

Área: Tecnologia de Alimentos

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus plantarum*: COMPARAÇÃO DE CULTIVOS COM E SEM AJUSTE DE pH

**Mariana Vilar Castro da Veiga de Mattos; Renata Aguirre Trindade; Adriel Penha
Munhoz; Fernanda Germano Alves Gautério; Carlos André Veiga Burkert**

*Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Curso de Engenharia de Alimentos, Escola de Química e
Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS*
marianavcvmattos@gmail.com

RESUMO – As bactérias lácticas são mencionadas na literatura como produtoras de ácido lático (AL), um produto amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica e têxtil. A utilização de coprodutos agroindustriais tem despertado interesse, pois além de minimizar os custos do processo, também evita o grande descarte deste produto que quando não tratado corretamente pode causar danos ambientais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de AL por *Lactobacillus plantarum* INCQS 00007 com e sem ajuste de pH ao longo do cultivo, utilizando como fonte de carbono o permeado de soro (PS). Os resultados mostraram que no cultivo que teve o pH ajustado resultou em uma maior concentração de biomassa (de $3,23 \pm 0,08$ para $4,43 \pm 0,16$ g L⁻¹), valores mais elevados de pH final ($3,80 \pm 0,01$ para $4,25 \pm 0,06$), menores valores de concentração de lactose não consumida ($6,06 \pm 0,25$ para $0,09 < 0,01$ g L⁻¹), e maiores concentrações de AL ($29,05 \pm 1,44$ para $39,36 \pm 1,41$ g L⁻¹).

Palavras-chave: Coprodutos agroindustriais; Ácido lático; Bactérias lácticas; Permeado de soro.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias lácticas são mencionadas na literatura como produtoras de AL, um composto versátil, utilizado na indústria química, farmacêutica, de alimentos e têxtil (HOFVENDAHL; HAHN-HADERDAL, 2000). De acordo com OLIVEIRA et al. (2009), aproximadamente 82% da produção mundial é utilizada pela indústria de alimentos, podendo ser utilizado como acidulante, antioxidante, estabilizante e também como agente de limpeza. Além disso, atuam como conservante natural nos alimentos, tais como iogurte, manteiga, vegetais em conservas, dentre outros (LUZ, 2014). O AL pode ser obtido tanto pela ação fermentativa quanto por síntese química. Porém, os processos fermentativos são mais vantajosos uma vez que possibilitam a utilização de substratos renováveis e de baixo custo, tais como: soro de leite, água de maceração de milho, melaços, entre outros (PINHO et al., 2016; OLIVEIRA; SOUSDALEFF, 2009).

De acordo com ZOCCAL (2016), 11 bilhões de litro de leite por ano são transformados em queijo no país, o que corresponde a 46% da produção do leite, sem considerar a produção informal. O soro de queijo é um líquido opaco, amarelo esverdeado, que contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite integral original, e

representa cerca de 80 a 90% do volume do leite utilizado na fabricação de queijo. Além disso, as aplicações do soro são inúmeras, englobando as indústrias de lácteos, carnes, condimentos (misturas secas), panificação, chocolate, aperitivos e bebidas, entre outras (ANDRADE; MARTINS, 2002). O PS é obtido quando o soro de queijo é ultrafiltrado para concentrar as proteínas, que ficam retidas e a lactose, sais minerais e vitaminas atravessam a membrana para o permeado (ANUÁRIO LEITE & DERIVADOS, 2012). O inconveniente é que estes coprodutos indevidamente tratados podem acarretar sérios problemas ambientais. Em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de aproximadamente 470 pessoas (ANDRADE; MARTINS, 2002).

O objetivo do trabalho foi comparar a produção de AL resultante do cultivo de *Lactobacillus plantarum* INCQS 00007 com e sem ajuste de pH, utilizando PS como fonte de carbono.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Micro-organismo

A bactéria *L. plantarum* INCQS 00007 foi disponibilizada na forma liofilizada, pelo Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS, 2015) – Fundação Oswaldo Cruz - localizado no Rio de Janeiro - RJ.

2.1.2 Permeado de soro

Foi utilizado o PS em pó, cedido pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - CETEC - UNIVATES, localizado em Lajeado-RS, produzido pela empresa Arla Foods Ingredients, localizada na Dinamarca, contendo aproximadamente 85 % (m v⁻¹) de lactose.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo do inóculo

A bactéria *L. plantarum* INCQS 00007 foi reativada a 37 °C em meio *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS). Para o preparo do inóculo, a cultura microbiana foi raspada com 10 mL de água peptonada 0,1%, transferindo para Erlenmeyer de 500 mL, contendo 90 mL de caldo MRS, incubada a 37°C até atingir a densidade ótica 1,0.

2.2.2 Cultivos de *L. plantarum*

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 200 mL de meio, inoculados com suspensão da bactéria em estudo (10%). Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada (Tecnal TE-424), retirando-se alíquotas em tempos pré-determinados, sendo estas centrifugadas sob refrigeração para as determinações analíticas no sobrenadante (pH, açúcar redutor e AL) e sedimento (biomassa). Os cultivos foram realizados sem e com o ajuste do pH ao longo do cultivo, sendo o ajuste realizado com a finalidade de evitar uma possível inibição da bactéria, sendo o ajuste realizado em aproximadamente 18 h de cultivo pela adição de NaOH (4 N), até pH 5,5-6,0.

Nos cultivos, foi utilizado o caldo MRS modificado após um delineamento experimental *Plackett Burman* (dados não apresentados) composto por 40 g L⁻¹ de PS, 20 g L⁻¹ de extrato de carne, 20 g L⁻¹ de peptona,

5 g L⁻¹ de acetato de sódio, 1,5 g L⁻¹ *tween* 80, 0,05 g L⁻¹ de sulfato de manganês, sem agitação na temperatura de 32 °C.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Determinação do pH

O pH do sobrenadante foi medido diretamente em medidor de pH (Marte MB-10, Brasil) (AOAC, 2000).

2.3.2 Determinação da biomassa

A biomassa foi monitorada pela absorbância a 600 nm do sedimento ressuspensionado em água (TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2008).

2.3.3 Determinação do açúcar redutor

A concentração de açúcar redutor foi determinada pelo método do ácido 3,5 ácido dinitrossalicílico, de acordo com Miller (1959), com medida de absorbância a 540 nm e conversão para g L⁻¹ a partir de uma curva padrão de lactose

2.3.4 Determinação do ácido láctico

Para determinação de AL, nas amostras foi adicionada acetona PA (1:3 v/v), para remoção de proteínas, sendo centrifugadas a 10.000 × g por 15 min, a acetona foi evaporada e as amostras devidamente diluídas, filtradas em membrana hidrofílica de 0,22 µm e transferidas para vials. O AL foi quantificado por cromatografia líquida (Shimadzu, Japão), utilizando uma coluna Aminex HPX - 87H (300 x 7,8 mm) (Bio-Rad, EUA), de acordo com Oliveira, Buzato e Haully (2005).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste t, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os cultivos, a 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

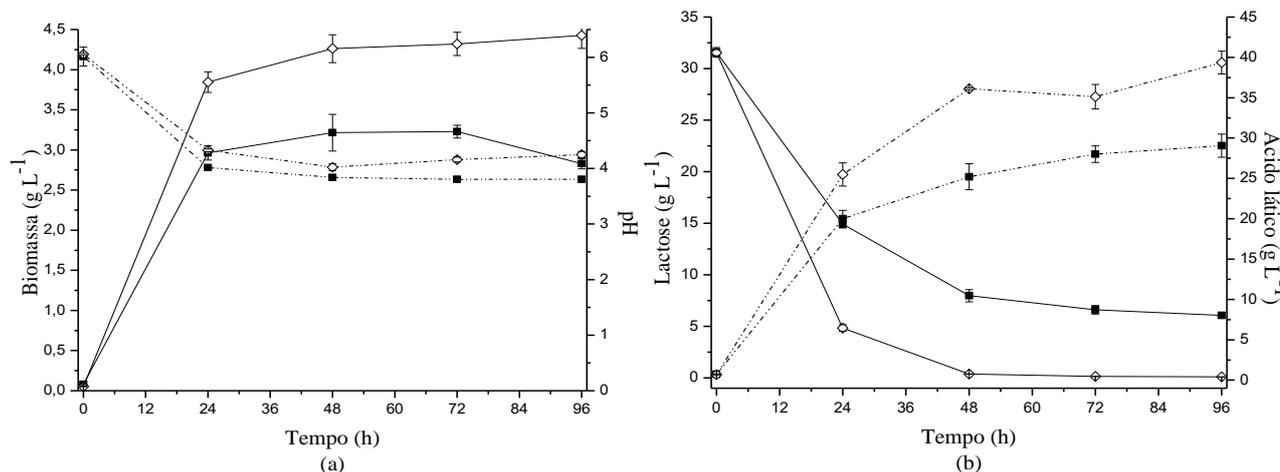
A Figura 1a apresenta o acompanhamento da biomassa e pH e a Figura 1b apresenta o consumo de lactose e a concentração de AL ao longo do tempo, com e sem ajuste do pH ao longo do cultivo. Ao comparar as duas condições, pode-se observar uma diferença bastante acentuada nos dois cultivos. Ao ajustar o pH do meio de cultivo, a concentração de biomassa passou de 3,23 ± 0,08 para 4,43 ± 0,16 g L⁻¹, o pH de 3,80 ± 0,01 manteve-se em torno de 4,25 ± 0,06 ao final do cultivo, a concentração de lactose não consumida passou de 6,06 ± 0,25 para 0,09 < 0,01 g L⁻¹, e a concentração do AL foi de 29,05 ± 1,44 para 39,36 ± 1,41 g L⁻¹.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o ajuste do pH resultou em uma maior concentração de biomassa, maiores valores de pH final, consumo total do substrato e maiores concentrações de AL.

Panesar et al. (2010), utilizando a bactéria *Lactobacillus casei* e como fonte de carbono soro de leite, avaliaram o efeito de diversos valores de pH inicial (5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 6,8) na produção do AL, obtendo como melhor resposta o pH de 6,5, alcançando 33,48 g L⁻¹ de AL, ao utilizar 35 g L⁻¹ de soro de leite, sendo observado um alto consumo da lactose e produção do AL, levando em consideração a concentração inicial da fonte de

carbono. Foi ainda observado que entre os pH estudados a concentração do AL manteve-se muito similar, havendo uma diminuição mais acentuada na concentração do AL apenas em pH 5,0.

Figura 1: Acompanhamento da biomassa e pH (a); concentração de lactose e AL (b) ao longo do tempo ■ sem ajuste do pH e ◇ com ajuste do pH, sendo linha contínua biomassa e lactose e linha pontilhada pH e AL



4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados pode-se concluir que o cultivo de *L. plantarum* INCQS 00007 com ajuste de pH resultou em maior consumo de lactose, maiores valores de pH final e maiores concentrações de biomassa e AL o que indica que a acidez do meio estava inibindo o crescimento da bactéria e, como consequência, impedindo a total conversão da lactose em AL. Além disso, o uso de PS como fonte de carbono mostrou-se como uma ótima alternativa, pois possibilita minimizar custos do processo, além de agregar valor à cadeia produtiva do leite.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem FAPERGS, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. L.; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 249-253, 2002. Anuário Leite & Derivados. Guia de referência do setor lácteo, 2012. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/permeado_de_soro.pdf>. Acesso em: 20 de março de 2018.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors effecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.

LUZ, R. **Bioprodução de ácido láctico a partir do resíduo de isolado proteico de soja**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2014.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

OLIVEIRA, A. L.; BUZATO, J. B.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n. 1, p. 9-15, 2000.

OLIVEIRA, R. F.; SOUSDALEFF, M. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Lorena, São Paulo, 2009.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; KOSSEVA, M. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

PINHO, C. L. C.; OLIVEIRA, C. E. S.; ARAÚJO, R. L.; FERREIRA, I. M.; COTRIM, W. S. Avaliação da produção de ácido láctico por via fermentativa com células livres e imobilizadas em reator batelada. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Gramado, RS, 2016.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-producing bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 61-73, 2015.

ZOCAL, R. Queijos: produção e importação, 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>>. Acesso em: 20 de março de 2018.