

Produção de ácido láctico a partir de soro de leite por bactérias lácticas imobilizadas em esferas de alginato de cálcio

RESUMO

Renata Lázara Araújoaraujorenata11@gmail.com

Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Barra do Garças, Campus Universitário do Araguaia.

Caroline Eliza Sgarbosa de Oliveiracaroline.sgarbosa@gmail.com

Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Barra do Garças, Campus Universitário do Araguaia.

Suiane Savazzisuianesavazzi@hotmail.com

Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Barra do Garças, Campus Universitário do Araguaia.

Tamires Krupptami_krupp@hotmail.com

Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Barra do Garças, Campus Universitário do Araguaia.

Weskley da Silva Cotrimwcotrim@gmail.com

Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Barra do Garças, Campus Universitário do Araguaia.

Neste trabalho estudou-se a produção de ácido láctico em reator batelada utilizando como substrato soro de leite suplementado com diferentes concentrações de extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (EL), por ação de cultura mista de *Lactobacillus acidophilus* LA-5[®], *Bifidobacterium* BB-12[®] e *Streptococcus thermophilus* imobilizada em esferas de alginato de cálcio, em diferentes temperaturas. Foram estudados dois fatores, concentração (CONC) e temperatura (TPR), sendo adotado os níveis de 0%, 6,5% e 13% para o fator concentração de extrato de levedura e 30°C, 34°C e 38°C para o fator temperatura. Observou-se que células imobilizadas não tiveram a taxa de produção de ácido láctico afetada pelo aumento da temperatura de fermentação. Por outro lado, o aumento na concentração de suplementação do meio por EL levou ao aumento da produção de ácido láctico. Foi avaliada também a viabilidade das esferas de alginato de cálcio quando reutilizadas para inocular novo meio de cultura. Após cinco ciclos de reutilização as esferas não apresentaram rachaduras e modificação no diâmetro médio. A concentração de ácido aumentou cerca de 157% entre o primeiro e o último ciclo de fermentação.

PALAVRAS-CHAVE: fermentação; células imobilizadas; extrato de levedura.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as indústrias têm sido requisitadas a adotarem processos produtivos que visem à diminuição da emissão de poluentes e a maximização do uso das matérias-primas de fontes renováveis. Além disso, a escassez de energia e preocupações com a poluição ambiental tem levado as indústrias a migrar seus processos produtivos para o segmento da Biotecnologia Industrial. Desta forma, a produção de ácido lático, por via biotecnológica, tem recebido grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento, por se tratar de um produto com ampla aplicação no segmento industrial, sendo consumido principalmente pela indústria alimentícia, química, de cosméticos e farmacêutica. Soma-se a isso o crescimento da demanda do ácido lático para produção de polímeros ácido poliláticos (PLA), de natureza biodegradável e biocompatível, os quais podem substituir os derivados do petróleo na produção de plásticos (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Ao longo dos anos, vários tipos de micro-organismos têm sido utilizados para a produção de ácido lático, dentre eles destacam-se as bactérias ácido lácticas (BAL). Tais micro-organismos podem crescer numa ampla faixa de pH, indo de 3,5 a 10,0 e por apresentarem boa termorresistência, sobrevivem numa faixa de temperatura que vai de 5°C até 45°C. Entretanto, algumas limitações também são observadas, entre elas a necessidade de um meio nutricionalmente rico em nitrogênio, vitaminas e sais minerais para o bom desempenho da fermentação láctica (RAMCHANDRAN *et al.*, 2012; ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Uma maneira promissora para suprir as necessidades nutricionais das bactérias ácido lácticas é o aproveitamento do soro de leite para a produção de ácido lático por via fermentativa. O soro de leite apresenta uma composição rica em lactose, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais, atendendo a maioria dos requisitos nutricionais dos micro-organismos fermentadores. No entanto, uma vez que as BAL não produzem quantidades suficientes de enzimas proteolíticas, se faz necessária a suplementação do meio com uma fonte de aminoácidos e vitaminas lipossolúveis (PANESAR *et al.*, 2010).

O extrato de levedura apresenta-se como uma alternativa de baixo custo para a suplementação do soro de leite, pois o mesmo é rico em aminoácidos e vitaminas do complexo B e é frequentemente utilizado para fornecer essas substâncias a meios de cultura bacteriológicos, sendo considerado indispensável para se obter rápidas taxas de crescimento e produção de ácido lático por bactérias do ácido lático (SCHEPERS; THIBAUT; LACROIX, 2006).

Outra possível solução para garantir o rendimento de processos fermentativos é o uso de células imobilizadas por aprisionamento em polímeros, permitindo que esses sejam realizados em condições adversas de pH, de esterilidade e agitação (WANG *et al.*, 2005).

Esse método se caracteriza por inúmeras vantagens frente a processos com células livres, dentre as quais se destacam: 1) a alta densidade celular por unidade de volume do biorreator, o que reduz o tempo de fermentação e aumenta a produtividade, além de reduzir riscos de contaminação; 2) melhora na estabilidade do biocatalisador, promovendo proteção contra o estresse ambiental e maior tolerância por altas concentrações de substrato e pelo produto final; 3) facilidade

de recuperação do produto com redução de operações unitárias; 4) permite o reaproveitamento das células microbianas, assim como o sistema de operação contínua; 5) permite processos contínuos em altas taxas de diluição sem que ocorra lavagem de células; além de 6) possibilitar projetos de biorreator com menor escala, reduzindo custos de capital (VERBELEN *et al.*, 2006).

A imobilização celular pelo método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio vem sendo muito estudada por ser um método simples e que permite uma retenção celular eficiente sem perda da atividade catalítica (MUSSATTO *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de ácido láctico em reator batelada, com células imobilizadas de cultura mista de *Lactobacillus acidophilus* LA-5[®], *Bifidobacterium* BB-12[®] e *Streptococcus thermophilus* em soro de leite suplementado com extrato de levedura liofilizado, em diferentes temperaturas.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICRO-ORGANISMOS

Para realização desse trabalho utilizou-se cultura comercial mista, da marca Bio-Rich[®], contendo os seguintes micro-organismos: *Lactobacillus acidophilus* LA-5[®], *Bifidobacterium* BB-12[®] e *Streptococcus thermophilus*.

PREPARO DA PRÉ-CULTURA MICROBIANA

Para o preparo da pré-cultura microbiana, 1 mg da cultura láctica desidratada (Bio-Rich[®]), contendo 1×10^5 UFC.mL⁻¹ dos micro-organismos, foi reativada em 100 mL de leite UHT, previamente aquecido a 45°C, e incubada durante 1 h, a 45°C, em incubadora Shaker, marca SOLAB, modelo SL 222.

IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS

As células microbianas foram imobilizadas pelo método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio, conforme Milessi *et al.* (2015). Em um béquer de 100 mL, 1g de Alginato de Sódio (GastronomyLab[®]) foi diluído em 40 mL de água destilada, previamente esterilizada em autoclave a 121°C, por 15 min. Em seguida adicionou-se à solução 30 mL da pré-cultura microbiana. Com o auxílio de uma seringa descartável de 5 mL, a mistura foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,2 M, sob agitação e mantida assim por 30 minutos, a 37°C, para cura das esferas formadas. As esferas foram separadas por filtração simples e lavadas duas vezes com água destilada para remoção do excesso dos íons de cálcio. Todas as esferas de alginato de sódio foram produzidas no momento do uso e adicionadas ao caldo de fermentação na proporção de 16 g de esfera para cada 300 mL de caldo de fermentação, para a obtenção da concentração celular final estimada em 1×10^5 UFC.mL⁻¹.

PREPARO DO EXTRATO DE LEVEDURA LIOFILIZADO

O extrato de levedura foi obtido a partir da fermentação alcoólica de solução de açúcar mascavo (União®) 15% (m/m). Em um barril de fermentação foram preparados 20 kg de uma solução de açúcar mascavo a 15% (m/m) diluído em água destilada, sendo este o caldo de fermentação. Uma alíquota dessa solução foi retirada e utilizada para preparar 3 kg de solução diluída a 5% (m/m) com água destilada, adicionando a esta aproximadamente 67 g de levedura *Saccharomyces cerevisiae* desidratada. Essa diluição com a levedura, denominada pré-cultura, foi incubada por 1 h, a 30 °C, sob agitação de 100 rpm em incubadora Shaker, marca SOLAB, modelo SL222.

Em seguida, a pré-cultura foi transferida para o barril de fermentação que já continha o caldo de fermentação, sendo incubado por 72 h a 30 °C. O produto da fermentação alcoólica foi centrifugado a 3500 rpm por 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado com água ultra pura e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado por 24 h, a -20 °C, sendo em seguida liofilizado em Liofilizador, marca LIOTOP, modelo L202, durante 48 h. O material liofilizado foi armazenado em frasco de vidro hermeticamente fechado até o momento do uso.

PREPARO DO SORO DE LEITE

O soro de leite foi obtido a partir de leite pasteurizado (Favorito®) adquirido no comércio local de Barra do Garças - MT. O leite foi aquecido a 45°C e adicionado de 1 mL de solução contendo a enzima quimosina (HÁ-LA®) para cada 1000 mL de leite, conforme orientação do fabricante da enzima, mantendo-o em temperatura ambiente por 1. Após a coagulação, o soro foi separado da massa por filtração simples e utilizado para elaboração do caldo de fermentação pela suplementação com o extrato de levedura liofilizado.

MEIO DE FERMENTAÇÃO

Em todos os experimentos, foram adicionados 300 mL de soro de leite, contendo 0%; 6,5% ou 13% de extrato de levedura (EL) e bactérias imobilizadas em alginato de cálcio, em frascos erlenmeyers de 500 mL, devidamente identificados e incubados nas temperaturas de 30 °C; 34 °C e 38 °C por 360 min, em incubadora Shaker (SOLAB - SL222) (NARENDRANATH, 2004). Nos tempos 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 210 min e 360 min, uma alíquota de 30 mL foi retirada de cada frasco para realização das análises de pH e acidez titulável. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

ACIDEZ TITULÁVEL EM ÁCIDO LÁTICO

A acidez titulável em ácido lático foi realizada através de titulação direta de 10 mL de cada amostra diluídas em 10 mL de água destilada e assim tituladas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, utilizando como indicador de

viragem, até a coloração rosa, 5 gotas de fenolftaleína a 1% (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O teor de ácido láctico foi determinado conforme Equação 1.

$$AL(mol L^{-1}) = \frac{V \times [NaOH] \times f_c}{V_a} \quad (1)$$

Sendo AL o teor de ácido láctico ($mol L^{-1}$); V o volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL); [NaOH] a concentração da solução de hidróxido de sódio utilizada; f_c o fator de correção da solução de hidróxido de sódio e V_a o volume da amostra (mL).

DETERMINAÇÃO DO pH

O pH de cada amostra foi medido com auxílio de potenciômetro digital de bancada, marca Ômega, modelo PHH222, previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4 e 7 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES NO LEITE

Para a determinação do teor de sólidos totais no soro de leite foi pesada uma amostra de 100 g de soro de leite, em triplicata, em béqueres limpos, secos e previamente pesados. Os béqueres foram mantidos em estufa simples com ventilação para completa evaporação da água. Nas primeiras três horas as amostras foram submetidas a um tratamento de 85 °C. Em seguida a temperatura foi elevada a 105 °C e assim mantida até obtenção de peso constante. O teor de sólidos totais foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$ST(\%) = \frac{MB - B}{MA} \times 100 \quad (2)$$

Sendo ST (%) o teor de sólidos totais da amostra; MB o peso da amostra seca acrescido do peso do béquer (g); B o peso do béquer vazio (g) e MA o peso da amostra (g).

VIABILIDADE DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

As esferas de alginato de cálcio foram previamente preparadas conforme item de imobilização de células microbianas. Em seguida foram introduzidas em soro de leite clarificado sendo analisado o pH e a produção de ácido láctico das mesmas durante 30 h a 38 °C. A cada 6 h, após o início da fermentação, as esferas eram retiradas do meio fermentado e recolocadas em um novo meio recém-preparado. Para a determinação de pH e produção de ácido láctico uma alíquota de 30 mL era retirada do meio de fermentação no início e no fim da operação.

Com o auxílio de um paquímetro foi determinado o diâmetro das esferas. Também foi realizada inspeção visual para verificar presença de esferas rachadas, quebradas ou em processo de deterioração.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial 3x3 onde os fatores foram temperatura (TPR) e concentração (CONC) de EL. Os dados foram analisados no software Action 2.9[®], utilizando como base o software R, versão 3.0.2, mediante análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas (TUKEY), quando necessário, adotando o nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES NO LEITE

A quantidade de Sólidos Totais (ST) encontrada no soro de leite foi de aproximadamente 8,54%. Giroto e Pawlowsky (2001) em seu trabalho sobre as alternativas para o beneficiamento do soro de leite, encontraram um teor de ST de aproximadamente 6%, proporção inferior a determinada no presente trabalho. Por outro lado, Desconsi *et al* (2014), ao avaliarem as propriedades físico-químicas do soro de leite concentrado obtido por osmose reversa, encontraram um teor de ST de aproximadamente 18%, concentração superior a estabelecida no presente trabalho. Essa diferença no teor de ST pode ser determinada no processo de obtenção do soro de leite, uma vez que esse processo representa um parâmetro semi-quantitativo sobre a quantidade de proteínas no soro. Quanto maior a concentração do teor total de proteína, maior o valor agregado de ST (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012) e, portanto, esta concentração pode ser dependente dos procedimentos utilizados no processo de fabricação de queijos, obtenção do soro e da qualidade do leite utilizado.

TEMPERATURA X CONCENTRAÇÃO DE EL PARA O pH DAS FERMENTAÇÕES

De acordo com a Tabela 1, observa-se que o pH das amostras em diferentes temperaturas, se mantêm constante ($p > 0,05$) até o tempo de 120 min. Após esse tempo, nota-se diferenças significativas ($p < 0,05$) para o pH das amostras nas temperaturas de 30 °C (5,80) e 38°C (5,47) no tempo 210 min, e para as temperaturas de 34 °C (5,43) e 38°C (5,12) no tempo 360 min. Em relação à concentração de EL, observa-se variação no pH das amostras ($p < 0,05$) para os meios suplementados com 6,15% e 13% de EL nos tempos 0 min, 30 min, 60 min e 120 min. Esses resultados indicam que a adição do EL influenciou na variação de pH inicial, devido as diferenças apresentadas no tempo 0 min. Não houve alterações no pH da amostra nos tempos 210 min e 360 min entre os meios com 0% e 13% de EL, evidenciando que a suplementação com o EL não influencia o pH do meio ao final do processo de fermentação e que meios sem suplementação podem apresentar variações de pH semelhantes aos de meios suplementados com EL.

Carra *et al.* (2015), observaram que em 24 horas de processo fermentativo com células imobilizadas em alginato de cálcio, sem suplementação, a variação de pH foi menor em tratamentos submetidos a temperatura de 43 °C, chegando a valores de aproximadamente 6,4. Esses resultados foram superiores ao determinado no presente trabalho, uma vez que em menor tempo (120 min) e menor temperatura (38 °C), o pH atingiu valores inferiores (5,47) aos encontrados por Carra *et al.* (2015), demonstrando que a suplementação do meio com EL, pode ter otimizado o processo para a obtenção de pH mais ácido, em menor tempo e temperatura, já que em meios suplementados estão presentes uma grande quantidade de nutrientes, o que é um fator de grande importância para a eficiência do processo fermentativo, uma vez que os microrganismos envolvidos requerem nutrientes diferenciados para seu crescimento e suas funções metabólicas (SILVA *et al.*, 2011).

Tabela 1. Níveis de pH encontrados para as análises realizadas com células imobilizadas de acordo com as variâncias concentração (CONC) e temperatura (TPR).

Tempo (min)	Temperatura (TPR)		
	30 °C	34 °C	38 °C
0	6,35 ^a ±0,20	6,19 ^a ±0,23	6,14 ^a ±0,36
30	6,12 ^a ±0,30	6,12 ^a ±0,23	6,00 ^a ±0,32
60	6,07 ^a ±0,30	6,03 ^a ±0,30	5,90 ^a ±0,30
120	5,95 ^a ±0,25	5,83 ^a ±0,30	5,75 ^a ±0,30
210	5,80 ^a ±0,16	5,62 ^{ab} ±0,25	5,47 ^b ±0,30
360	5,32 ^{ab} ±0,10	5,43 ^a ±0,25	5,12 ^b ±0,24

Tempo (min)	Concentração (CONC)		
	0%	6,5%	13%
0	6,53 ^a ±0,09	6,16 ^b ±0,14	6,00 ^b ±0,20
30	6,42 ^a ±0,07	6,02 ^b ±0,08	5,80 ^c ±0,12
60	6,34 ^a ±0,09	5,93 ^b ±0,08	5,73 ^c ±0,14
120	6,16 ^a ±0,16	5,82 ^b ±0,12	5,55 ^c ±0,17
210	5,81 ^a ±0,20	5,59 ^{ab} ±0,20	5,45 ^a ±0,20
360	5,35 ^a ±0,24	5,30 ^a ±0,22	5,20 ^a ±0,25

Tempo (min)	p (F)		
	TPR	CONC	TPR*CONC
0	0,0008*	0,0000*	0,0114*
30	0,0031*	0,0000*	0,1055 ^{ns}
60	0,0007*	0,0000*	0,4244 ^{ns}
120	0,0157*	0,0000*	0,7083 ^{ns}
210	0,0115*	0,0028*	0,1403 ^{ns}
360	0,0043*	0,2098 ^{ns}	0,0854 ^{ns}

NOTA: Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; *Significativo; ^{ns} não significativo.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA DE TRABALHO E CONCENTRAÇÃO DE EL

Observa-se na Tabela 2 que a acidez (mol.L⁻¹) das amostras nas três temperaturas de trabalho (30°C, 24°C e 38°C), se mantêm constante ao longo de

todo o processo fermentativo ($p > 0,05$), indicando que não houve efeito da temperatura para a produção de ácido lático e que a suplementação do meio com EL estimulou a produção de ácido em todos os tempos de trabalho ($p < 0,05$), apresentando um aumento na acidez de até 175% no tempo 360 min entre os meios suplementados com 0% e 13% de EL.

Tabela 2. Médias de acidez (mol.L^{-1}) encontradas para as análises realizadas com células imobilizadas de acordo com as variâncias CONC e TPR.

Tempo (min)	Temperatura (TPR)		
	30 °C	34 °C	38 °C
0	0,24 ^a ±0,10	0,20 ^a ±0,10	0,28 ^a ±0,14
30	0,27 ^a ±0,12	0,24 ^a ±0,15	0,32 ^a ±0,14
60	0,30 ^a ±0,10	0,27 ^a ±0,21	0,34 ^a ±0,16
120	0,35 ^a ±0,11	0,32 ^a ±0,14	0,43 ^a ±0,12
210	0,39 ^a ±0,10	0,40 ^a ±0,20	0,42 ^a ±0,19
360	0,45 ^a ±0,20	0,43 ^a ±0,15	0,49 ^a ±0,21

Tempo (min)	Concentração (CONC)		
	0%	6,5%	13%
0	0,14 ^c ±0,02	0,24 ^b ±0,04	0,35 ^a ±0,06
30	0,15 ^c ±0,01	0,28 ^b ±0,09	0,40 ^a ±0,08
60	0,17 ^c ±0,02	0,29 ^b ±0,05	0,45 ^a ±0,06
120	0,27 ^b ±0,06	0,33 ^{ab} ±0,02	0,50 ^a ±0,05
210	0,22 ^c ±0,02	0,41 ^b ±0,03	0,57 ^a ±0,01
360	0,24 ^c ±0,02	0,46 ^b ±0,04	0,66 ^a ±0,07

Tempo (min)	p (F)		
	TPR	CONC	TPR*CONC
0	0,08 ^{ns}	0,00*	0,22 ^{ns}
30	0,03*	0,00*	0,13 ^{ns}
60	0,02*	0,00*	0,08 ^{ns}
120	0,24 ^{ns}	0,01*	0,68 ^{ns}
210	0,33 ^{ns}	0,00*	0,65 ^{ns}
360	0,08 ^{ns}	0,00*	0,73 ^{ns}

NOTA: Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; DP: Desvio Padrão; *Significativo; ^{ns} não significativo.

De acordo Teixeira *et al* (2014), células imobilizadas em alginato de cálcio possuem maior efetividade com a elevação da temperatura, pois menores temperaturas aumentam a resistência à transferência de massa da esfera para o meio de fermentação, acarretando em menor difusividade de substâncias pelo suporte. Contudo, neste trabalho, observa-se que meios suplementados com EL aumentaram a produção de ácido lático em até 175%, no tempo 360 min (0,24 mol.L^{-1} e 0,66 mol.L^{-1} para 0% e 13% de suplementação com EL, respectivamente) demonstrando que mesmo em baixas temperaturas, o nível de passagem das células presentes no interior das esferas para o meio de fermentação foi eficaz para uma maior produção de ácido lático.

Resultados semelhantes aos desse trabalho foram publicados por Alves (2014). Ao avaliar a produção de ácido lático nos processos fermentativos das espécies do gênero *Lactobacillus* acompanhados por *E. faecalis*, o autor observa que tratamentos sem suplementação de EL apresentaram, no decorrer de 96 h,

aumento gradativo na produção de ácido de até 9,4% de ácido láctico, já em tratamentos realizados com adição de EL no meio de fermentação houve aumento de 220% na produção de ácido láctico. Segundo DJUKIC-VUKOVIC *et al.*, (2012), o EL satisfaz as exigências nutricionais das LAB, visto que esses microrganismos apresentam complexas exigências nutricionais para o seu desenvolvimento e dessa forma, pode influenciar no aumento de acidez em processos fermentativos.

VIABILIDADE E ESTABILIDADE DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

A viabilidade das esferas foi avaliada em soro de leite sem suplementação de extrato de levedura a temperatura de 38 °C, uma vez que em condições de temperatura entre 35 °C e 40 °C as bactérias do ácido lácteo possuem um eficiente metabolismo de carboidratos e o tempo de duplicação é bem mais rápido que outros micro-organismos (NARENDRANATH; POWER, 2004).

A concentração de ácido láctico foi crescente em todos os tempos da fermentação (Figura 1). Pode-se observar que a maior concentração de ácido láctico foi encontrada na 5ª fermentação (0,62 mol.L⁻¹) seguida da 4ª fermentação (0,46 mol.L⁻¹). Isso mostra que a passagem dos micro-organismos do interior das esferas para o meio de fermentação requer uma quantidade de tempo superior a 24 h (CARVALHO; MONTEIRO, 2011).

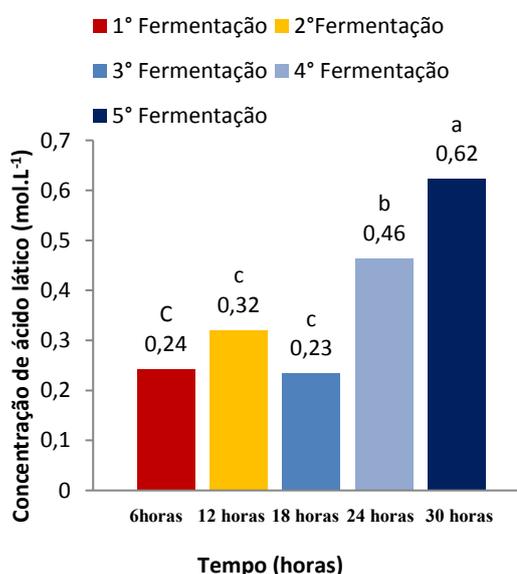


Figura 2. Acidez produzida durante reutilização das esferas de alginato de cálcio em 30 horas de fermentação para verificação da viabilidade de células imobilizadas na produção de ácido láctico.

NOTA: Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se faz o reuso de células imobilizadas para a produção de ácido láctico a taxa de saída de células tende a aumentar devido à degradação do suporte principalmente por ação quelante do próprio ácido láctico (YAN *et al.*, 2001).

Conforme observado na Figura 2, após 24 h de uso das esferas, a taxa de produção de ácido láctico tende a aumentar.

Outro fator importante é o material utilizado para a imobilização das células (CANILHA *et al.*, 2007). Nesse estudo o suporte gel de alginato de cálcio mostrou-se estável durante as 30 h de fermentação e não foi identificado perda de massa ou danos mecânicos, mostrando que o material escolhido para a imobilização das células apresenta alta resistência mecânica, permitindo a sua reutilização em repetidos ciclos de fermentação. Ariyajaroenwong *et al.* (2012), observaram comportamento similar, relatando que as células imobilizadas agem como um inóculo para a batelada seguinte na produção de etanol.

CONCLUSÃO

A temperatura não apresentou efeito significativo na produção de ácido láctico por células de bactérias lácticas imobilizadas. Já a suplementação do soro de leite com extrato de levedura foi efetiva em aumentar a taxa de produção de ácido láctico em até 175% no tempo 360 min entre os meios suplementados com 0% e 13% de EL.

Ao reutilizar as células imobilizadas para a realização de novas fermentações, após 30 h, entre o início da 1ª fermentação e a 5ª fermentação, a concentração de ácido aumentou em média 158,33%. O material utilizado para a imobilização das células se mostrou resistente para ser reutilizado, não apresentando danos mecânicos durante as 30 h do processo fermentativo.

Lactic acid production from whey by immobilized lactic bacteria on calcium alginate's spheres

ABSTRACT

This work studied the lactic acid production in the batch reactor using whey as substrate supplemented with different concentrations of *Saccharomyces cerevisiae's* yeast extract (EY) by the action of mixed culture of *Lactobacillus acidophilus* LA-5[®], *Bifidobacterium* BB-12[®] and *Streptococcus thermophiles* immobilized in calcium alginate's spheres, at different temperatures. We studied two factors, concentration of yeast extract and the temperature at levels 0%, 6.5% and 13% and 30 °C, 34 °C and 38 °C respectively. It was observed that the immobilized cells have not had the lactic acid production rate affected by increasing the fermentation temperature. On the other hand, the increase in the concentration of the EY by supplementation led to the increase of the lactic acid production. It was also evaluated the feasibility of spheres of calcium alginate when reused to inoculate new culture medium. After five re-use cycles, the spheres showed no cracks and change in mean diameter. The acid lactic concentration increased about 157% between the first and last cycle of fermentation.

KEYWORDS: fermentation; immobilized cells; yeast extract.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, A. M.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 877–902, 2013.

ALVES, M. L. F.; LEAL, R. S.; REIS, C. A.; BERNAL, O.L. M; ALVES, J. G. L. F. Influência da adição de extrato de levedura na produção de ácido láctico por bactérias lácticas em meio hidrolisado de batata. **COBEQ – XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014.

ARIYAJAROENWONG, P.; LAOPAIBOON, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, L. Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* on sweet stalks. **Energies**, v. 5, p. 1215-1228, 2012.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalizadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 335-341, 2006.

CARRA, S.; RODRIGUES, D. C.; BERALDO, N. M. C.; FOREST, P. F.; REGINATTO, C.; BASSANI, V. L.; SILVEIRA, M. M.; MALVESSI, E. Avaliação da temperatura na produção de ácido lactobiônico e sorbitol por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. **COBEQ – XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Florianópolis, 2015.

CARVALHO, G. G; MONTEIRO, R. A. B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 47-54, 2011.

CARVALHO, G. G; MONTEIRO, R. A. B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. **FAZU em Revista**, v. 8, p. 47-54, 2011.

DESCONSI, A. C.; FILHO, H. J. I.; SALAZAR, R. F. S. Avaliação físico-química e microbiológica do soro de leite concentrado obtido por osmose inversa. **Revista Ambiente e Água**, v. 9, p. 326-335, 2014.

DJUKIC-VUKOVIC, A. P.; MOJOVIC, L.; VUKAŠINOVIC-SEKULIC, M.; RAKIN, M.; NIKOLIC, S.; PEJIN, D.; BULATOVIC, L. Effect of different fermentation parameters on lactic acid production from liquid distillery stillage. **Food Chemistry**, v. 134, p.1038–1043, 2012.

GIROTO, J. M.; PAWLOSWSKY, U. O soro do leite e as alternativas para seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, p. 43-46, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químico para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 2008.

MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of *Scheffersomyces stipitis*: Effect of cell concentration and stirring. **Bioengineered**, v. 6, p. 26-32, 2015.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARAES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnol Ad**, v 28, p. 817-830, 2010.

NARENDRANATH, N.V.; POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.31, p. 581-594, 2004.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 64-71, 2012.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; KOSSEVA, M. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v.53 n.1, p. 219-226, 2010.

RAMCHANDRAN, L.; SANCILOLO, P.; VASILJEVIC, T.; BROOME, M.; POWELL L; DUKE, M. Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process. **Journal of Membrane Science**, v. 403-404, p. 179–187, 2012.

SCHEPERS, A. W.; THIBAUT, J.; LACROIX, C. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 324-337, 2006.

SILVA, D. D. V.; CÂNDIDO, E. J.; FELIPE, M. G. A. Fermentative performance of *Pichia stipitis* and *Candida guilliermondii* yeasts grown in sugarcane bagasse hemicellulosic supplemented with different nutrients. BRAZILIAN BIOENERGY SCIENCE TECHNOLOGY CONFERENCE, **Anais do 1st BBEST**, 2011.

TEIXEIRA, V. F. T.; PEREIRA, N. R.; WALDMAN, W. R.; ÁVILA, A. L. C. D.; PÉREZ, V. H.; RODRÍGUEZ, R. J. S. Ion exchange kinetics of magnetic alginate ferrogel beads produced by external gelation. **CARBOHYDRATE POLYMERS**, v. 111, p. 198-205, 2014.

VERBELEN, P.; De Schutter, D.; Delvaux, F.; Verstrepen, K.; Delvaux, F. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnol Lett**, v. 28, p.1515-1525, 2006.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

YAN, D.; WIESMANN, M.; ROHAN, M.; CHAN, V.; JEFFERSON, A. B.; GUO, L.; SAKAMOTO, D.; CAOTHIE, R. H.; FULLER, J. H.; REINHARD, C.; GARCIA, P. D.; RANDAZZO, F. M.; ESCOBEDO, J.; FANTL, W. J.; WILLIAMS, L. T. Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/beta -catenin signaling is activated in human colon tumors. **PNAS**. v. 98, p. 14973-8, 2001.

Recebido: 24 out. 2016.

Aprovado: 05 abr. 2019.

DOI: 10.3895/rebrapa.v9n2.4736

Como citar:

ARAÚJO, R. L. Produção de ácido láctico a partir de soro de leite por bactérias lácticas imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 9, n. 2, p. 136-149, abr./jun. 2018. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

Correspondência:

Renata Lázara Araújo

Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Barra do Garças, Campus Universitário do Araguaia.

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

