CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO RESÍDUO DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA

Ruthineia da Luz

Lajeado, Agosto de 2014

Ruthineia da Luz

BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO RESÍDUO DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof ª Dra Simone Dal Bosco

Lajeado, Agosto de 2014

AGRADECIMENTO

Com certeza eu jamais poderia começar por outras pessoas senão pela minha linda e maravilhosa família meus pais Jair e Marlene e a minha irmã Elen, que sempre estão ao meu lado em todos os momentos e acontecimentos da minha vida. Nas horas dos desânimos, nas horas das alegrias e nas horas das conquistas. Vocês são meus guias papai e mamãe!

Quero agradecer a você Gustavo, que hoje em minha vida faz meus dias terem brilho!

A minha querida e apoiadora orientadora professora Simone Morelo Dal Bosco pela perseverança, insistência, profissionalismo, dedicação e carinho, pois sem ela não chegaria até este momento.

A professora Claucia Fernanda Volken de Souza pela sua conduta e ética como coordenadora de curso, pela ajuda na realização deste trabalho e principalmente pelas palavras na hora difícil.

Ao meu querido amigo e colega Mariano Rodrigues que sempre esteve apertando minha mão e me incentivando para chegar até aqui.

A minha Nossa Senhora que me ilumina sempre!

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais que são minha vida.

RESUMO

O ácido lático atualmente possui inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias, têxtil, de couro, cosmética, química e farmacêutica. Devido a essa ampla aplicabilidade, a obtenção do ácido lático por processo fermentativo é um dos mais estudados, buscando-se produzí-lo através do uso de micro-organismos. Com base nestas informações, o presente trabalho teve como objetivo produzir ácido lático por via fermentatica descontínua, empregando o resíduo de isolado proteico de soja como meio de cultivo e quatro estirpes de *Lactobacillus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii e Lactobacillus agilis.* Considerando-se que vários subprodutos e matérias primas tem sido utilizados como meio de cultura viável para o desenvolvimento de micro-organismos de interesse biotecnológico neste estudo utilizou-se o resíduo do isolado proteico de soja, proveniente do processo de fabricação da proteína isolada de soja. A etapa de fermentação foi conduzida com o uso único do resíduo de isolado proteico de soja, nas condições centrifugadao e não centrifugado. Os micro-organismos foram incubados e as condições de cultivo foram desenvolvidas com pH próximo a 5,0, temperatura à 35 ºC, por processo anaeróbico e mantidas por 120 horas. Os processos fermentativos foram acompanhados através de avaliação da acidez expressa em ácido lático, a determinação contínua do pH e avaliação do aumento de biomassa. Analisando-se os resultados pode-se indicar que o processo fermentativo foi adequado para as condições onde os *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus casei* foram empregados, pelo aumento da concentração de biomassa indicando aumento da atividade celular dos micro-organismos no meio, bem como pelo aumento da acidez e descrécimo do pH em função do tempo de fermentação e carboidratos adequados presentes no meio.

Palavras Chave: *Lactobacillus,* Isolado protéico de soja, Ácido Lático.

ABSTRACT

Lactic acid currently has numerous applications in the food, textile, leather, cosmetics, chemicals and pharmaceuticals. Due to this broad applicability, getting the lactic acid by fermentation is one of the most studied in an attempt to produce it through the use of micro-organisms. Based on this information, the present study aimed to produce lactic acid by fermentatica via discontinuous, employing the residue of soy protein isolate as a means of cultivating and four strains of Lactobacillus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii and Lactobacillus agilis. Considering that several by-products and raw materials have been used as a medium for the development of viable micro-organisms of biotechnological interest in this study used the crop residue from soy protein isolate, from the manufacturing process of soy protein isolate. The fermentation step is carried out with the only use of waste soybean protein isolate, in terms centrifugadao not centrifuged. The micro-organisms were incubated and growing conditions were developed with a pH close to 5.0, temperature 35 °C, and maintained by anaerobic process for 120 hours. The fermentation processes were followed by evaluation of acidity expressed as lactic acid, continuous determination of pH and evaluation of the increase in biomass. Analyzing the results may indicate that the fermentation was suitable for the conditions in which the Lactobacillus delbrueckii and Lactobacillus casei were employed, by increasing the concentration of biomass indicating increased cellular activity of micro-organisms in the environment, as well as the increase descrécimo acidity and pH as a function of fermentation time and adequate carbohydrate in the medium.

Keywords: Lactobacillus Isolated soy protein, lactic acid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de temperatura, pH e tempo para cada cepa.....25
Tabela 2 - Composição do resíduo isolado proteico de soja.....31
Tabela 3 - Valores de pH e % de acidez do resíduo isolado proteico de soja antes e após correção do NaOH 1N.....32
Tabela 4 – Resultados dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus casei*.....33
Tabela 5 – Resultados dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus delbrueckii*.....34
Tabela 6 – Resultados dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus lactis*.....36
Tabela 7 – Resultados dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus agilis*.....37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese química do ácido lático através de hidrólise da lactonitrila.....17
Figura 2 – Isômeros espaciais do ácido lático.....19
Figura 3 – Esquema do processo de produção de proteína isolada de soja.....22
Figura 4 – Representação simplificada esquemática da via do metabolismo homofermentativo em bactérias láticas do gênero *Lactobacillus*.....25

LISTA DE ABREVIATURAS

FAO	Food and Agricultura Organization
BAL	Bactérias ácido-lácticas
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
O_2	Oxigênio
g/L	gramas/litro
mg/L	miligramas/litro
ºC	Graus celsius
CO_2	Gás carbônico
D(-)	Dextrogiro
L (+)	Levógiro
NaOH	Hidróxido de sódio
PIS	Proteína isolada de soja
HCl	Ácido clorídrico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
$CaCO_3$	Carbonato de Cálcio
v/v	volume/volume
MRS	Man Rogosa and Sharpe
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias/mililitros
DNS	ácido dinitrosalicílico
nm	nanômetros
µL	microlitros
N	Normal
RPM	Rotação por minuto
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....11
1.1 Objetivos.....14
1.1.1 Objetivo geral.....14
1.1.2 Objetivos específicos.....14
1.2 Justificativa.....14

2 REFERENCIAL TEÓRICO.....16
2.1 Ácido Lático.....16
2.2 Síntese química do ácido lático.....17
2.3 Produção de ácido lático por processo microbiano.....18
2.4 Isolado Proteico de soja.....20
2.5 Características do resíduo de isolado proteico de soja.....22
2.6 Capacidade de bioconversão de resíduos industriais por micro-organismos fermentadores *Lactobacillus*.....23
2.6.1 Capacidade de bioconversão por batelada.....26

3 METODOLOGIA.....27
3.1 *Lactobacillus* e sua manutenção.....27
3.2 Preparo do inóculo.....27
3.3 Obtenção do resíduo de isolado proteico de soja.....28
3.3 Determinação da concentração de acidez expressa em ácido lático.....29
3.5 Determinação do pH.....30
3.6 Quantificação de biomassa.....30

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....31

4.1 Caracterização físico-química do resíduo de isolado proteico de soja.....31

4.2 Resultados do planejamento experimental da fermentação pelos *Lactobacillus*.....32

5 CONCLUSÃO.....40

REFERÊNCIAS.....42

1 INTRODUÇÃO

No século XX, o inglês Albert Howard, ao desenvolver alguns trabalhos na Índia percebeu que os agricultores não utilizavam fertilizantes químicos e nem agrotóxicos no cultivo e na criação animal, e que as plantas e os animais de tração apresentavam uma incidência menor de doenças do que aqueles conduzidos com a utilização de muitos métodos convencionais no controle sanitário (ANDRADE et. al., 2009)

Cada vez mais há maior necessidade de tecnologias para a produção de energias limpas segundo Andrade et. al. (2009). Segundo Lemos (1998), a terminologia "Produção Mais Limpa" é adotada como a tradução adequada da terminologia inglesa "Cleaner Production" ou da terminologia espanhola "Produccíon Más Limpia". De maneira geral a metodologia de Produção Mais Limpa é consolidada como um importante instrumento para aumentar a competitividade, a inovação e a responsabilidade ambiental no setor produtivo brasileiro.

Neste contexto o Brasil vem explorando algumas alternativas biotecnologicas, com o propósito de obter matérias-primas a partir de resíduos industriais, como é o caso da obtenção de biocombustíveis (etanol) (MILLER et al., 2009), de ácidos como o cítrico, acético e lático (ANDRADE et al., 2009).

O ser humano vem beneficiando-se com a ação de micro-organismos, desde os tempos antigos ao serem destinados para a produção de alimentos e bebidas. Mas somente em 1957 que Pasteur demonstrou a função destes pequenos seres, nos chamados processos fermentativos (DATTA et al., 1995).

Conforme Datta et al. (1995), ao fim da II Guerra Mundial, até 1940, acreditava-se que os processos industriais que envolviam fermentações não seriam muito promissores, pois muitos dos produtos obtidos desta forma, já eram elaborados por processos químicos convencionais. Mas foi após a II Guerra Mundial, que as necessidades apareceram, com o emprego de agentes bacterianos para tratar mutilados e feridos, foi neste instante que os processos tecnológicos tradicionais auxiliaram na produção em grande escala de um produto biotecnológico, obtido exclusivamente por via fermentativa: a penicilina, antibiótico produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum.*

Desde então que importantes adventos na área de engenharia, bioquímica e microbiologia, tem permitido o aprimoramento de processos fermentativos em escala industrial com o interesse de vários produtos comerciais, como enzimas, antibióticos, solventes orgânicos, vitaminas e aminoácidos, entre outros. Hoje em dia, diversos processos fermentativos são operados em escala industrial com alta eficiência, atendendo as demandas das empresas (DATTA, et al., 1995).

Segundo Pauli e Fitzpatrick, (2002), em muitos locais, o cultivo extensivo de fontes renováveis, tais como amido de batata e tapioca, torna a sua utilização economicamente viável. O soro de queijo, que é resíduo de origem animal rico em lactose proveniente da indústria de laticínios, também pode ser um meio para obtenção de ácido lático.

A produção de ácido lático na última década, tem atraído consideravelmente a atenção do mercado. Cerca de 85% da demanda de ácido lático produzido por via fermentativa, está associada a indústria alimentícia, com vasta aplicação. Pode ser utilizado como acidulante, antioxidante, estabilizante e agente de limpeza. Atua como conservante natural nos alimentos, tais como iogurte, manteiga, vegetais em conservas, dentre outros (DATTA, et al., 1995).

Segundo Capellari (2010), os principais micro-organismos empregados industrialmente para a produção de ácido lático são as bactérias homoláticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, sendo que a espécie escolhida depende do carboidrato disponível e da temperatura a ser empregada.

Em torno de 90% de Ácido lático L(-) obtido, é elaborado por processos fermentativos das bactérias ácido-láticas (BAL). Apesar destes micro-organismos terem necessidade de

minerais, vitaminas, peptídeos específicos para garantir crescimento adequado, também utilizam substratos a base de fontes de carbono como os açúcares. As biossínteses destas fontes de carbono permitem o uso de resíduos líquidos como substratos, tais como o amido e outros polissacarídeos, presentes no milho, melaço de beterraba, cana de açúcar, batata e outras biomassas (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000). No entanto, para o crescimento numeroso de BAL é necessário o fornecimento de nutrientes específicos e em quantidades ideal. (DUMBREPATIL, et al., 2008).

Sabendo-se que as proteínas de soja são importantes nutricionalmente, o isolado de soja vem ganhando mercado. O processo é um dos mais complexos da produção de Proteínas da soja, pois visa a obtenção de um produto com uma concentração de proteína elevada, com níveis conforme legislação superiores a 90% (NIKOLOV e FUENTES-GRANADOS, 1999).

Segundo a Food and Agricultura Organization - FAO (1997), a concentração de proteína elevada proporciona flexibilidade máxima na formulação de isolado de soja, quando incorporados em produtos alimentícios. Esta tem sido uma das vantagens, pois as perspectivas de mercado para o produto são otimistas ao mesmo tempo que, o volume de produção vem aumentando, as empresas preocupam-se com os resíduos gerados por esse processo.

Segundo Nikolov e Fuentes-Granados (1999), a empresa produtora de proteína isolada de soja não tem um destino adequado para o resíduo gerado no processo rico em carboidratos, licor composto essencialmente por carboidratos. A hipótese do trabalho afirma que as empresas globais através de investimentos estratégicos, aumentam a escala das operações, montam gigantescos processos de tratamento de resíduos líquidos por não terem alternativas para o destino ideal destes subprodutos.

Visando uma alternativa possível a ser implementada, esta dissertação propõe um novo destino para este resíduo, podendo a partir dele obter outros produtos economicamente viáveis.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Obter ácido lático a partir do resíduo de isolado protésico de soja, com a utilização de micro-organismos *Lactobacillus agilis, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus lactis e Lactobacillus casei*.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Testar as quatro diferentes espécies de *Lactobacillus*, nas condições propostas para pH, temperatura e tempo de incubação*;*
- ✓ Avaliar os resultados de pH, produção de acidez em ácido lático, teor de biomassa e caracterização de cada espécie de *Lactobacillus*;
- ✓ Avaliar quais das espécies de *Lactobacillus* demonstra-se mais eficiente nas condições propostas.

1.2 Justificativa

Cerca de 82% da produção mundial de ácido lático, é usado nas indústrias alimentícias. Esse ácido apresenta propriedades umectante, emulsificador, adjuvante de sabor, agente antimicrobiano (conservante) e redutor de pH (DEMIRCI et al., 1998; EVANGELISTA e NIKOLOV, 1996).

Em 1995, Datta et al., estimavam que a produção global de ácido lático oscila em torno de 100 mil toneladas por ano, com um valor de mercado da ordem de 150 milhões de dólares.

As espécies de *Lactobacillus* tem sido de grande valia como a utilização de *Lactobacillus casei* na produção fermentativa de ácido lático do melaço-da-cana, *Lactobacillus delbrueckii* na produção de ácido lático a partir de resíduos agroindustriais, na aplicação do conceito de biorrefinaria para produzir ácido lático da vinhaça soja em escala

piloto com a utilização de espécies de *Lactobacillus*, na biossíntese de ácido lático por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais.

O interesse tecnológico deste projeto, atende à necessidade da empresa em reduzir o volume de efluente gerado com cargas de Demandas Bioquímicas de Oxigênio de 27.000 mg/L, bem como baseia-se em fatos tratados no trabalho realizado por Braile & Cavalcanti (1979), quando tratou da questão do soro proveniente da fabricação de queijos, por apresentar enorme efeito poluidor, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de 30.000 a 60.000 mg/L, também pode provocar sérios problemas ambientais, quando descartado de forma indevida em cursos d´água. Além disto, diminuindo custos empregados atualmente no sistema de tratamento destes resíduos líquidos gerados pela planta de isolado protésico de soja e assim preservando o meio ambiente. Outro ganho será o de poder destinar este resíduo para uma planta produtora de um novo produto, o ácido lático.

A proposta em produzi-lo, tem proporcionado a empresa, a possibilidade da obtenção de uma matéria-prima própria, utilizada no emprego de produtos como os reguladores de acidez (BREMIL, 2012).

Segundo Choudhury et al., (1998), o ácido lático pode ser obtido através de processos de síntese química ou bioconversão através da fermentação lática, sendo esta última a mais vantajosa por ser mais econômica.

Dentro deste contexto, foi proposto a produção de ácido lático com a utilização de micro-organismos fermentadores como *Lactobacillus agilis, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus lactis e Lactobacillus casei*, por processo descontínuo. O interesse deste trabalho vai de encontro ao estudo sobre produção fermentativa de ácido lático a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*, desenvolvido por Oliveira et al., (2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido Lático

O ácido lático é um produto atualmente no mercado, com múltiplas funções nas indústrias alimentícias, têxtil, de couro, cosmética, química e farmacêutica. É um potente ácido orgânico, denominado quimicamente como ácido 2-hidroxipropiônico ou ácido α-hidroxipropiônico, comercialmente importante desde 1881, pois além de ser utilizado nas indústrias alimentícias, na indústria química é empregado como matéria-prima para a produção de plásticos biodegradáveis (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000).

O ácido lático, um ácido carboxílico, foi descoberto em 1780, a partir do isolado do soro de leite azedo, originando o nome lático do latim *"lac"* = leite. Foi também associado a uma fadiga muscular, por estar presente e aumentado durante a realização de exercícios de alta intensidade ou exercícios anaeróbios, em condições hipóxia ou isquemia (ANDRADE, 2009).

Até o início da década de 90, a produção de ácido lático era considerada uma tecnologia madura, com a produção anual de 40 mil toneladas por processo químico e ou fermentativo, onde o ácido L(+) lático era obtido por fermentação e empregado pelas indústrias como acidulante em alimentos processados. Por outro lado, o ácido lático produzido em escala química, devido ao seu grau de pureza, era utilizado principalmente para a produção de derivados (DATTA, et al., 1995).

O processo de obtenção do ácido lático por síntese química, foi largamente substituído pelo processo fermentativo, baseado no cultivo anaeróbio de *Lactobacillus*. Segundo Hofvendahl e Hagerdal, (2000), atualmente 90% da produção de ácido lático é obtido por vias fermentativas e o restante por hidrólise de lactonitrila.

2.2 Síntese química do ácido lático

Utilizando-se a hidrólise da lactonitrila obtém-se ácido lático por síntese química, conforme processo ilustrado na Figura 1. O ácido lático por síntese química, é um derivado petroquímico proveniente de ácidos fortes, que apenas prevê a mistura racêmica de D(-) e L(+) ácido lático (DATTA, et al., 1995).

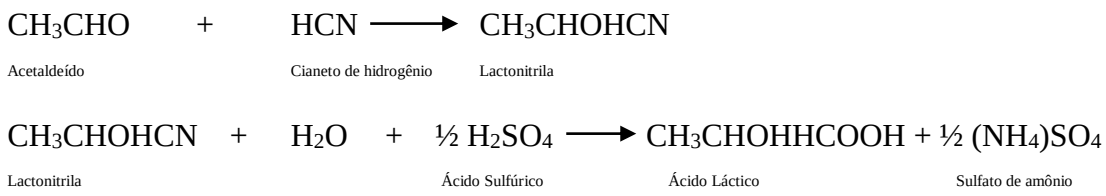

Figura 1: Síntese química do ácido lático através de hidrólise da lactonitrila (Leite, 2006).

Segundo relatos de Datta, et al., (1995), há possibilidade de obter-se ácido lático por outras rotas químicas:

- Pela oxidação de propilenoglicol, reação de acetaldeído, monóxido de carbono e água em temperaturas e pressões elevadas;

- Pela hidrólise de ácido 2-cloro-propiônico, ácido acético, ácido nítrico;

- Pela oxidação de propileno, mas nenhuma delas são consideráveis economicamente viável, sendo mais caros que os fermentativos.

2.3 Produção de ácido lático por processo microbiano

Os biocatalisadores preferidos para a produção de ácido lático são as bactérias láticas, compostas pelas gram-positivas anaeróbias facultativas: *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Aerococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissela e Carnobacterium* (LIU, 2003). A temperatura ótima de crescimento varia entre 20 e 45ºC, apresentam capacidade limitante de biossíntese, por isso requer a adição de aminoácidos e vitaminas do complexo B ao meio de crescimento (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000).

São incapazes de sintetizar ATP (Trifosfato de adenosina), por meio de respiração, a bactéria lática obtém energia através da fosforilação ao nível do substrato (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). A fermentação pode ser homolática, com a produção de ácido lático, ou, heterolática, com a produção de CO_2, etanol e/ou acetato obtidos como subprodutos do metabolismo, ao lado de ácido lático, com a produção de CO_2, etanol e/ou acetato, obtidos como subprodutos do metabolismo, ou de ácidos mistos, com a produção de CO_2, etanol e/ou acetato e formato, obtidos como subprodutos do metabolismo, tudo isso depende das vias metabólicas (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000).

O pH mantido entre 5,5 a 6,0 garante uma ótima produção de ácido lático, mesmo assim o controle do pH pela adição de álcalis (carbonato de cálcio, hidróxido de amônio) ao meio é normalmente empregado (KASCAK et al. 1996).

Salienta-se que geralmente, o processo pode ocorrer em duas etapas: a sacarificação, seguida pela fermentação por *Lactobacillus.* Em escala industrial, os *Lactobacillus* são os micro-organismos preferidos, pois possuem maiores taxas de metabolismo e rendimento melhor do que *Rhisopus orysae* que possuem igual capacidade de sacarificação e fermentação (ANURADHA, 2009).

As formas do ácido lático D(-) Dextrogiro e L (+) Levógiro, ilustradas na Figura 2, são obtidas durante a fermentação e variam de acordo com o gênero do micro-organismo. O ácido lático L(+), é produzido por *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Tetragenococcus, Streptococcus, Vagococcus*, já o Ácido D (-) Lático é obtido por *Leoconococcus e Oenococcus.* Micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus, Pediococcus, e*

Weissella produzem ambas as formas isoméricas, isolada ou conjuntamente, dependendo da espécie e das condições de cultivo (LIU, 2003).

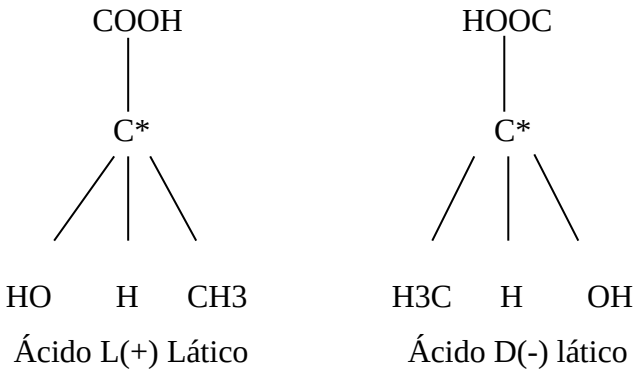

Figura 2: Isômeros espaciais do ácido lático *(*Lee et al., 1998).

Dependendo da espécie considerada, o pH do meio de fermentação pode afetar o padrão de fermentação exibido pelas bactérias láticas. Por exemplo: *Lactobacillus bulgaricus* é homofermentativo em pH ácido, porém se torna heterofermentativo em pH alcalino. O micro-organismo escolhido para a produção do ácido lático depende do substrato utilizado para o preparo do meio de fermentação. Por exemplo:

- *Lactobacillus delbrueckii* é o catalisador preferido quando glicose ou sacarose são utilizadas como substrato (KASCAK, et al.,1996), bem como quando há lactose, frutose, e maltose (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000).

- *Lactobacillus agilis* é o catalisador preferido quando há rafinose e estaquiose (KARP, 2010).

- *Lactobacillus lactis* é o catalisador preferido quando há maltose, glicose e galactose (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000).

- *Lactobacillus casei sp. casei* é o catalisador preferido quando há glicose, lactose e galactose (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000).

Segundo Andrade (2009), o uso de resíduos agroindustriais (soro de queijo, melaços, amidos e materiais lignocelulósicos) para o preparo do meio fermentativo é preferido pelas indústrias devido ao baixo valor de mercado do ácido lático.

Embora os resíduos agroindustriais sejam ricos em hidratos de carbono, sua utilização é limitada devido ao baixo conteúdo de proteína e a pobre digestibilidade, decorrente da presença de resíduos celulósicos (JOHN et al., 2007). Alguns resíduos agrícolas que são substratos potenciais para produção de ácido láctico são lignocelulose/hemicelulose hidrolisada (KAREL et al., 1997), casca de algodão, espiga e caules de milho (VICKROY, 1985), beterraba, melaço (GOKSUNGUR, 1999), bagaço de cana de açúcar (XAVIER e LONSANE, 1994), melaço gasto em lavagem (SHARM et al., 2003).

2.4 Isolado Protéico de soja

Segundo a Associação Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (1978), a proteína isolada de soja (PIS) é a fração proteica da soja obtida por processo tecnológico adequado. A proteína isolada de soja é utilizada como agente de consistência para produtos derivados de carnes, tais como embutidos e patês, e como fonte proteica.

O processo de produção de PIS segundo Cassini (2008), utiliza como matéria-prima essencial o farelo desengordurado de soja com 50% de proteína. A primeira etapa deste processo consiste em uma mistura entre o farelo de soja e a água (solvente), mantida sob agitação, para a dispersão das proteínas solúveis existentes no farelo e separação das fibras (compostos insolúveis). Os carboidratos são solubilizados juntamente com as proteínas, sendo separados na etapa de precipitação ácida. A extração requer algumas particularidades em relação a pH, à temperatura, a granulometria do farelo, ao tipo de processo contínuo e ou batelada e à razão sólido/água (fórmula), podendo ter variações nas frações extraídas. Após o término da etapa de extração, as proteínas dispersáveis e os carboidratos encontram-se dissolvidos na água, enquanto que a fração insolúvel (fibra, proteínas desnaturadas, óleo) formam sólidos em suspensão, podendo ser removidos por centrifugação.

Cassini (2008) relata que no processamento da proteína isolada de soja utilizam-se várias centrifugações, e são gerados resíduos composto principalmente pelos açúcares

solúveis e matéria mineral. Para separar os açúcares da fração proteica, utiliza-se a propriedade das proteínas de aglomerar, ou seja precipitar, quando o pH do meio neutraliza as cargas das proteínas que as mantém dispersas. Neste caso considera-se o ponto isoelétrico das proteínas, quando o pH do meio atinge um valor em torno de 4,5. Os carboidratos permanecem solúveis, permanecendo na fase líquida na etapa de centrifugação. Após a precipitação das proteínas com o ajuste do pH da solução com ácido clorídrico, parte dos carboidratos ainda permanecem misturados com elas. Com o objetivo de separar o máximo de proteína, realizam-se novas lavagens da fração sólida da centrifugação ácida com água potável, solubilizando-se os carboidratos. Após mais uma centrifugação, separam-se as frações sólido e líquido. Em seguida a fração sólida é conduzida a etapa de neutralização, com adição de aditivos, e secagem às temperaturas de 150ºC, tornando-se pó. Já a fração líquida, composta por açúcares e proteína de baixo peso molecular, constituiu o principal resíduo gerado durante este processo, e atualmente é conduzido, a sistemas de tratamento de efluente das empresas, processo similar que é desenvolvido com o mesmo propósito por esta empresa de proteína isolada de soja, conforme Figura 3, mas como algumas etapas diferenciadas.

O processo de fabricação, inicia com a utilização da farinha desengordurada de soja que sofre um processo de extração química com a adição de uma solução básica de hidróxido de sódio (NaOH) e mecânica pela utilização de uma força centrífuga, que tem por finalidade remover a fibra da massa proteica. Esta massa proteica sem a fibra passa por novo processo de extração química com a adição de uma solução ácida de ácido clorídrico (HCl) à 10% e nova ação mecânica por centrifugação, com a função de remover então os carboidratos presentes na massa. É nesta etapa que gera-se o resíduo de isolada proteico de soja, com alta carga de carboidratos, que é encaminhado para o Sistema de Tratamento de Efluentes. Já a massa contendo isolado proteico de soja segue para a etapa seguinte onde é neutralizada com nova solução de hidróxido de sódio (NaOH) até pH próximo a 7,0. Esta massa permanece em tanque de inox até ser pasteurizada a uma temperatura aproximada de 82ºC por um tempo de retardo de 15 segundos e em seguida é conduzida a um processo de secagem a temperatura de 150ºC em atomizador por processo denominado *spray dryer*. Por fim é envasado em embalagem plástica e destinada ao armazém de estocagem (BREMIL, 2012).

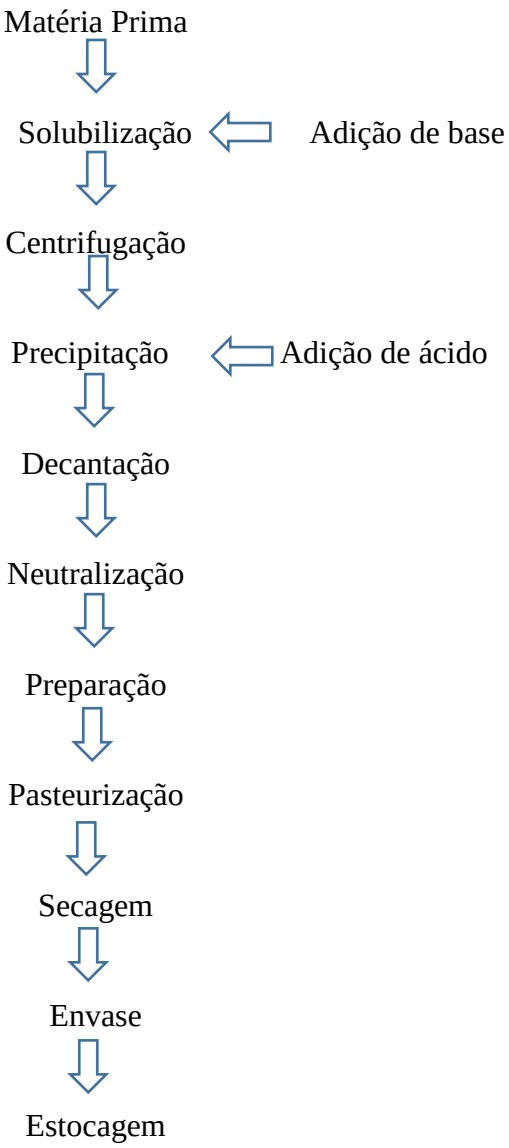

Figura 3: Esquema do processo de produção de proteína isolada de soja (Fonte: Bremil, 2012).

2.5 Características do resíduo de isolado protésico de soja

A composição dos efluentes gerados em produção de isolados proteicos a base de soja, é basicamente proveniente de proteínas e carboidratos solúveis em solução aquosa, proporcionando valores de Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 27.000 mg/L, gerando para as empresas demandas de sistemas de tratamento qualificados para obtenção de efluentes tratados dentro dos parâmetros exigidos pela legislação local (CASSINI, 2008).

Segundo a FAO (1997), este resíduo gerado no processo, é também chamado de soro de soja, que é o líquido resultante depois da proteína ser precipitada a partir do extrato. Ele contém os açúcares e as substâncias nitrogenadas não precipitados por acidificação. Estima-se que 25% da matéria seca da matéria-prima e 10% de seu teor de nitrogênio é encontrada nesta fração. Relatos indicam que este "soro isolado de soja" pode ser tóxico para os animais, em decorrência da alta atividade ureática, por isso não se destina para esta área.

2.6 Capacidades de bioconversão de resíduos industriais por micro-organismos fermentadores *Lactobacillus*

As bactérias do grupo dos *Lactobacillus* são consideradas bactérias láticas, gram-positivas, não esporogênicas, catalase negativa, citocromo ausentes, sendo está o maior gênero, compreendendo cerca de 80 espécies reconhecidas (CAPELLARI, 2010).

Os *Lactobacillus* são estritamente fermentativos, aerotolerantes ou anaeróbicos, acidófilos e com algumas exigências nutricionais como carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais, vitaminas e derivados de ácidos nucléicos (CAPELLARI, 2010).

Lactobacillus delbrueckii são bastonetes isolado e ou em pequenas cadeias, gram-positivo não esporulado, raramente com motilidade. Anaeróbio facultativo, catalase negativa (HOFVENDAHL e HAGERDAL, 2000; KASCAK, et al.,1996).

Lactobacillus lactis são bastonetes em cadeias, gram positivo não esporulado, sem motilidade. Aeróbios e ou anaeróbio facultativo, catalase negativa (COSTA, 2006). Já os *Lactobacillus casei* são bastonetes, gram-positivos, não-esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos (ITF, 2008). Os *Lactobacillus agilis* são bactérias gram positiva, anaeróbio facultativo, que se apresenta na forma de bastonetes em cadeia ou não. É também catalase negativo (YAMAGUISHI, 2008).

É normal incubar-se bactérias láticas em condições semi-anaeróbicas, com a presença de gás carbônico, e que o fator limitante no seu desenvolvimento é mais devido à tensão elevada de gás carbônico do que ao teor de acidez ou abaixamento de tensão de oxigênio (COSTA, 2006).

De um modo geral as fermentações que possuem como produto majoritário resultante o ácido lático, são conduzidas por *Lactobacillus* do tipo homofermentativo, conforme Figura 4 (COSTA, 2006).

O valor adequado para a fermentação do meio para ação dos *lactobacillus* é ideal entre 5,0 a 5,5, onde se encontra o pH dos mostos industriais. Fermentações ocorridas em meios mais ácidos pode resultar na formação de etanol (ANTONIO, 2010).

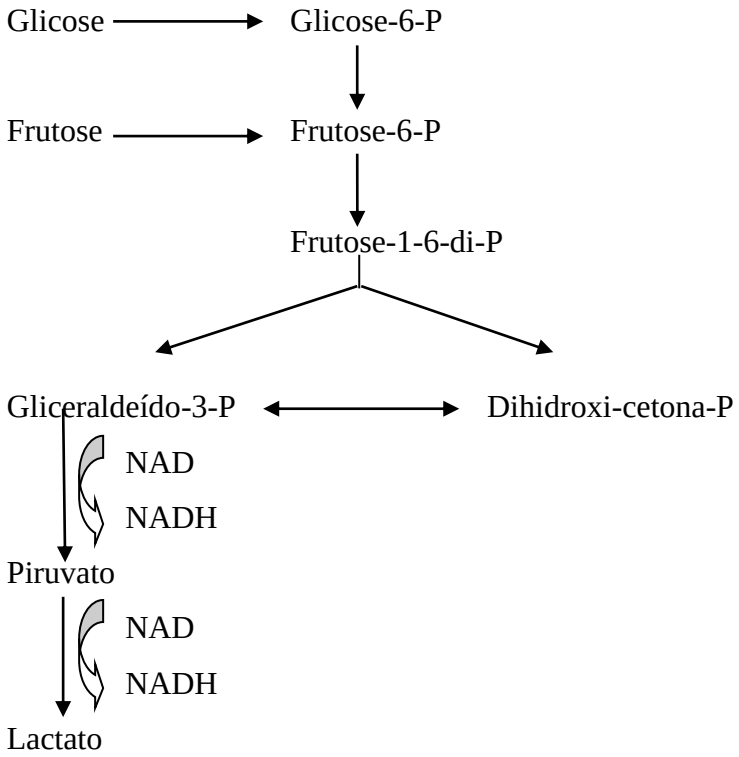

Figura 4: Representação simplificada esquemática da via do metabolismo homofermentativo em bactérias láticas do gênero *Lactobacillus* (Costa, 2006).

Conforme a Tabela 1, as faixas de temperatura relatadas por Hofvendahl e Hagerdal, (2000), variam entre 30 a 45ºC e são específicas para cada micro-organismo. Já para a condição de pH conforme Hofvendahl e Hagerdal, (2000), informa que as cepas variam seu

pH entre 4,0 a 6,0. Segundo John et al. (2005), o melhor tempo que se teve em estudos realizados foi por 5 dias, tempo este que será utilizado para o estudo.

Tabela 1: Condições de temperatura, pH e tempo para cada cepa

Micro-organismo	**Temperatura**	**pH**	**Tempo de incubação**
Lactobacillus delbrueckii	37 a 45ºC	4,2 a 6,2	5 dias
Lactobacillus casei	30 a 37ºC	±5,5	5 dias
Lactobacillus agilis	30 a 32ºC	±5,0	5 dias
Lactobacillus lactis	30 a 37ºC	4,0 a 6,0	5 dias

Fonte: Hofvendahl e Hagerdal, (2000), Karp (2010), John et al. *(2005)*

As condições de pH, temperatura e tempo foram definidas com base nas literaturas Hofvendahl e Hagerdal, (2000), Karp (2010)) e John et al. (2005). Yamaguishi (2008), relata em seus estudos que ao inocular 10% (v/v) de um cultivo de *L. agilis*, crescido em caldo MRS obteve desenvolvimento microbiano de aproximadamente 10^8 UFC/mL, cultivado a 37 ^oC por 12 h.

Honorato et al. (2007), obtiveram a produção de ácido lático e dextrana através da utilização de excedentes agrícolas contendo suco de caju e sacarose, por ação do micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides B512F*, que utiliza como substrato os altos teores de glicose e frutose. Neste estudo foi possível verificar que com a elevação da concentração de açúcares presente, favoreceu a produção da dextrana formada pela polimerização da glicose proveniente da quebra da sacarose realizada pela enzima dextrana-sacarose obtida pela fermentação do *Leuconostoc mesenteorides B512F*. Além da produção da dextrana pelo *L. mesenteorides B512F*, produziu ácido lático, um dos principais acidulantes utilizados nas indústrias de alimentos.

Através da utilização do *Lactobacillus casei,* Silva et al. (2010) obteve ácido lático por fermentação descontínua utilizando melaço de cana-de-açúcar, farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca, suplementadas com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona. Este micro-organismo tem como metabólito principal a nomenclatura do ácido L(+) lático. (AZEVEDO, 2009).

Narayanan, et al. (2004),enfatizam que o *Lactobacillus rhamnosus* pode ser utilizado para produção de ácido lático L (+) na sua forma mais pura, sem residuais do processo. A cinética de fermentação de lote da estirpe selvagem deste micro-organismo foi estudada a 40ºC e pH 6,2 sob a concentração de glicose e condições de anaerobiose.

2.6.1 Capacidade de bioconversão por batelada

A fermentação por batelada é também conhecida por fermentação descontínua, que tem como característica principal o micro-organismo ser inoculado imediatamente ao meio a ser incubado, de modo a permitir que o processo de fermentação ocorra sob condições ótimas, sendo que durante esse tempo de processo nada poderá ser adicionado (MALTA, 2006).

Segundo Win et al. (1995), os cultivos descontínuos podem ser considerados como um sistema fechado, exceto pela utilização de aeração ou não, bem como todos os substratos são fornecidos no início da fermentação, enquanto que os demais processos o substrato é adicionado ao longo do cultivo. Há desvantagens neste processo, no sentido em que quando utilizada para a produção de bioprodutos associados ao crescimento celular, é que a formação eficiente do produto requerido ocorre somente em uma parte do ciclo de fermentação, o que promove uma produtividade menor do que a obtida por processos que consigam prolongar este período. Esse problema pode ser minimizado com a utilização do processo descontínuo-alimentado, onde os nutrientes essenciais podem ser alimentados conforme a necessidade dos micro-organismos durante o cultivo.

3 METODOLOGIA

3.1 *Lactobacillus* e sua manutenção

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram estirpes de *Lactobacillus agilis* CCT 1659, Lote 15/8/B, *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744, referência ATCC9649, Lote T03/8/D, *Lactobacillus lactis:* CCT 1344, referência ATCC8000, Lote T3/10/E *Lactobacillus casei* CCT 1465 referência ATCC393, Lote T01/1/I, provenientes da Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brasil.

Para a manutenção das cepas empregou-se os cultivos em caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe) completo, contendo peptona (10,0 g/L), extrato de levedura (4,0 g/L), extrato de carne (8,0 g/L), glicose (20,0 g/L), monooleato de sorbitan (1,0 mL/L), fosfato de potássio (2,0 g/L), acetato de sódio (2,0 g/L), citrato triamonical (2,0 g/L), sulfato de magnésio (0,20 g/L) e sulfato de manganês (0,05 g/L). As culturas foram repicadas para o caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe), a cada 4 semanas e incubadas durante 24 h a 35°C

3.2 Preparo do inóculo

Para a reativação das cepas de *Lactobacillus casei, Lactobacillus agilis, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus lactis,* o procedimento foi realizado em oito tubos contendo em cada um 8mL de caldo MRS estéril. Os tubos foram incubados a 35 ºC por 24 h sem agitação, em estufa de incubação, proporcionando uma condição ideal para o desenvolvimento dos micro-organismos.

Decorridas às 24 h de incubação dos tubos contendo os *Lactobacillus agilis, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus lactis e Lactobacillus casei* em duplicada, foram transferidos para quatro erlenmeyers contendo resíduo de isolado proteico de soja, a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura.

O pH inicial dos meios, inicialmente foram ajustados para o mais próximo de 5,0 e em seguida os mesmos foram esterilizados a uma temperatura de 121ºC durante 15 minutos. O volume do meio de cultura trabalhado, foi de 80 mL já estéril e *centrifugado* em centrífuga a 3500rpm por 42 minutos, o volume de cada inóculo foi de 8 mL correspondendo a uma concentração celular de 1,58 g/L (esta concentração foi a mesma para todos os procedimentos). A mesma tratativa foi realizada para os outros quatro erlenmeyer, contendo 80 mL de resíduo de isolado proteico de soja já estéril mas *não centrifugado.*

Após esse procedimento, os erlenmeyers contendo os inóculos de *Lactobacillus* e meio de cultura, foram incubados em estufa bacteriológica à 35 ºC e o pH do meio durante a fermentação foi controlado a 5,0 por adição de Hidróxido de sódio 1 N. Já nas últimas 24 h não se fez o ajuste do pH somente a leitura final deste. Esse processo de fermentação em escala laboratorial pode ser classificado como fermentação descontínua ou em batelada. Todo o processo experimental foi realizado por cinco vezes em períodos diferenciados de novembro de 2012, há outubro de 2013.

3.3 Obtenção do resíduo de isolado proteico de soja

O resíduo de isolado proteico de soja utilizado foi obtido junto a uma empresa de proteínas vegetais da região do Vale do Taquari. Este resíduo é considerado pela empresa o efluente líquido destinado para o sistema de tratamento de efluentes.

Foram coletados dois litros de amostra de resíduo de isolada proteico de soja e encaminhado para análise em laboratório externo, no Laboratório Eurofins Alac – Garibaldi, sendo a mesma processada para quantificar os carboidratos presentes utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O resíduo de isolado proteico de soja *in natura* é altamente perecível e foi estocado em geladeira a temperatura de 3 ºC para evitar deterioração, uma vez que não foram utilizados aditivos para conservá-lo.

A finalidade da etapa de centrifugação do meio de fermentação, é verificar se na condição proposta, há maior ou menor desenvolvimento microbiano. As condições de tempo, pH e temperatura de incubação dos *Lactobacillus* para a produção de ácido lática, foram definidas com base na literatura de Hofvendahl e Hagerdal (2000).

3.4 Determinações da concentração de acidez total expressa em ácido lático

As amostras sem adição dos micro-organismos, foram analisadas inicialmente, e somente após o tempo de 120 horas, foi novamente determinado o teor de acidez presente no resíduo de isolado proteico de soja. As análises foram realizadas com 10 g da amostra e a acidez quantificada através de titulação com hidróxido de sódio 0,1 N. A coloração rósea é a característica da "virada" do indicador fenolftaleína 2% m/v. Determinou-se a % de acidez expressos em ácido lático:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V_{Na} \times F \times 0{,}9}{P}$$

Onde:

V_{Na} = Volume em nº de mL de solução NaOH 0,1 N gasto na titulação da amostra

F = Fator da solução NaOH 0,1 N

P = massa em gramas da amostra

3.5 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido no tempo zero, logo ao serem incubadas em estufa e monitoradas durante as 72 horas, e medido por fim após, as 120 horas de incubação.

O pH foi determinado por potenciometria direta, utilizando determinador de pH da marca Digimed modelo DM22, acoplado a potenciometro CVII e termocompensador.

3.6 Quantificação de biomassa

A quantificação de biomassa, foi realizada somente após o tempo total de incubação, ou seja após as 120h. O procedimento foi realizado colocando para os tubos Falcon na estufa sem tampa a 60 ºC por 48h, em seguida foi pesado com luvas, em balança analítica (tubos Falcon limpos e secos sem tampa). Pipetou-se 10 mL do meio de cultura em estudo nos tubos Falcon, foram centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante e colocou-se nos tubos de ensaio. Realizou-se três lavagens do precipitado (parte sólida que ficou no fundo do tubo após centrifugação) da seguinte forma: foi adicionado 10 mL de água deionizada gelada em cada amostra, centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos, descartada a água e repetido mais duas vezes. Após as lavagens colocou-se os tubos com a biomassa na estufa com temperatura de 60 ºC por pelo menos 24 h.

Após o tempo estabelecido, retirou-se os tubos da estufa e transferiu-se para dessecador até a temperatura ambiente. Pesou-se em balança analítica (com luvas) os tubos Falcon com a biomassa e anotou-se os valores. O teor de biomassa foi obtido pela diferença entre a pesagem final e a inicial:

Massa de biomassa (g/L) = massa final (g) – massa (g) inicial

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do resíduo de isolado proteico de soja

Na Tabela 2 são apresentados os resultados analíticos da amostra de resíduos de isolado proteico de soja, referentes a determinação da composição de carboidratos, através de análise realizada no Laboratório Eurofins – Alac, de uma única amostra coletada na empresa que produz a proteína isolada de soja.

Tabela 2 - Composição do resíduo isolado proteico de soja

Carboidratos	**%**
Glicose	1,54
Rafinose	6,36
Frutose	1,86
Estaquiose	19,34
Lactose	1,23
Sacarose	21,87

Fonte: Laboratório Eurofins - Alac, 2012

Conforme a Tabela 2, verifica-se que o resíduo de isolado proteico de soja apresenta diversos carboidratos em sua composição, representando 52,2% de carboidratos totais expressos em base seca, dos quais destacam-se a estaquiose e a sacarose. Resultados semelhantes aos obtidos por Fernandes et al. (2011), que obteve do melaço de soja, 2% de glicose, 2% de frutose, 19,25% de sacarose, 5,75% de rafinose e 21% de estaquiose.

O valor médio de pH de todas as amostras de resíduo de isolado proteico de soja *in natura*, foi de inicialmente 3,60 logo após coleta na indústria. Já após ajustes com a solução de NaOH, o valor médio de todos ensaios, o pH inicial foi de aproximadamente 4,99, conforme Tabela 3. Este valor ficou abaixo do utilizado por Oliveira (2009), que trabalhou com valores de pH em torno de 6,20 para melaço de cana-de-açúcar hidrolisado e fermentado.

Estes dados analíticos foram obtidos medindo o pH e acidez inicial de cada ensaio, e em seguida elevou-se o pH para o mais próximo de 5,00 com adição de NaOH 1N, medindo-se novamente a acidez, para então receber os inóculos.

Tabela 3 - Valores de pH e % de acidez do resíduo isolado proteico de soja antes e após correção com NaOH 1N

Ensaio	**pH inicial sem correção**	**pH inicial corrigido**	**% Acidez em ácido lático inicial sem correção de pH**	**% Acidez em ácido lático inicial com correção de pH**
1	3,98	4,98	1,90	1,52
2	3,66	4,99	3,15	2,33
3	3,55	5,01	2,78	2,01
4	3,58	4,98	3,46	2,57
5	3,25	4,97	3,53	2,24
Média	**3,60**	**4,99**	**2,96**	**2,13**

Fonte: Do Autor 2012/2013

Os valores de pH se mostraram coerentes, já que houve produção de ácido lático em todos os meios.

4.2 Resultados do planejamento experimental da fermentação pelos *Lactobacillus*

Na Tabela 4, apresentam-se os resultados obtidos para a avaliação de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático, com a utilização de *Lactobacillus casei*, formados no final da fermentação de acordo com o experimento executado.

Tabela 4 – Resultados dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus casei*.

	Centrifugado			**Não centrifugado**		
Ensaio	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**
1	4,27	8,29	206	4,25	9,46	205
2	4,19	8,74	240	4,12	9,13	263
3	4,19	8,05	235	4,05	8,47	239
4	4,16	9,02	205	4,15	8,71	212
5	4,12	7,48	219	4,10	7,56	222
Média	**4,19**	**8,32**	**221**	**4,13**	**8,67**	**228**

Fonte: Do Autor, 2012/2013

Para a condição utilizando o *L. casei*, os resultados das cinco amostragens, permaneceram em média 8,32% de acidez expresso em ácido lático para a condição centrifugado e em média 8,67% de acidez expresso em ácido lático na condição não-centrifugado. A quantidade de biomassa produzida pelo *L. casei,* foi em média de 221 g/L nas amostras centrifugadas e em média de 228 g/L nas amostras do não-centrifugado.

Portanto salienta-se que a maior concentração de ácido lático e biomassa do resíduo de isolado proteico de soja em ambos sistemas, obtida neste trabalho foi realmente com a utilização da espécie de *Lactobacillus casei*, conforme expresso na Tabela 4, nas condições propostas de temperatura a 35 ºC e pH variando na média de 4,19 e 4,13.

Desta forma esse trabalho reforça os estudos realizados por Hujanen e Linko (1996), em estudos realizados através da avaliação da influência da temperatura para a produção de ácido lático pelo *L. casei* encontraram a temperatura de 37 ºC como ótima para o crescimento e produção de ácido lático. Também em estudos realizados por Dermici et al. (1993), relataram que a temperatura de 37 ºC foi a melhor temperatura para o *L. casei*.

Importante ressaltar que as variáveis de pH e temperatura, foram importantes para a produção de acidez expressa em ácido lático e biomassa pelo *L. casei*. Estes resultados reforçam a evidência experimental que as condições propostas de temperatura e pH favoreceram crescimento microbiano de *Lactobacillus casei.* Em estudos realizados por Oliveira (2009), nos ensaios realizados com *L. casei,* somente em dois ensaios os resultados foram satisfatórios com um rendimento de biomassa e ácido lático na faixa de 87%, quando trabalhou com temperatura de 37 ºC e pH 6,5.

Hujanen e Linko (1996), utilizaram condições de cultivos idênticas quanto ao pH e temperatura, mas incorporou uma fonte de nitrogênio ao meio com a utilização de *L. casei,* e foi constatado que a temperatura ótima para a produção de ácido lático foi de 35 ºC e pH ótimo de 6,3.

Em condições semelhantes, pode-se observar na Tabela 5, que a espécie de *Lactobacillus delbrueckii*, desempenhou seu papel idêntico ao trabalho desenvolvido pelo *Lactobacillus casei.*

Tabela 5 – Resultados dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus delbrueckii.*

	Centrifugado			**Não centrifugado**		
Ensaio	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**
1	5,70	7,52	198	5,52	7,78	197
2	5,09	7,61	199	6,06	7,83	199
3	5,66	7,73	200	6,66	7,76	199
4	5,10	6.93	197	6,71	7,03	208
5	5,12	6,06	192	6,18	6,14	199
Média	**5,33**	**7,17**	**197**	**6,23**	**7,31**	**200**

Fonte: Do Autor, 2012/2013

Os resultados médios das cinco amostragens, permaneceram em 7,17% de acidez expresso em ácido lático para a condição centrifugado e 7,31% de acidez expresso em ácido lático na condição não-centrifugado. Já as quantidades de biomassa apresentaram-se em 197 g/L nas amostras centrifugadas e 200 g/L nas amostras do não-centrifugado. Ou seja a homofermentatividade do enantiômetro L(+) produzida por fermentação pelo *L. delbrueckii* para a produção de ácido lático é eficiente e foram satisfatórias. Essa eficiência comprova-se pois no resíduo de isolado proteico de soja, a sacarose está em maior concentração, isso facilita o desenvolvimento de *delbrueckii,* já que ele é catalisador preferido quando glicose ou sacarose são utilizadas como substrato segundo informações de Kascak et al. (1996).

John et al. (2005), verificou que o *Lactobacillus delbrueckii* converte eficientemente 1 mol de glicose em 2 mol de ácido lático, ou seja dobra a concentração do meio, ao trabalhar com bagaço de cana de açúcar para obter ácido lático.

Evidencia-se que o *L. delbruecki* pode desenvolver-se em diferentes meios, sob informações de Lopes (2008), que afirma que basta ter condições ideais para seu eficaz desenvolvimento, e evidenciou o crescimento do *L. delbrueckii* mesmo com uma baixa concentração de extrato de tomate, e consegue produzir quantidade significativa de ácido lático. Hofvendahl e Hagerdal (2000), salienta que o *Lactobacillus delbrueckii* é muito eficiente na obtenção de ácido lático a partir da utilização da matéria-prima soro de queijo, onde encontram-se proteínas, sais e lactose, por vezes necessitando a complementação com extrato de leveduras, peptonas, leite em pó, farinha de soja ou licor extraído do milho. Este micro-organismo também possui grande potencial na aplicação de processos de obtenção de ácido lático, utilizando melaço, um subproduto dos processos de produção de açúcar.

Na Tabela 6, apresentam-se os resultados obtidos para a avaliação de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático, com a utilização de *Lactobacillus lactis,* formados no final da fermentação de acordo com o experimento executado.

Tabela 6 – Resultados dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus lactis.*

	Centrifugado			**Não centrifugado**		
Ensaio	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**
1	5,27	6,42	123	5,25	6,45	149
2	5,19	6,37	121	5,12	6,45	128
3	5,19	6,51	201	5,05	6,55	158
4	5,16	6,44	146	5,15	6,32	149
5	4,05	6,50	126	5,08	6,55	128
Média	**4,97**	**6,45**	**143**	**5,13**	**6,46**	**142**

Fonte: Do Autor, 2012/2013

Analisando os resultados obtidos na tabela 6, com a utilização do *Lactobacillus lactis*, observa-se que o meio fermentativo não apresentou uma produção expressiva de biomassa em relação aos outros micro-organismos, bem como para a porcentagem de acidez expressa em ácido lático em ambos sistemas (centrifugado e não centrifugado).

Verificou-se que o *Lactobacillus lactis* não foi eficiente na biotransformação dos açúcares presentes no meio para produzir índices de acidez maiores em relação aos *Lactobacillus delbrueckii e casei*, índices estes já verificados por Oliveira (2009), que verificou a necessidade de suplementar o meio com peptona, extrato de levedura e peptona, além dos nutrientes normais presentes no melaço de cana-de-açúcar, mostrando influências positivas para a produção de ácido lático.

Um fator importante para o micro-organismo é o meio onde ele está, neste estudo não realizou-se enriquecimentos com outros suplementos, já Lopes (2008), fez suplementação com 5% de extrato de levedura em meio caldo de cana e a concentração de ácido lático obtido foi representativa.

O *Lactobacillus lactis* é ótimo catalisados lactose, glicose e galactose segundo Hofvendahl e Hagerdal (2000) e que já foi pesquisado, no processo de hidrólise e fermentação do amido obtido de resíduos industriais e agricultura e foi diagnosticado que o *Lactobacillus* realiza a fermentação a partir da maltose e glicose hidrolisada, ou seja neste resíduo de isolado proteico de soja há a presença de glicose mas não em taxas adequadas para um ideal desenvolvimento de *lactis.*

Já para o experimento com *Lactobacillus agilis*, observa-se que em todos os ensaios realizados, não houve significativa formação de biomassa e produção de acidez do meio, conforme resultados expressos na tabela 7, ou seja, acredita-se que com o meio mesmo rico em carboidratos, o ambiente não era ideal para o desenvolvimento desta espécie. Não pode-se afirmar, mas como *L. agilis* desenvolve-se a temperaturas ideais entre 30 a 32 ºC e a proposta foi de um desenvolvimento a 35 ºC, acredita-se que essa temperatura pode ter dificultado seu crescimento e sua multiplicação no meio.

Tabela 7 - Planejamento experimental para avaliação dos índices de biomassa, pH e teor de acidez expresso em ácido lático pelo micro-organismo *Lactobacillus agilis.*

	Centrifugado			**Não centrifugado**		
Ensaio	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**	**pH**	**Acidez em ácido lático, %**	**Massa de Biomassa, g/L**
1	5,22	7,10	150	5,27	6,89	158
2	5,29	6,94	168	5,28	6,64	151
3	5,66	6,74	171	5,42	6,67	172
4	5,12	6,91	166	5,51	6,97	165
5	5,08	6,89	152	5,12	6,88	159
Média	**5,27**	**6,92**	**161**	**5,32**	**6,81**	**161**

Fonte: Do Autor, 2012/2013

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 6 a 7, observou-se que o valor do pH em ambos sistemas (centrifugado e não-centrifugado), diminuiu em relação ao pH inicial. Mas estes valores na média de 5,27 e 5,32 podem ter afetado as taxas metabólicas dos

Lactobacillus agilis e do *casei,* reduzindo a produção de ácido lático, o consumo de carboidratos e o crescimento microbiano.

Neste estudo não houve suplementação do meio, fator esse que pode ter influenciado negativamente, pois mesmo havendo a presença de rafinose e estaquiose bem como outras fontes de carboidratos presentes no isolado proteico de soja não foram o suficiente para um desenvolvimento adequado ao *Lactobacillus agilis*, já que segundo Karp (2010), é catalisador preferido somente quando há rafinose e estaquiose em condições isoladas.

Portanto, é importante salientar que dentre as quatro linhagens classificadas como *Lactobacillus* do tipo *L. casei, L. lactis, L. delbrueckii e L. agilis*, duas das espécies escolhidas o *casei e o delbrueckii*, demonstraram-se mais eficientes na degradação dos carboidratos presentes no resíduo de isolado proteico de soja.

Apesar do amplo campo de aplicação, o custo do ácido lático impacta diretamente no seu uso no mercado do produto. Seu consumo seria aumentado, nas indústrias de plásticos onde o custo do mesmo é decisivo, nas aplicações descritas anteriormente em muitas nas quais o ácido lático poderia ser aplicado. O custo deste produto impacta diretamente nos processos de separação final, que requerem muitas etapas e acabam desencadeando altos custos de processos.

Na fermentação lática, assim como em todos os processos industriais em que há a utilização de micro-organismo vivos, o pH e a temperatura devem ser monitorados e controlados. Durante a fermentação, o pH do meio é reduzido devido a formação de ácido lático, que se constitui em um dos fatores de limitação do rendimento da reação. Em alguns níveis o pH do meio pode atingir valores próximos a três pela acidez produzida (TANGO e GHALY, 1999).

Verificou-se portanto que os valores de biomassa foram representativos percebido pelo desenvolvimento de viabilidade celular. Valores representativos de biomassa também foram verificados por Oliveira et al. (2009), obtidos em decorrência das bactérias láticas que tem crescimento ótimo em pH neutros e continuam crescendo através da fermentação resistindo até mesmo em pH ácido. Ou seja, é uma capacidade das BAL de produzir e tolerar uma concentração relativamente alta de ácido lático, é também de grande valor seletivo, já que as

capacita a eliminar a competição da maioria das outras bactérias em ambientes ricos em nutrientes.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que o resíduo de isolado proteico de soja é um meio rico em carboidratos, servindo como substrato para a produção de produtos obtidos por processos fermentativos, incluindo os ácidos orgânicos. No caso do ácido lático, os resíduos de isolado proteico de soja e nas condições tempo e temperatura utilizados no trabalho, favoreceram o desenvolvimento de *Lactobacillus casei e delbrueckii.*

A partir dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais estudados, verificou-se um indicativo de que as taxas metabólicas dos micro-organismos estudados podem ser comprometidas pelas condições também impostas.

A partir do planejamento com resíduo isolado proteico de soja conclui-se que a produção de ácido lático é viável, chegando a valores médio de 8,32% de ácido lático na condição centrifugado e de 8,67% de ácido lático na condição não centrifugado, em 120 horas de incubação pela ação do *Lactobacillus casei,* seguido pelo *L. delbrueckii* com valores médio de 7,17% de ácido lático na condição centrifugado e de 7,31% de ácido lático na condição não centrifugado.

Dessa forma, a produção de ácido lático por ação do *Lactobacillus casei* em resíduo de isolado proteico de soja é viável. Porém, uma fermentação deve ser realizada com o valor de pH controlado em biorreator com adição de neutralizante, para que os metabólitos produzidos pelos próprios micro-organismos não impeçam o crescimento adequado da espécie. Estes estudos serão objetos de trabalhos futuros.

Além de uma destinação de reduzido impacto ambiental, a utilização do resíduo de isolado proteico de soja, pode prover uma parte significativa na redução da compra de matérias primas. Porém o uso do resíduo de isolado proteico de soja para obtenção de ácido lático é algo novo, essa nova alternativa tenta responder ao interesse em utilizar de forma econômica a grande quantidade de resíduo produzida pelas indústrias de proteína isolada de soja e a necessidade da redução do efeito poluidor associado aos efluentes industriais contendo carboidratos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, V. et al., **Ácidos orgânicos: ácido cítrico, ácido acético e ácido lático sua importância na biotecnologia**, IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, Belém, PA, 2009.

ANTÔNIO, L. **Hidrólise ácida de polissacarídeos de microrganismos para produção de etanol,** Ribeirão Preto. SP. 2010. Disponível em www.unaerp.br/index.php?option=com_docman&task...1, acessado em 06.03.2013.

ANVISA, **Padrão de identidade e qualidade para a farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja.** Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978.

ANURADHA, R. **Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid,** Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology, Bombay, Powai, Mumbai 400076, India, 2009. Disponível em http://dspace.library.iitb.ac.in/xmlui/bitstream/handle/10054/919/5278-1.pdf?sequence=1, Acessado em 21 de fevereiro de 2013.

AZEVEDO, A.C., **Liberação das enzimas LHD e Pep e evolução da maturação de queijo parmesão adicionado de culturas autolíticas de *L. helveticus***, 2009, SP.

BARUFFALDI, R. **Produção de ácidos por microrganismos**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.). Biotecnologia: tecnologia das fermentações. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. V. 1, cap. 4, p. 70-87

BRAILE, P. M. R.; CAVALCANTI, L. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais.** São Paulo: CETESB, 1979, p. 139-154. Disponível em http://www.cprm.gov.br/publique/media/mestra_mauro_campos.pdf, acessado em 10 de abril de 2014.

BREMIL, **Reguladores de acidez**, disponível em http://www.bremil.com.br, acessado em 22 de abril de 2013.

CAPELLARI, J. **Biossíntese de ácido lático por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais,** Universidade da Região de Joinville, Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos, Joinville, SC, 2010.

CAPLICE, E., FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation.*Int. J. Food Microbiological*, Amsterdam, v. 50, p. 131-149, 1999.

CASSINI, A., **Estudo de Processos Alternativos no Pré-Tratamento de Efluentes provenientes da produção de Isolados Proteicos,** Tese de Doutorado de Engenharia Química da UFRGS, Porto Alegre/RS, 2008.

CHOUDHURY, B.; BASHA, A.; SWAMINATHAN, T. S. **Study of lactic acid extration with higher molecular weight aliphatic amines**. Journal of Chemical Technology and biotechnology, London, v. 72, n. 2, p. 111-116, 1998.

COSTA, V., **Perfil de metabolitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido lático,** Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006, disponível em www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde.../VanessaCosta.pdf, acessado em 07 de fevereiro de 2013.

DATTA R. et al**. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives**. FEMS Microbiology Reviews.16:221-231, 1995.

DEMIRCI, A.; POMETTO, A. L.; LEE, B.; HINZ, P. N. **Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentation with *Lactobacillus plantarum and Lactobacillus casei subsp. rhamnosus.*** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 46, n. 11, p. 4771-4774, 1998.

DUMBREPATIL, A. ADSUL, M. CHAUDHARI, S. KHIRE, J. GOKHALE, D. **Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant uc-3 in batch fermentation.** Appl Environ Microbiol. 2008 Jan; 74(1):333-5.

EVANGELISTA, R. L.; NIKOLOV, Z. L. **Recovery and purification of lactic acid from fermentation broth by adsorption**. Applied Biochemistry and Biotechnology, Berlin, v. 57-58, n. 1, p. 471-480, 1996

FAO **Agricultural Services Vulletin, FAO Corporate Document Repository**, disponível em http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e07.htm, acessado em 15.03.2013, 1992, Job number T0532, Departament de AG, Division AGS, Version 1997.

FERNANDES, G.R. MIGUEL, D.P., **Detecção dos açúcares da soja,** 2011, Disponível em http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/viewFile/406/298, acessado em 21 de março de 2013.

GOKSUNGUR Y., GUVENC U**. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by immobilized Lactobacillus delbrueckii IFO 3202**. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 74:131–136, 1999.

HOFVENDAHL K., HAHN-HAGERDAL B., **Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources**. Enzyme and Microbial Technology. 26: 87–107, 2000.

HONORATO, T. RABELO, M. PINTO, G. RODRIGUES, S., **Produção de ácido lático e dextrana utilizando suco de caju como substrato,** 2007, disponível em http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n2/06.pdf, acessado em 10 de abril de 2014.

HUJANEM, M.; LINKO, Y. Y**. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) lactic acid production by *Lactobacillus casei***. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v.45, n.3, p.307-313, 1996.

ITF Informe Técnico: ***Lactobacillus casei* –** V.01 – outubro, 2008 http://www.fagron.com.br/Literaturas/LITERATURAS%20FARMACEUTICAS%5CL%5CLACTOBACILLUS%20CASEI.pdf, acessado em 18.03.2013.

JOHN, R. et al. **Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii***, Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, Trivandrum, Índia, September 2005.

KANDLER, O., N. Weiss, 1986. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds), Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1209 – 1234, disponível em http://nbimcc.org/JCC/2005/JCC0546/JCC0546.pdf, acessado em 11.04.2014.

KASCAK, J. S.; KOMINEK, J.; ROEHR, M. Lactic acid. In: REHM H. J.; REED, G. Biotechnology. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2nd ed., 293-306, 1996.

KAREL M., JAROSLAV V., VERA H., MOJMIR R. **Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate**. Journal of Biotechnology. 56:25–31, 1997.

KARP, S. et al., **Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale,** 2010, disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933391, acessado em 04 de março de 2013.

LEE et al., **Lactic acid recovery using two-stage eletrodialysis and its modeling,** Jornal of membrane Science, 145, pg 53-66, 1998.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. Tese de doutorado.179p. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2006.

LEMOS, A. D. C. **A produção mais limpa como geradora de inovação e competitividade: o caso da fazenda Cerro do Tigre.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1998.

LIU, S. Q**. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations.** International Journal of Food Microbiology.83, 115-131, 2003.

LOPES, A. **Produção de ácido lático por lactobacilos em diferentes meios de cultivo, 2008** disponível em http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brc/33004137041P2/2009/lopes_ar_me_rcla.pdf, acessado em 02 de março de 2014.

LUTZ, Instituto Adolfo, **Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos**. Edição IV. Brasília, 2005.

MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae)*, na produção de cachaça de alambique.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universadidade Federal de Minas Gerais, 2006. Disponível em http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/brtstream/1843/MBSA6XWFAD/1/diss_versao_final.pdf>. Acesso em 06 de abril de 2014.

MILLER, F. CALDEIRÃO, L. DORTA, C. MARINELLI, P., **Obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da casca de laranja e bagaço de cana-de-açúcar**, disponível em www.revistaanalytica.com.br/artigos/11.pdf, acessado em 06 de setembro de 2013.

NARAYANAN et al. **Isolation of *adh* mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid,** 2004, disponível em http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue1/full/7, acessado em 06 de abril de 2014.

NIKOLOV, A.L; FUENTES-GRANADOS, R. Soybean (fermentation, meal oil). In: FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W. **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation.** New York: John Wiley & Sons, Inc., p. 2462 – 2479, 1999.

OLIVEIRA, R. , SOUSDALEFF, M., LIMA, M., LIMA, H., **Produção fermentativa de ácido lático a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei,*** Braz. J. Food Technol., VII BMCFB, junho 2009, disponível em http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0081.pdf, acessado em 13 de fevereiro de 2013.

PAULI T., FITZPATRICK J.J. **Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*.** Process Biochemistry, 2002.

YAMAGUISHI, C. **Processo biotecnológico para a produção de feijão desidratado com baixo teor de oligossacarídeos da família rafinose**, Paraná, 2008, disponível em http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/19562/DISSERTACAO%20...?sequence=1, acessado em 06 de março de 2013.

SHARM, et al., **Production of lactic acid during biorremediation of anaerobically digested molasses spent wash,** Indian Journal of Microbiology, 2003.

SILVA, M. GONÇALVES, O. LIMA, M. **Obtaining lactic acid through discontinuing fermentation using sugarcane molasses, cassava by-product meal, fructose and cassava starch,** 2010, disponível em http://www.cm.utfpr.edu.br/rebrapa/index.php/rebrapa/article/view/23, acessado em 05 de abril de 2014.

TAGG et al,**. Bacteriocinsof Gram-positive bacteria.** Bacteriology Reviews 40, 722-756. 1976.

TANGO, M. S. A.; Ghaly, A. E.; Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using /DFWREDFLOOXV_KHOYHWLFXV under batch conditions. %LRPDVV DQG_%LRHQHUJ\. n. 16, p. 61-78, 1999.

VICKROY T.B. **Lactic acid.** In: Moo-Young, editor. Comprehensive Biotechnology. Pub: DicToronto: Pergamon Press. 761–76, 1985.

WIN, S.S.; IMPOOLSUP, A.;NOOMHORM, A. **Growth Kinetic of Saccharomyces cerevisiae in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch** . j. Ind. Microbiol., Amsterdam, 1996.

XAVIER S., LONSANE B.K. **Sugarcane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid state fermentation system**. Applied Microbiology and Biotechnology. 41:291–5, 1994.