anaeróbicos termofílicos.
8. A deterioração anaeróbica termofílica algumas vezes é acompanhada de produção de gás; se não houver formação de gás, a deterioração é denominada deterioração por acidez plana.
9. A deterioração por bactérias mesofílicas geralmente se deve a procedimentos impróprios de aquecimento ou por vazamentos.
10. Alimentos ácidos podem ser preservados pelo aquecimento a 100°C, pois os micro-organismos que sobrevivem não são capazes de crescer em pH baixo.
11. *Byssochlamys*, *Aspergillus* e *Bacillus coagulans* são micro-organismos ácido-tolerantes e resistentes ao calor que podem estragar alimentos ácidos.

### Empacotamento asséptico (p. 795, 796)

12. Materiais pré-esterilizados são montados em pacotes e preenchidos assepticamente com alimentos líquidos esterilizados pelo calor.

### Radiação e preservação de alimentos industriais (p. 796, 797)

13. Radiação gama e raio X podem ser utilizados para esterilizar alimentos, matar insetos e vermes parasitas e prevenir o brotamento de frutas e vegetais.



### Preservação de alimentos por alta pressão (p. 797)

14. Água pressurizada é utilizada para matar bactérias nas frutas e nas carnes.

### Papel dos micro-organismos na produção de alimentos (p. 797-800)

#### Queijo (p. 798, 799)

15. A proteína caseína do leite coagula por causa da ação de bactérias do ácido lático ou da enzima renina.
16. O queijo é o coalho separado da porção líquida do leite, denominada soro.



17. Os queijos firmes são produzidos pelas bactérias do ácido lático que crescem no interior do coalho.
18. O crescimento de bactérias no queijo é chamado de maturação.
19. Queijos de consistência semimacia são maturados pelo crescimento de bactérias na superfície; queijos macios são maturados pelo crescimento de *Penicillium* na superfície.

#### Outros produtos lácteos (p. 799)

20. O leiteiro antigamente era produzido pelo crescimento de bactérias do ácido lático durante o processo de fabricação da manteiga.
21. O leiteiro comercial é feito deixando as bactérias do ácido lático crescerem no leite desnatado por 12 horas.
22. Creme azedo, iogurte, kefir e kumiss são produzidos por lactobacilos, estreptococos ou leveduras que crescem em leite com baixo teor de gordura.

#### Outras fermentações (p. 799, 800)

23. Os açúcares da massa do pão são fermentados pelas leveduras a etanol e CO<sub>2</sub>; o CO<sub>2</sub> faz o pão crescer.
24. Chucrute, pickles, azeitonas, molho de soja e mesmo o cacau e o café são produtos de fermentação microbiana.

#### Bebidas alcoólicas e vinagre (p. 800)

25. Carboidratos obtidos de cereais, batatas ou melado são fermentados por leveduras para produzir etanol na fabricação de cerveja, ale, saquê e bebidas alcoólicas destiladas.
26. Os açúcares em frutas como uvas são fermentados pelas leveduras para produzir vinhos.
27. Na fabricação dos vinhos, as bactérias do ácido lático convertem o ácido málico em ácido lático na fermentação maloláctica.
28. *Acetobacter* e *Gluconobacter* oxidam o etanol do vinho em ácido acético (vinagre).

### Microbiologia industrial (p. 800-808)

1. Os micro-organismos produzem álcool e acetona, que são utilizados em processos industriais.
2. A microbiologia industrial tem sido revolucionada pela habilidade das células geneticamente modificadas de gerar muitos produtos novos.
3. A biotecnologia é uma forma de se obter produtos comerciais utilizando organismos vivos.

### Tecnologia das fermentações (p. 802-804)

4. O crescimento de células em larga escala é denominado fermentação industrial.
5. A fermentação industrial é realizada em biorreatores, que controlam a aeração, o pH e a temperatura.
6. Metabólitos primários como o etanol são formados assim que as células crescem (durante a trofofase).
7. Metabólitos secundários como as penicilinas são produzidos durante a fase estacionária (idíofase).
8. Linhagens mutantes que produzem um produto específico podem ser selecionadas.

### Enzimas imobilizadas e micro-organismos (p. 803, 804)

9. Enzimas ou células integras podem estar ligadas a esferas sólidas ou fibras. Quando o substrato passa sobre a superfície, reações enzimáticas o modificam para o produto desejado.



10. Eles são utilizados para a fabricação de papéis, produtos têxteis e couro e são ambientalmente seguros.

### Produtos industriais (p. 804-806)

11. A maior parte dos aminoácidos utilizados em alimentos e na medicina é produzida por bactérias.
12. A produção microbiana de aminoácidos pode ser utilizada para produzir L-isômeros; a produção química resulta em D e L-isômeros.
13. Lisina e ácido glutâmico são produzidos por *Corynebacterium glutamicum*.
14. O ácido cítrico, utilizado em alimentos, é produzido pelo *Aspergillus niger*.
15. As enzimas utilizadas na fabricação de alimentos, medicamentos e outros gêneros são produzidas por micro-organismos.
16. Algumas vitaminas usadas como suplementos alimentares são produzidas por micro-organismos.
17. Vacinas, antibióticos e esteroides são produtos do crescimento microbiano.
18. As atividades metabólicas de *Thiobacillus ferrooxidans* podem ser usadas para recuperar minérios de urânio e cobre.

19. Leveduras são cultivadas para a fabricação de vinhos e pães; outros micro-organismos (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Bacillus thuringiensis*) são cultivados para o uso agrícola.

### Fontes alternativas de energia que utilizam micro-organismos (p. 806, 807)

20. Resíduos orgânicos, denominados biomassa, podem ser convertidos pelos micro-organismos no combustível alternativo metano, um processo denominado bioconversão.
21. Combustíveis produzidos por fermentação microbiana são metano, etanol e hidrogênio.

### Biocombustíveis (p. 807, 808)

22. Biocombustíveis incluem alcoóis e hidrogênio (a partir de fermentação microbiana) e óleos (a partir de algas).

### Microbiologia industrial e o futuro (p. 808)

23. A tecnologia do DNA recombinante continuará melhorando a habilidade da microbiologia industrial de produzir medicamentos e outros produtos.

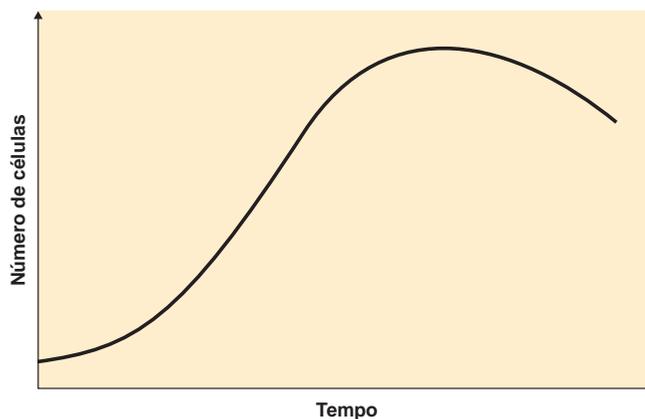
## QUESTÕES PARA ESTUDO

As respostas para as questões de revisão e múltipla escolha podem ser encontradas na seção *Respostas* deste livro.

### Revisão

1. O que é microbiologia industrial? Por que ela é importante?
2. Como a esterilização comercial difere dos procedimentos de esterilização utilizados em um hospital ou laboratório?
3. Por que uma lata de amoras preservada por esterilização comercial é comumente aquecida a 100°C em vez de no mínimo 116°C?
4. Descreva em linhas gerais as etapas da produção de queijos e compare a produção de queijos de consistência dura e mole.
5. A cerveja é feita com água, malte e leveduras; o lúpulo é adicionado para dar sabor. Qual é a função da água, do malte e das leveduras? O que é malte?
6. Por que um biorreator é melhor do que um grande frasco para a produção industrial de antibióticos?
7. A produção de papel inclui o uso de alvejantes e cola feita com formaldeído. A enzima microbiana xilanase branqueia o papel pela digestão das ligninas escuras. A oxidase faz com que as fibras fiquem juntas, e a celulase vai remover a tinta. Liste três vantagens do uso dessas enzimas microbianas sobre os métodos químicos tradicionais para a produção de papel.
8. Descreva um exemplo de bioconversão. Qual processo metabólico pode resultar em combustíveis?

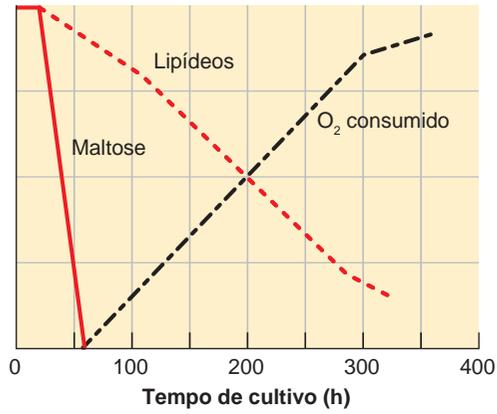
9. **DESENHE** Marque a trofofase e a idiofase neste gráfico. Indique quando os metabólitos primários e secundários são formados.



### Múltipla escolha

1. Os alimentos empacotados em plástico para aquecimento em micro-ondas são:
  - a. Desidratados.
  - b. Liofilizados.
  - c. Empacotados assepticamente.
  - d. Esterilizados comercialmente.
  - e. Autoclavados.
2. *Acetobacter* é necessária para somente uma das etapas da produção da vitamina C. A maneira mais fácil de realizar essa etapa seria:
  - a. Adicionar substrato e *Acetobacter* ao tubo de ensaio.





- Sob quais condições a efrotomicina é mais produzida? Ela é um metabólito primário ou secundário?
- Qual é usada primeiro, a maltose ou a glicose? Sugira uma razão para isso.
- Qual a função de cada ingrediente no meio de crescimento? (Dica: veja o Capítulo 6.)
- O que é *Streptomyces*? (Dica: veja o Capítulo 11.)

