

Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase

Andréa Rocha de Oliveira¹; João Batista Buzato²;
Antônio Sérgio de Oliveira² & Maria Célia de Oliveira Haully²

Resumo

O ácido láctico é importante devido às suas inúmeras aplicações, sendo que a maioria da produção mundial é utilizada pela indústria de alimentos, e o restante utilizado nas indústrias farmacêuticas, têxtil, química, cosmética e outras. Para obtenção do ácido láctico, neste trabalho, utilizou-se a bactéria *Lactobacillus curvatus* cultivada em processo contínuo. O meio utilizado foi unicamente melaço de cana-de-açúcar diluído a 10% (m/v) e submetido a um tratamento prévio com invertase. O meio, após o tratamento enzimático, apresentou 1,7 % de açúcares redutores (AR). Os valores testados de taxa de diluição (D) foram 0,10; 0,15 e 0,20 h⁻¹, sob temperatura constante de 37° C. Durante o estado estacionário, as amostras foram coletadas para medidas de pH, determinação de açúcar redutor, produção de ácido láctico e biomassa (D.O. em 620nm). O consumo de açúcar redutor (AR) foi de 70; 66,5 e 65% para as D= 0,10; 0,15 e 0,20 h⁻¹, respectivamente. A maior produção de ácido láctico (4,7 g/L) foi obtida utilizando D = 0,10 h⁻¹, enquanto que D = 0,15 e 0,20 h⁻¹ forneceram concentrações de ácido láctico de 3,4 e 3,5 g/L, respectivamente. Assim, *L. curvatus* obteve maior eficiência de conversão de substrato em produto de 55,3 % na taxa de diluição de 0,10 h⁻¹. As leituras (D.O) em 620 nm para biomassa quando D = 0,10 e 0,15 h⁻¹ foram iguais a 0,221, enquanto que em D = 0,20 h⁻¹, o sistema mostrou tendência para lavagem celular, uma vez que a D.O. foi menor (0,210). Nas condições testadas, verificou-se que o melaço foi um bom meio de cultivo para produção de ácido láctico.

Palavras-chave: ácido láctico; *Lactobacillus curvatus*; fermentação contínua; melaço de cana-de-açúcar.

OLIVEIRA, A. R. de; BUZATO, J. B.; OLIVEIRA, A. S. de; HAULY, M. C. de O. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, v. 2, n. 1, p. 9-15, out. 2000.

Introdução

O ácido láctico é um ácido orgânico comercialmente importante, devido às suas inúmeras aplicações. Cerca de 82% de toda a sua produção mundial é utilizada pela indústria de alimentos, e o restante usado nas indústrias farmacêutica, têxtil, química, cosmética e outras (Evangalista & Nikolov, 1996).

A produção do ácido láctico pode se dar por síntese química ou bioconversão pelo processo de fermentação láctica (Bijan *et al.*, 1998). A produção por fermentação é um método mais vantajoso que a síntese química por ser mais econômica.

Para obtenção do ácido láctico, por via fermentativa, podem ser empregados diversos glicídeos, matérias-primas ricas em glicose, sacarose ou lactose. A escolha do carboidrato a ser bioconvertido

¹ Bolsista CNPq.

² Docentes do Depto. de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Cx. Postal 6001. 86.051-990. Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: haully@sercomtel.com.br

depende da cepa selecionada, visto que algumas se adaptam melhor em determinadas fontes de carboidratos do que em outras (Roychoudhury *et al.*, 1995).

Oliveira (1995) testou várias fontes de carbono na fermentação láctica utilizando *Lactobacillus curvatus*, e pôde constatar que este microrganismo não consome sacarose; por isso, neste trabalho, utilizou-se da adição de invertase ao meio, tornando este mais propício ao desenvolvimento do microrganismo escolhido.

Uma série de produtos e subprodutos da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados como fonte de substratos para a produção de substâncias comercialmente importantes, por serem baratos, abundantes e de qualidade uniforme (Moraes *et al.*, 1991). Resíduos e matérias-primas agroindustriais que contém alto teor de carboidratos podem ser utilizados como substrato para a fermentação láctica, sendo que os soros de leite e melaços são os de maior interesse econômico.

Considerando que o melaço possui cerca de 50% de açúcares fermentescíveis, este pode ser utilizado com sucesso na bioconversão do ácido láctico.

O objetivo deste trabalho foi utilizar melaço de cana-de-açúcar na concentração de 10% (m/v), previamente tratado com invertase, para produção de ácido láctico por fermentação contínua desenvolvida pelo *Lactobacillus curvatus*.

Material e Métodos

Material

Microrganismo

Como microrganismo foi utilizado *Lactobacillus curvatus*, isolado de silagem de milho por Oliveira (1995).

Meios de cultura

Meio de preservação

Leite em pó desengordurado reconstituído em água na concentração de 10% (m/v).

Meio para fermentação

Melaço de cana-de-açúcar na concentração de 10% (m/v), previamente tratado com invertase extraída de levedura de panificação, segundo Nepomuceno (1998).

Métodos

Inóculo

Inóculo de 10% (v/v) foi preparado em melaço de cana-de-açúcar 10% (m/v), previamente tratado com invertase, utilizando-se cultura de *L. curvatus* ativada em leite. O frasco foi incubado a 37° C durante o período de 24 horas para ser, posteriormente, inoculado no fermentador.

Preparo do meio de melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar foi diluído a 10% (m/v) em água destilada. Em seguida, o pH foi ajustado para o valor de 4,7 e o meio foi incubado com invertase por 20 minutos a 37° C. A proporção utilizada foi de 1:50 (invertase : melaço) Após o período de incubação, procedeu-se a sua inativação através de fervura durante 5 minutos. O pH foi novamente ajustado para o valor 6,2.

Processo fermentativo

A fermentação foi realizada em meio de melaço de cana-de-açúcar na concentração de 10% (m/v), previamente tratado com invertase, em processo contínuo. Um inóculo de 10% (v/v) de *L. curvatus*

foi adicionado no fermentador. O período de adaptação foi de 3 horas. Em seguida, foi ligada a bomba peristáltica, iniciando-se a fermentação contínua. Durante o processo fermentativo, o fluxo contínuo de meio (taxa de diluição) variou de $D = 0.10$; $D = 0.15$ e $D = 0.20 \text{ h}^{-1}$. As amostras foram coletadas, durante o estado estacionário, em diferentes tempos e utilizadas para as medidas de pH; determinações de açúcar redutor, análise de ácido lático e biomassa.

Determinação de pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

Determinação do ácido lático

a) Preparo das amostras

O ácido lático foi extraído do caldo fermentado de acordo com o método descrito por Silva (1981).

O padrão utilizado para curva de referência foi o lactato de lítio 1% (m/v), extraído nas mesmas condições.

b) Determinação de ácido lático por espectrofotometria

Método do Cloreto Férrico, conforme descrito por Silva (1981).

Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944).

Determinação de biomassa

A biomassa foi acompanhada por turbidimetria em $\lambda = 620 \text{ nm}$.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos por *Lactobacillus curvatus* na fermentação contínua em meio de melaço de cana-de-açúcar tratado com invertase são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: produção de ácido lático na fermentação de melaço 10% (m/v), previamente tratado com invertase, por *Lactobacillus curvatus* em cultivo contínuo, sob temperatura constante de 37° C.

Taxa de diluição	PH final	AR _i (%)	AR _r (%)	AR _c (%)	Ácido lático (%)	Biomassa (D.O.)
0.10	4.75	1.70	0.51	1.19	0.47	0.221
0.15	4.98	1.70	0.57	1.13	0.34	0.221
0.20	5.00	1.70	0.60	1.10	0.35	0.210

AR_i = açúcar redutor inicial; AR_r = açúcar redutor residual; AR_c = açúcar redutor consumido

A produção de ácido lático foi de 0,47; 0,34 e 0,35% nas taxas de diluição de 0,10; 0,15 e 0,20 h⁻¹, respectivamente. A melhor produção de ácido lático foi de 0,47% ou 4,7 g/L obtida na menor taxa

de diluição ($0,10 \text{ h}^{-1}$), indicando que valores de D menores favorecem a produção de ácido láctico. Barcena *et al.* (1998), utilizando *Lactobacillus casei*, também demonstraram que taxas de diluição de menor valor favorecem a produção de ácido láctico.

Payot *et al.* (1999) obtiveram concentração de $19,5 \text{ g/L}$ sem aeração e 11 g/L com aeração no processo contínuo utilizando *Bacillus coagulans*. Esses valores são maiores que os obtidos nesse trabalho. Entretanto, Payot *et al.* utilizaram meio suplementado com nitrogênio e fonte de carbono em maiores concentrações.

Os valores de biomassa de $0,221$; $0,221$ e $0,210$ (D.O.) foram obtidos quando empregadas as taxas de diluição de $0,10$; $0,15$ e $0,20 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Nessas condições, a biomassa permaneceu constante nas duas primeiras taxas de diluição, sofrendo uma variação de aproximadamente 5% na última taxa, demonstrando a tendência do sistema para lavagem celular em altas taxas de diluição.

A Tabela 2 apresenta os valores de eficiência de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), produtividade volumétrica (Y_p em g/Lh) e a produtividade teórica (Y_{pr} em $\%$).

Tabela 2: valores de eficiência de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), produtividade volumétrica (Y_p em g/Lh) e a produtividade teórica (Y_{pr} em $\%$) obtidos por *Lactobacillus curvatus* cultivado em melaço de cana-de-açúcar a 10% (m/v), previamente tratado com invertase ($1,7\%$ de AR_i), nas diferentes taxas de diluição durante o processo contínuo.

	Taxa	de	diluição
Parâmetros	0.10	0.15	0.20
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.39	0.30	0.32
Y_p (g/L/h)	0.14	0.05	0.06
Y_{pr} (%)	55.30	40	41.20

Os valores de índice de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) foram de $0,39$; $0,30$ e $0,32 \text{ g/g}$, nas diferentes taxas de diluição testadas. A melhor conversão obtida, $0,39 \text{ g/g}$, foi alcançada na menor taxa de diluição. Os valores de $Y_{p/s}$ diminuíram progressivamente conforme a taxa de diluição foi aumentada.

A produtividade volumétrica (Y_p) foi maior, $0,14 \text{ g/Lh}$, na menor taxa de diluição, caindo para $0,06 \text{ g/Lh}$ na maior taxa de diluição testada. Esses valores são inferiores quando comparados aos obtidos por Barcena *et al.* (1998) que utilizaram meio de cultivo enriquecido.

Melhores resultados têm sido demonstrados por Kaufman *et al.* (1996), contudo, utilizando instalações de alto custo operacional e substrato prontamente utilizável pelo microrganismo, como a glicose. Entretanto, esta vantagem somente pode ser útil quando este carboidrato é disponível a preço baixo, como nos Estados Unidos da América. Porém, no Brasil, o açúcar mais barato e disponível é a sacarose, constituinte do melaço de cana-de-açúcar.

A maior eficiência de conversão, $55,3 \%$, foi verificada na taxa de diluição de $0,10 \text{ h}^{-1}$, caindo para 40 e $41,2 \%$ em $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ e $0,20 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

A influência da taxa de diluição na produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em fermentação contínua de melaço de cana-de-açúcar é mostrada na Figura 1.

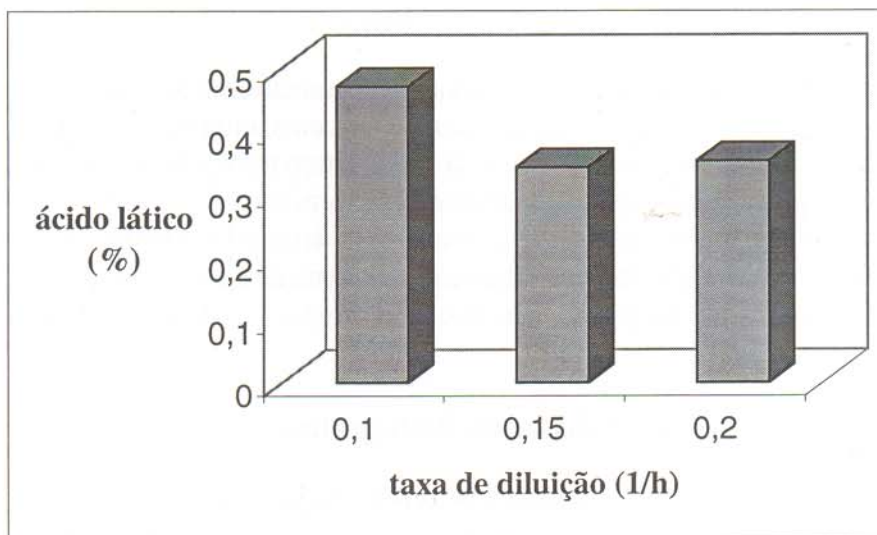


Figura 1: produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em cultivo contínuo de melão de cana-de-açúcar, a 10% (m/v), tratado com invertase.

A taxa de diluição de 0,10 h⁻¹ foi a mais adequada para a obtenção de ácido láctico.

A Figura 2 mostra o efeito da taxa de diluição (D) sobre a produção de ácido láctico, produção de biomassa e açúcar redutor residual (AR_r), na fermentação contínua de melão de cana-de-açúcar por *Lactobacillus curvatus*.

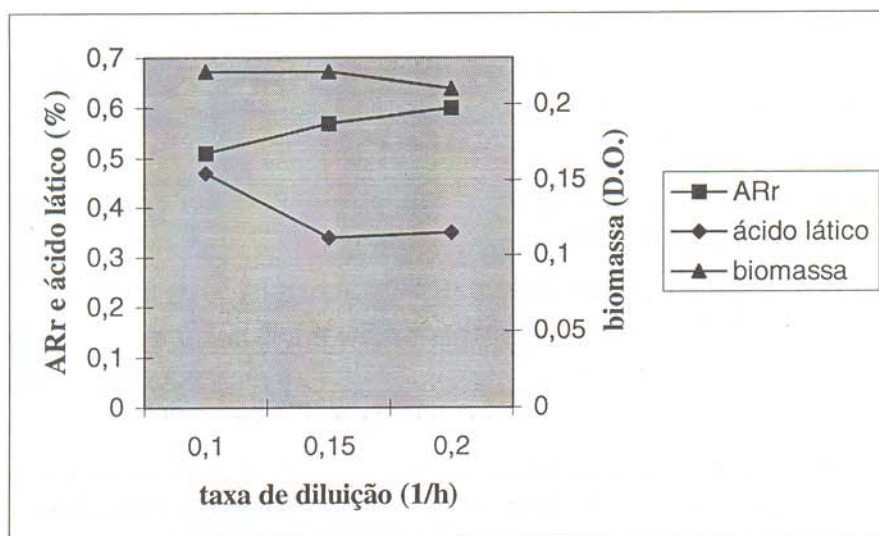


Figura 2: efeito da taxa de diluição (D) sobre a produção de ácido láctico, produção de biomassa e açúcar redutor residual (AR_r), na fermentação contínua de melão de cana-de-açúcar por *Lactobacillus curvatus*.

Os melhores valores para a biomassa (D.O. = 0,221), ácido láctico (0,47%) e açúcar redutor residual (0,51%) foram obtidos na menor taxa de diluição, mostrando ser condição mais adequada para realização da fermentação contínua.

Conclusões

O melão de cana-de-açúcar 10% (m/v), previamente tratado com invertase, constituiu um bom meio para produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, uma vez que este alcançou 55,3% do valor teórico de produto. A maior produção de ácido láctico foi verificada na taxa de diluição de $0,10\text{ h}^{-1}$, mostrando que este microrganismo produz melhor em taxas de diluição baixas. Assim como a produção, o maior consumo de carboidratos também se deu em $D = 0,10\text{ h}^{-1}$. A taxa de diluição, portanto, influencia na produção de ácido láctico e no consumo de carboidratos, uma vez que, com o aumento da taxa, ocorreu diminuição do consumo de carboidratos e da produção de ácido láctico.

Referências Bibliográficas

- BARCENA, J. M.; RAGOUT, A. L.; CORDOBA, P. R.; SINERIZ, F. Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 26, p. 231-237, 1998.
- BIJAN, C.; ASLAM, B.; TYAGARAJAN, S. Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 72, p. 111-116, 1998.
- EVANGELISTA, R. L.; NIKOLOV, Z. L. Recovery and purification of lactic acid from fermentation broth by adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57/58, p. 471-480, 1996.
- KAUFMAN, E. N.; COOPER, S. P.; BUDNER, M. K.; RICHARDSON, G. R. Continuous and Simultaneous Fermentation and Recovery of Lactic Acid in a Biparticle Fluidized-Bed Bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57/58, p. 503-515, 1996.
- MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. *Controle biológico de doenças de plantas*. Brasília : EMBRAPA, 1991. p. 253-272.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Biochemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NEPOMUCENO, M. F. Cinética enzimática II: Cinética enzimática da invertase. In : _____. *Bioquímica experimental*. Piracicaba : UNIMEP, 1998. p. 57-60.
- NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 2. ed. São Paulo : Melhoramentos, 1985.
- OLIVEIRA, A. S. *Desenvolvimento de inoculante para fermentação láctica de silagens: utilização de resíduos agroindustriais*. 1995. 127 fls. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, 1995.
- PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* – Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme & Microbial Technology*, v. 24, p. 191-199, 1999.
- ROYCHOUDHURY, P. R.; SRIVASTAVA, A.; SAHAI, V. Extractive Bioconversion of Lactic Acid. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 53, p. 61-87, 1995.
- SILVA, D. J. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa : UFV, 1981. p. 110-114.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry*, v. 160, p. 61-68, 1945.

Acid lactic production by *Lactobacillus curvatus*, utilising continuous fermentation process and sugar cane molasses treated with invertase

Abstract

Acid lactic plays an important role in the food, pharmaceutical, textiles industries and others. *Lactobacillus curvatus* has been used for acid lactic production under continuous culture operation. Diluted sugar cane molasses at 10 % (w/v) and followed by invertase-treatment was used as culture medium. Molasses reducing sugars concentration was 1.7 %. Dilution rate tested were 0.10, 0.15 and 0.20 h⁻¹ at 37°C. Samples were taken for pH, reducing sugar, lactic acid and biomass measurement under steady state. When D was 0.10, 0.15 and 0.20 h⁻¹, the reducing sugars consumption was 70, 66.5 and 65 %, respectively. The highest lactic acid production (4.7 g/L) was obtained when D = 0.10 h⁻¹ was used while D = 0.15 and 0.20 h⁻¹ achieved lactic acid concentration of 3.4 and 3.5 g/L, respectively. The highest substrate efficiency conversion was 55.3 % at dilution rate value of 0.10 h⁻¹ by *L. curvatus*. Biomass values were 0.221 under D = 0.10 and 0.15 h⁻¹ while D = 0.20 h⁻¹ the system showed a cellular wash out tendency as biomass value fell to 0.210. Under the tested conditions molasses showed to be a good substrate for lactic acid production.

Key words: lactic acid; *Lactobacillus curvatus*; continuous fermentation; sugar cane molasses.

OLIVEIRA, A. R. de; BUZATO, J. B.; OLIVEIRA, A. S. de; HAULY, M. C. de O. Acid lactic production by *Lactobacillus curvatus*, utilising continuous fermentation process and sugar cane molasses treated with invertase. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, v. 2, n. 1, p. 9-15, out. 2000.