



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA FERMENTAÇÃO DE SORO PARA PRODUÇÃO DE PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus*: CONDIÇÕES DE pH, TAMANHO DO INÓCULO E CONCENTRAÇÃO DO SORO NO CRESCIMENTO CELULAR

I. M. V. Barbosa¹; T. M. A. Pinheiro²; C. S. Takarada³; E. M. Sá⁴, P. R. Rosa⁵; V. L. Cardoso⁶
e U. Coutinho Filho⁷

¹ Bolsista de iniciação científica do CNPq, discente do curso de Engenharia Química; ² Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFU; ³ Bolsista do MEC do Programa de Educação Tutorial, discente do curso de Engenharia Química da UFU; ⁴ Ex-aluna do Curso de Bacharelado em Engenharia Química da UFU; ⁵ Ex-aluna do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFU; ^{6 e 7} Docentes da Faculdade de Engenharia Química – FEQUI da UFU.

Faculdade de Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Campus Santa Mônica, Uberlândia - MG, CEP 38408-144 - e-mail: ucfilho@feq.ufu.br

RESUMO - Foi feita uma análise do soro de leite no fermentado por *Lactobacillus acidophilus* LA- 5 para a produção de células de bactérias probióticas encapsuladas. A fermentação foi feita em um 2-litros B fermentador Biostat a 28 ± 1 °C, sem suprimento de ar e agitação mantida em 200 rpm. Foram estudadas condições de processamento diferentes utilizando Center Composite Design aplicado a Metodologia de Superfície de Resposta. O rendimento máximo das células de $2,7 \times 10^{10}$ NMP/mL em 36 horas de fermentação foi obtido com 30,85 g/L de lactose, um valor de 6,45 e 1,04 g/L de inóculo de pH. O crescimento celular foi avaliado por meio de soro de leite reconstituído e fresco depois de 144 horas de fermentação em condições pré-otimizadas. A concentração das células após a fermentação foi 1010 NMP/mL em todos os ensaios.

Palavras chave: Biotecnologia, processos fermentativos, lactose.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de queijos com o total em 2005 de 480.000 toneladas, gerando aproximadamente 4,3 milhões de toneladas de soro de queijo (USDA, 2009) que, geralmente não é devidamente utilizado, podendo até representar problemas quando descartado sem

tratamento. O soro de queijo tem basicamente três destinos principais. O primeiro é o processamento do mesmo a produtos e bebidas lácteas, produção de doces, salames e outros derivados que utilizam pequenas quantidades do mesmo pelo alto custo e a dificuldade de processá-lo. O segundo destino refere-se ao uso na alimentação animal, podendo ser utilizado na forma líquida ou seca. Finalmente,

o terceiro destino que seria o seu tratamento para posterior despejo no esgoto (Carminati, 2001).

O soro lácteo, subproduto da indústria de laticínios é uma matéria prima rica e nobre do ponto de vista nutricional, com alto teor de proteínas e vitaminas. Produtos tais como soro em pó, proteína do soro, queijo, lactose, ácido láctico, álcool, vinagre, probióticos e alimentos especiais (concentrado proteico, bebidas etc.) podem ser obtidos do soro de queijo (Ribeiro, 2000).

Devido ao alto volume gerado de soro torna-se importante a busca de novas alternativas para reduzir o potencial de poluição do soro e os custos associados ao tratamento do mesmo como efluente. Entre as atividades está o uso do soro como complemento na alimentação humana e animal de diversas formas como na produção de probióticos.

Os probióticos constituem microorganismos vivos que ao serem agregados como componentes da dieta exercem ação benéfica na flora intestinal microbiana tanto em animais como em humanos (Gueimonde *et al.*, 2006). No caso de animais esta ação benéfica pode ser definida como ganho de peso, melhora na resistência a doenças e auxílio na recuperação de infecções microbianas (Balcazar *et al.*, 2006) e para humanos ela esta associada a melhora de gastroenterites resistentes, melhora do quadro a intolerância a lactose, estimulação do sistema imune, redução do colesterol sérico, prevenção da formação de câncer e substancias carcinogênicas no intestino (Collins e Gibson, 1999).

A partir destes aspectos, neste trabalho, realizou-se a otimização das condições de fermentação de soro para produção de probiótico de *Lactobacillus acidophilus*, variando o pH e a concentração do inóculo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismo

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 foi mantida a 5°C e replicada a cada 15 dias, incubados durante 24 horas à 30° em um meio MRS selectiva (Man *et al.*, 1960) composto por 10 g/L de peptona de caseína, 10

g/g extracto de carne, 5 g/L de extracto de levedura, 20 g/L de glicose, 1 g/L de Tween 80, 2g/L de K₂HPO₄, 5 g/L de CH₃COONa , 2g/l de citrato de amônio, 0,2g/L de MgSO₄.7H₂O e 0,05g/L de MnSO₄.H₂O .

A concentração de células foi medida em ensaios para determinar as concentrações de células secas e o número de células viáveis. A concentração de células secas foi medida como se segue: as células foram colhidas por centrifugação de 25 mL de meio cultivado (15.000g durante 15 min) e secou-se a 90 ± 1 ° C, até que não haja uma detectável alteração no peso. As células viáveis foram obtidas pela metodologia Número Mais Provável (NMP) utilizando um meio MRS, tal como descrito por Man *et al.* (1960). Esta metodologia (NMP) foi escolhida devido à quantificação das células em condições isotérmicas a 35, 40, 60 e 70°C, como descrito abaixo, produz uma grande redução no número de células e NMP tem uma maior sensibilidade para a contagem extremamente baixa de microorganismos (Sun *et al.*, 2006 , DiGeronimo *et al.*, 1978).

Lactose e concentração de proteína

A concentração de lactose foi determinada por um espectrofotométrico com glicose oxidase (Leary *et al.*, 1992) e o balanço de massa descrito por $L=1,9(G1-G2)$, em que L representa a concentração de lactose (g/L), e G1 e G2 são a concentração de glicose (g/L), antes e depois da hidrólise ácida (20 mL HCl 11,5, 90°C durante 5 min). A redução do açúcar também foi medida pelo 3,5-ácido dinitrossalicílico (DNS) método (Miller, 1959). A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Lowry (Lowry, 1951).

Projeto experimental

O projeto experimental de otimização da produção de *Lactobacillus acidophilus* foi testado utilizando o planejamento fatorial fracionário (FFD), com três repetições no ponto central e seis pontos axiais em um 1,8 litros BioStat B fermentador a 28 ± 1 ° C, sem suprimento de ar e com agitação mantida em 200 rpm. Três fatores foram selecionados para utilização na experiência: concentração de lactose (X₁), pH (X₂) e o tamanho do inóculo (X₃). As faixas das variáveis investigadas

neste estudo foram: 20-40 g/L de lactose, 5-8 para pH e 0,5-1,5 g/L tamanho de inóculo. Para criar uma superfície de resposta, os dados experimentais obtidos a partir do experimento acima foram descritos com a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_1^2 + A_5X_2^2 + A_6X_3^2 + A_7X_1X_2 + A_8X_1X_3 + A_9X_2X_3 \quad (1)$$

onde Y representa a concentração esperada de células de *Lactobacillus acidophilus* (NMP/ml), X_1 a concentração de lactose, X_2 e X_3 o pH e o tamanho do inóculo, e A_i com $i=1,2,\dots,9$ os parâmetros ajustáveis para o ajuste dos dados.

Caracterização Cinética de *Lactobacillus acidophilus*

As curvas de crescimento foram determinadas tanto para o soro de leite reconstituído tanto para o soro de leite fresco utilizando o mesmo reator utilizado para os estudos de otimização com as mesmas condições de otimização de 144 horas de fermentação. As amostras foram retiradas em intervalos regulares para determinar a quantidade de células viáveis e células secas, e as concentrações de proteína e lactose.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 mostra os resultados dos ensaios e do planejamento fatorial de 36 horas de fermentação. A concentrações de células variou de $8,1 \times 10^7$ NMP/mL (ensaio 3) a $3,5 \times 10^{10}$ NMP/mL (ensaio 16). Como pode ser

visto, os melhores resultados foram encontrados no ponto central (Ensaio 15, 16 e 17): $(3,2 \pm 1,3) \times 10^{10}$, $(3,5 \pm 1,7) \times 10^{10}$ e $(3,0 \pm 1,1) \times 10^{10}$ NMP / mL.

O modelo matemático estabelecido pela equação (1) com os parâmetros estatisticamente significativos ao nível de confiança de 90% (Student's *t test*) são apresentados na equação (2). O coeficiente de determinação (R²) foi de 87% significa que o modelo explicou 87% da variação na resposta variável. A concentração celular ótima foi encontrada a um pH de 6,45 e as concentrações de 30,85 g/L (lactose) e 1,04 g/L (tamanho do inóculo). Estes resultados mostram a concordância qualitativa entre a concentração de células teórica e experimental.

$$Y = 2.894 \times 10^{10} - 8.514 \times 10^9 X_1^2 - 1.124 \times 10^{10} X_2^2 - 9.956 \times 10^9 X_3^2 \quad (2)$$

A Figura 1 apresenta o efeito da concentração de lactose e tamanho do inóculo na concentração de células viáveis com o pH mantido no ponto central (pH 6,5), enquanto que a Figura 2 ilustra o efeito do tamanho do inóculo e pH na concentração de células viáveis com a concentração de lactose realizada no ponto central (30 g/L). Note que as concentrações de células viáveis são otimizadas para uma concentração de lactose de 27 a 35 g/L, tamanho de inóculo de 0,8 a 1,2 g/L e pH de 6,0 a 7,0.

Tabela 1: Estudo da concentração de lactose, pH e tamanho do inóculo

Ensaio	X1 (g/L)	X2	X3 (g/L)	MPN/mL
1	-1 (20)	-1 (5,0)	-1 (0,5)	$(9,2 \pm 2,0) \times 10^7$
2	-1 (20)	-1 (5,0)	+1 (1,5)	$(5,2 \pm 2,3) \times 10^8$
3	-1 (20)	+1 (8,0)	-1 (0,5)	$(8,1 \pm 3,1) \times 10^7$
4	-1 (20)	+1 (8,0)	+1 (1,5)	$(1,5 \pm 2,6) \times 10^8$
5	+1 (40)	-1 (5,0)	-1 (0,5)	$(6,0 \pm 1,7) \times 10^8$
6	+1 (40)	-1 (5,0)	+1 (1,5)	$(3,5 \pm 3,2) \times 10^9$
7	+1 (40)	+1 (8,0)	-1 (0,5)	$(7,9 \pm 1,5) \times 10^8$
8	+1 (40)	+1 (8,0)	+1 (1,5)	$(4,0 \pm 3,3) \times 10^9$
9	$-\alpha$ (16,4)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(6,0 \pm 1,8) \times 10^9$
10	$+\alpha$ (43,531)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(1,2 \pm 2,3) \times 10^{10}$
11	0 (30)	$-\alpha$ (4,4)	0 (1,0)	$(7,2 \pm 1,9) \times 10^9$
12	0 (30)	$+\alpha$ (8,52)	0 (1,0)	$(8,0 \pm 3,7) \times 10^8$
13	0 (30)	0 (6,5)	$-\alpha$ (0,3)	$(7,2 \pm 2,5) \times 10^8$
14	0 (30)	0 (6,5)	$+\alpha$ (1,7)	$(1,2 \pm 2,6) \times 10^{10}$
15	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(3,2 \pm 1,3) \times 10^{10}$
16	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(3,5 \pm 1,7) \times 10^{10}$
17	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(3,0 \pm 1,1) \times 10^{10}$

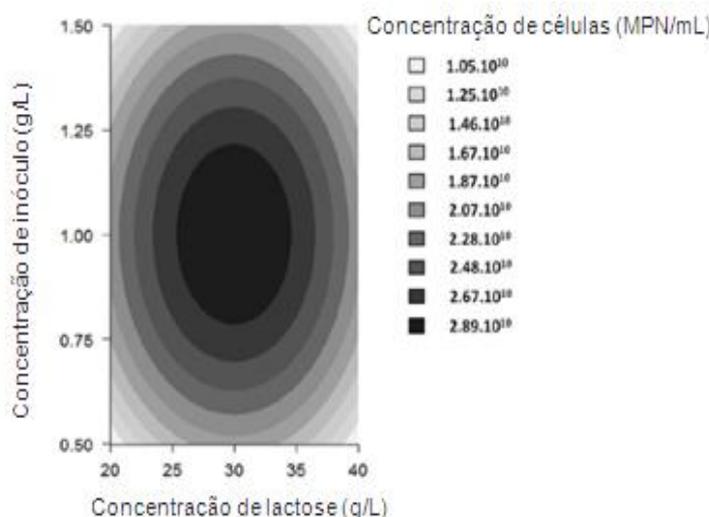


Figura 1 - Efeito da concentração de lactose e do tamanho do inóculo na concentração de células viáveis.

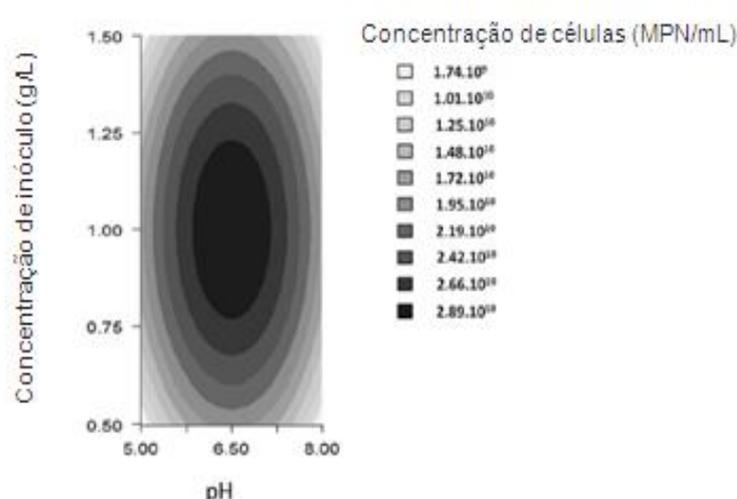


Figura 2 - Efeito do tamanho do inóculo e do pH na concentração de células viáveis.

Os resultados experimentais revelaram uma concentração otimizada de células viáveis de cerca de 1.010 NMP/mL e concentrações de células de $6,0 \pm 0,7 \text{ g/L}$. A concentração de células foi cerca de 1,38 vezes maior do que o relatado na literatura (Tari *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados neste trabalho, foi possível concluir que o soro de leite tem um grande potencial para a

produção de células imobilizadas de probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5, não houveram também diferenças significativas entre o uso de soro de leite reconstituído e o fresco. O planejamento fatorial mostrou claramente que as concentrações de células viáveis são otimizadas em concentrações de lactose de 27 a 35 g/L, tamanho de inóculo de 0,8 a 1,2 g/L e pH de 6,0 a 7,0.

REFERÊNCIAS

- USDA, United States Department of Agriculture, Disponível em: <http://usda.gov>. Acesso em Setembro de 2009.
- CARMINATI, C.A (2001): Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis*, 79p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.
- RIBEIRO, H.S., 2000. Obtenção e aplicação de concentrados proteicos de soro de leite bovino em produtos cárneos. Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas – SP. (Tese de doutorado).
- GUEIMONDE, M., JALONEN, L., HE, F., HIRAMATSU, M., SALMINEN, S., 2006. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli, *Food Research International*, 39 (4), 467-471.
- BALCAZAR, J.L., BLAS, I., RUIZ ZARZUELA, I., CUNNINGHAM, D., VENDRELL, D., MUZQUIZ, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture, *Veterinary Microbiology*, 114 (3-4), 173-186.
- COLLINS, M.D., GIBSON, G.R., 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut, *American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (5), 1052S-1057S.
- MAN, J. D., ROGOSA, M., SHARPE, M. E., *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.*, v. 23, p. 130-135 (1960).
- SUN, X., KUSOSU, S., SHINTANI, H., The expanded application of most probable number to the quantitative evaluation of extremely low microbial count. *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, v. 60, n. 2, p. 124-134 (2006).
- DIGERONIMO, M. J., NIKAIDO, M., ALEXANDER, M., Most probable number technique for the enumeration of aromatic degraders in natural. *Environments Microbial Ecology*, v. 4, p. 263- 266 (1978).
- LEARY, N. O., PEMBROKE, A., DUGGAN, P. F., Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clinical Chemistry*, v. 38, n. 2, p. 298-302 (1992).
- MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, n. 3, p. 426-428 (1959).
- LOWRY, O. H., ROBSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275 (1951).
- TARI, C., USTOK, F. I. and HARSA, S., Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass, β -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. *International Dairy Journal*, v. 19, n. 4, p. 236- 243 (2009).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelas bolsas vinculadas ao projeto.