



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**RAFAELLA MARTINS DE FREITAS**

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Lactobacillus* PARA OBTENÇÃO DE FERMENTO LÁTICO A SER EMPREGADO NO PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE COALHO**

**FORTALEZA**

**2018**

**RAFAELLA MARTINS DE FREITAS**

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Lactobacillus* PARA OBTENÇÃO DE FERMENTO LÁTICO A SER EMPREGADO NO PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE COALHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Döering Gasparin Carvalho.

Co-orientadora: Pesquisadora Dra. Laura Maria Bruno.

**FORTALEZA**

**2018**

**RAFAELLA MARTINS DE FREITAS**

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Lactobacillus* PARA OBTENÇÃO DE FERMENTO LÁTICO A SER EMPREGADO NO PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE COALHO**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Animal

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Juliane Döering Gasparin Carvalho (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Sueli Rodrigues  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Pesquisador Gustavo Saavedra Pinto  
Embrapa Agroindústria Tropical

A minha querida filha Pietra.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre e acima de todas as coisas.

À minha família pelo apoio, especialmente com a minha filha.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (campus Iguatu) pela colaboração e compreensão desde o momento da minha aprovação no mestrado.

À Embrapa Agroindústria Tropical por todo o suporte dado para o desenvolvimento da pesquisa.

À professora Dra. Juliane Döering pelo carinho, ensinamentos e orientação. Uma inspiração na docência para mim.

À Dra. Laura Bruno pela gentileza, paciência e por todo o apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Dr. Gustavo Saavedra por todo o aprendizado orientação ao longo desse trabalho com os biorreatores.

À professora Dra. Sueli Rodrigues por participar das minhas bancas de pré-defesa e defesa e por todas as suas contribuições importantes.

À Natalia Moura pelo companheirismo e por estar comigo nos erros e acertos das fermentações.

À minha amiga Elisangela Castro pela disponibilidade e amizade.

À toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Embrapa) pela amizade e acolhimento.

À Régia pelas conversas de otimismo e fé.

Ao “Team BAL” (Thalita, Samara e Larissa) pela ajuda e parceria.

À querida Bruna Santana pela ajuda com a estatística e por dividir comigo as angústias do mestrado.

A todos que de alguma forma com um gesto, uma palavra, uma mensagem me apoiaram durante essa caminhada.

## RESUMO

O queijo de Coalho é uma variedade típica do Nordeste do país, porém a sua produção é realizada, geralmente, de forma artesanal e enfrenta problemas com a qualidade sanitária. A legislação brasileira estabelece que o leite destinado à fabricação de queijos seja submetido ao processo de pasteurização, a qual destrói, além das bactérias indesejáveis, outro grupo importante na elaboração do queijo, as bactérias ácido lácticas (BAL). As BAL vêm sendo selecionadas de queijo de Coalho produzido com leite cru para elaboração de um fermento láctico, que possa ser utilizado no processo de fabricação do queijo com leite pasteurizado. O objetivo geral deste trabalho foi produzir biomassa de três bactérias do gênero *Lactobacillus*, previamente caracterizadas com potencial para produção de queijo de coalho, em escala de fermentador, com o intuito de ampliar sua escala de produção. Foram utilizadas três cepas de *Lactobacillus*, sendo duas de *Lactobacillus rhamnosus* (cepas 1057a e 1120a) e uma de *Lactobacillus plantarum* (1115b), cultivadas em fermentador em diferentes condições de pH, agitação, aeração e meios de cultura. Essas bactérias foram isoladas de queijos de Coalho artesanais produzidos com leite cru e estão depositadas na Coleção de Microrganismos de Interesse para a Embrapa Agroindústria Tropical, armazenadas a -80°C. Os parâmetros analisados foram contagem de células viáveis, determinação da concentração de biomassa (g/L) nos tempos 0, 18, 24, 42 e 48 horas e análise de açúcar residual. A produção de biomassa em *shaker* das cepas 1120a, 1057a e 1115b foram de 3,1 g/L, 3,2 g/L e 1,9 g/L respectivamente, após 48 horas de fermentação. A cepa 1120a produziu a maior concentração de biomassa em biorreator (3,2 g/L) quando a fermentação foi conduzida em meio MRS, agitação de 150 rpm sem defletores, temperatura de 37°C e aeração de 1 v.v.m na superfície do meio. Quando o meio MRS foi substituído por MRS simplificado, a produção de biomassa foi de apenas 0,7 g/L. O pH também influenciou na produção de biomassa, as quais foram 1,0g/L para a cepa 1120a cultivada em pH 4,7 e 1,1 g/L para a cepa 1115b, em pH 5,7. A cepa 1057a produziu uma biomassa de 1,9 g/L em pH 5,7 apresentando o melhor desempenho no meio MRS simplificado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias ácido lácticas. Biorreator. Crescimento.

## ABSTRACT

Coalho cheese is a typical variety from the Northeast of the country, but its production is usually handcrafted and faces problems with sanitary quality. Brazilian legislation establishes that cheese-making milk is subjected to the pasteurization process, which destroys, in addition to undesirable bacteria, another important group in cheese making, lactic acid bacteria (BAL). The BALs have been selected from Coalho cheese produced with raw milk for the elaboration of a lactic ferment, which can be used in the cheese making process with pasteurized milk. The general objective of this work was to produce biomass of three bacteria of the genus *Lactobacillus*, previously characterized with potential for the production of rennet cheese, in a fermenter scale, in order to expand its scale of production. Three strains of *Lactobacillus* were used, two of *Lactobacillus rhamnosus* (strains 1057a and 1120a) and one of *Lactobacillus plantarum* (1115b), grown in fermenter under different conditions of pH, agitation, aeration and culture media. These bacteria were isolated from artisanal Cranberry cheeses produced with raw milk and are deposited in the Collection of Microorganisms of Interest for Embrapa Tropical Agroindustry, stored at -80°C. The parameters analyzed were viable cell counts, determination of the biomass concentration (g/L) at 0, 18, 24, 42 and 48 hours and residual sugar analysis. Shaker biomass production of strains 1120a, 1057a and 1115b were 3,1 g/L, 3,2 g/L and 1,9 g/L, respectively, after 48 hours of fermentation. Strain 1120a produced the highest concentration of biomass in bioreactor (3,2 g/L) when the fermentation was conducted in MRS medium, agitation of 150 rpm without baffles, temperature of 37°C and aeration of 1 v.v.m on the surface of the medium. When the MRS medium was replaced with simplified MRS, biomass production was only 0,7 g/L. PH also influenced biomass production, which was 1,0 g/L for strain 1120a grown at pH 4,7 and 1,1 g/L for strain 1115b at pH 5,7. Strain 1057a produced a biomass of 1,9 g/L at pH 5,7 exhibiting the best performance in the simplified MRS medium.

**KEYWORDS:** Lactic acid bacteria. Bioreactor. Growth.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

L.	<i>Lactobacillus</i>
BAL	Bactérias ácido lácticas
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
FSm	Fermentação submersa
FES	Fermentação em estado sólido
L	Litro
g	Gramas
h	Horas
mL	Mililitro
M	Molar
N	Normal
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
DNS	Dinitrosalicílico
UFC	Unidade formadora de colônia
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de cálcio



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulações dos meios de cultura MRS sintético e simplificado.....	29
Tabela 2	Teor de açúcar nos meios MRS e MRS simplificado no início e final do processo de fermentação para a produção de biomassa da cepa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1120a, no biorreator a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio.....	36
Tabela 3	Valores da concentração de biomassa final, do açúcar residual total e do fator de conversão do substrato em biomassa após 24 horas de fermentação em meio MRS simplificado e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7 para as cepas 1120a, 1057a e 1115b.....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coloração de Gram do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> cepas 1120a e 1057a e <i>Lactobacillus plantarum</i> cepa 1115b.....	19
Figura 2	Cultura estoque de armazenamento.....	26
Figura 3	Cultura estoque de trabalho.....	27
Figura 4	Curva de crescimento de biomassa das cepas de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1120a e 1057a e de <i>Lactobacillus plantarum</i> 1115b, em <i>shaker</i> a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm).....	31
Figura 5	Produção de biomassa da cepa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1120a, em meio MRS, no biorreator com e sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio.....	32
Figura 6	Produção de biomassa da cepa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1120a, em meio MRS, no biorreator com defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e em profundidade.	33
Figura 7	Produção de biomassa da cepa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1120a, em meio MRS sintético e simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio.....	35
Figura 8	Produção de biomassa da cepa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1120a, em meio MRS simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm), com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7.....	38
Figura 9	Produção de biomassa da cepa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1057a, em meio MRS simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm), com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7.....	40
Figura 10	Produção de biomassa da cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> 1115b, em meio MRS simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm), com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7.....	41

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	<i>Queijo de Coalho</i> .....	15
2.2	<i>Pasteurização do Leite</i> .....	16
2.3	<i>Fermento láctico</i> .....	16
2.4	<i>Bactérias ácido lácticas</i> .....	17
2.4.1	<i>Lactobacillus sp.</i> .....	18
2.4.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (cepas 1057a e 1120a) e <i>plantarum</i> (cepa 1115b)..	19
2.5	<i>Condições para a produção de biomassa de Lactobacillus</i> .....	20
2.6	<i>Processos fermentativos em biorreatores</i> .....	21
2.7	<i>Redução dos custos de meios de cultura em processos fermentativos</i> .....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	<i>Cepas de bactérias ácido lácticas</i> .....	25
3.2	<i>Preparação da cultura estoque de armazenamento</i> .....	25
3.3	<i>Preparação da cultura estoque de trabalho</i> .....	26
3.4	<i>Contagem das células viáveis</i> .....	27
3.5	<i>Elaboração da curva de crescimento das cepas</i> .....	27
3.6	<i>Preparação do inóculo</i> .....	28
3.7	<i>Influência da agitação na produção de biomassa em biorreator</i> .....	28
3.8	<i>Influência da aeração na produção de biomassa em biorreator</i> .....	28
3.9	<i>Avaliação do meio de cultura na produção de biomassa</i> .....	29
3.10	<i>Influência do pH na produção de biomassa em biorreator</i> .....	29
3.11	<i>Concentração de biomassa</i> .....	30
3.12	<i>Determinação do pH</i> .....	30
3.13	<i>Análise de açúcar</i> .....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1	<i>Cultivo em shaker</i> .....	31
4.2	<i>Produção de biomassa em biorreator</i> .....	31
4.3	<i>Produção de biomassa em biorreator com pH controlado</i> .....	37

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A microbiota natural dos produtos lácteos tem sido amplamente estudada na busca por culturas lácticas adequadas para a fabricação de determinados produtos e também por propriedades específicas, como atividade probiótica e a produção de bacteriocinas (RANDAZZO et al., 2009). Algumas cepas microbianas específicas têm sido isoladas a partir do leite e adicionadas como culturas *starter* ou adjuntas durante o processo de fabricação dos produtos, a fim de conferir as características sensoriais desejáveis (QUIGLEY et al., 2013).

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão amplamente distribuídas na natureza e são facilmente encontradas no leite e seus derivados (RESENDE, 2011). As BAL são empregadas na tecnologia de alimentos por causa de sua contribuição no aroma, textura, valor nutricional e segurança microbiológica em alimentos fermentados, além de serem produtoras de enzimas proteolíticas, exopolissacarídeos e substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas e antibióticos (CABRAL, et al., 2016).

A produção de derivados lácteos no Brasil utiliza culturas iniciadoras, comercializadas por empresas estrangeiras, no entanto, o mercado brasileiro tem potencial para isolamento de bactérias ácido lácticas de produtos artesanais (CABRAL, et al., 2016). A biodiversidade de bactérias envolvidas na produção de queijos apresenta importante contribuição no desenvolvimento das características típicas desses produtos (BRUNO, et al., 2017).

O queijo de Coalho artesanal é produzido com leite cru e apesar de ser fonte de bactérias lácticas, pode conter também microrganismos patogênicos. Com as exigências do mercado por padronização, higiene e qualidade a presença de microrganismos indesejáveis pode comprometer a competitividade do produto (BRUNO et al., 2011).

Com o intuito de garantir a segurança alimentar, a legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos seja submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). No entanto, esses processos eliminam além dos microrganismos indesejáveis, parte da microbiota láctica que contribui para a formação de características sensoriais dos queijos (QUIGLEY, et al., 2013).

O fermento láctico pode ser definido como uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros, espécies e cepas de BAL (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Na elaboração de queijos, sua função está relacionada à produção de ácido láctico, que facilita a ação do coalho e auxilia na expulsão do soro, além do

desenvolvimento das características sensoriais do queijo e o controle do crescimento de patógenos (TODESCATTO, 2014).

O desenvolvimento de fermento láctico para incorporação na produção de alimentos é um processo complexo, pois as bactérias constituintes deste precisam ser avaliadas quanto às características intrínsecas e as do alimento que será elaborado com a sua utilização (NIETOARRIBAS et al., 2009). Para isso também são necessárias as adequações das condições do meio para o cultivo dos microrganismos envolvidos e os fatores principais como a temperatura, o pH, a disponibilidade de água e oxigênio do processo para permitir um bom desenvolvimento dos mesmos (MADIGAN et al., 2016).

Os cultivos em biorreatores são utilizados nos processos biotecnológicos para o aumento da escala produtiva de microrganismos, antibióticos, enzimas, hormônios, anticorpos, cultura de células e tecidos vegetais (VIEIRA, 2014). Nesses equipamentos, os processos fermentativos são controlados através da medição de alguns parâmetros como a temperatura, o pH, o oxigênio e a velocidade de agitação a fim de fornecer as melhores condições para o desenvolvimento do microrganismo. A determinação de biomassa é um fator chave para o conhecimento e controle dos processos fermentativos, pois a concentração determina a velocidade de crescimento e/ou formação de produtos (BARRAL; LIMA, 2001).

Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi produzir biomassa de bactérias do gênero *Lactobacillus* em escala de fermentador, a fim de desenvolver fermento láctico a ser utilizado na produção de queijo de Coalho. Nesse processo, foram utilizadas três cepas de *Lactobacillus*, sendo duas de *Lactobacillus rhamnosus* (cepas 1057a e 1120a) e uma de *Lactobacillus plantarum* (1115b). Além disso, os objetivos específicos foram:

- ✓ Investigar a eficiência de meio de cultura alternativo (MRS simplificado) na produção de biomassa das cepas de *Lactobacillus*.
- ✓ Avaliar a influência do pH e seu controle sobre o crescimento das cepas de *Lactobacillus*;
- ✓ Verificar a influência dos sistemas de agitação e aeração no biorreator sobre o crescimento das cepas de *Lactobacillus*;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Queijo de Coalho

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Queijos (2018), o aumento na produção de queijos previsto para este ano é de 2,5%. No ano de 2017 foram produzidos mais de 1 milhão de toneladas de queijo, o que representou um aumento de 2% sobre 2016. O consumo de queijos no Brasil é de 5,5 quilos por habitante ao ano atualmente, um índice baixo quando comparado a outros países como a Argentina (11 kg/hab./ano). O Brasil produz diferentes tipos de queijo, que incluem os da tradição europeia, como muçarela, gouda, parmesão, gorgonzola; e os da tradição americana (*cheddar, cream cheese e cottage*); além dos queijos tipicamente brasileiros como o minas frescal, coalho e o requeijão (ABIQ, 2017).

O queijo de Coalho é um produto típico da região Nordeste do Brasil e que se destaca como um dos principais tipos de queijos artesanais fabricados e consumidos nos Estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba (LIMA, 2010). Pode ser consumido fresco, assado ou como ingrediente na elaboração de diversos pratos regionais. Com o aumento da sua popularidade, vem ganhando mercado em outros territórios do Brasil, como no Sudeste, onde é comercializado na forma fracionada em espetos para churrasco e consumido principalmente na forma grelhada (MAMEDE, 2008).

O queijo de Coalho é definido como o queijo obtido por coagulação do leite pasteurizado por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas e com a utilização ou não de bactérias lácticas selecionadas, sendo comercializado normalmente até 10 dias após a sua fabricação e estocado em temperatura média de 12°C (BRASIL, 2001). Com o leite cru, a produção de queijo artesanal constitui uma das atividades geradoras de renda familiar e utiliza técnicas transmitidas pelos pequenos agricultores de geração em geração (MOURA, 2012).

O queijo artesanal caracteriza-se pela falta de padrão na elaboração, bem como problemas na qualidade do leite e por apresentar sabor e aroma mais intensos do que os produzidos com o leite pasteurizado devido à biodiversidade das bactérias ácido lácticas endógenas do leite (FRANCIOSI et al., 2009).

Apesar de ser produzido há mais de um século, ainda hoje existe falta de padronização nas técnicas de elaboração desse queijo, o que acarreta diferenças nas características finais do produto. A fabricação de queijo de Coalho com leite cru, na grande maioria dos processos artesanais de queijo, propicia a presença de uma população microbiana diversa no produto final, que inclui além das bactérias ácido lácticas as quais são muito

importantes no processo de fermentação desse produto (GONZÁLEZ et al., 2010), muitos patógenos que comprometem a sua segurança e comercialização (OLIVEIRA et al., 2010).

### ***2.2 Pasteurização do leite***

O tratamento térmico é uma das tecnologias aplicadas na indústria alimentícia para a preservação e produção de alimentos inócuos, com vida de prateleira prolongada sem representar riscos para a saúde do consumidor (PEREIRA; VICENTE, 2010). A pasteurização do leite é uma operação que pode ou não ser realizada no leite para a fabricação de queijo (PEREDA et al., 2005).

O leite pasteurizado de consumo pode ser definido como o leite que foi submetido ao tratamento térmico da pasteurização e imediatamente resfriado para a temperatura mínima de 4°C, com a finalidade de destruir a microbiota patogênica, sem causar alterações sensíveis em sua constituição física, equilíbrio químico, composição nutricional e características sensoriais (BRASIL, 2011). Esse processo pode ser realizado de duas formas com variação no binômio tempo e temperatura. O primeiro processo, chamado de pasteurização lenta, consiste no aquecimento indireto do leite até a temperatura entre 63°C e 65°C por 30 minutos sob agitação mecânica suave em aparelhagem apropriada. Na pasteurização rápida, o leite é aquecido em camada laminar entre 72°C e 75°C por 15 segundos em pasteurizador de placas (BRASIL, 2010). A realização do tratamento térmico elimina toda a microbiota patogênica, inativa as enzimas deteriorantes e elimina a quase totalidade da microbiota saprófita deteriorante do leite cru (BRASIL, 2010).

Com o intuito de garantir a segurança alimentar, a legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos seja submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). No entanto, esses processos destroem além dos microrganismos indesejáveis, parte da microbiota do leite, que contribui para a formação das características sensoriais dos queijos (QUIGLEY et al., 2013).

### ***2.3 Fermento láctico***

O fermento láctico pode ser definido como uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros, espécies e cepas de BAL (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Na elaboração de queijos, sua função está relacionada à produção de ácido láctico, que facilita a ação do coalho e auxilia na expulsão do soro, além do desenvolvimento das características sensoriais do queijo e o controle do crescimento de patógenos (TODESCATTO, 2014).



Algumas culturas lácticas autóctones, compostas por bactérias “starter” e adjuntas, tem sido selecionadas do leite e queijos artesanais a fim de obter um fermento láctico para a produção de queijo fabricado com leite pasteurizado (GONZÁLEZ et al., 2010). Carvalho (2007) em seu trabalho de caracterização da microbiota do queijo de Coalho artesanal identificou o gênero *Lactobacillus* como um dos principais constituintes dessa variedade de queijo fabricado no Ceará. A Embrapa Agroindústria Tropical selecionou três cepas de *Lactobacillus*, sendo duas de *L. rhamnosus* e uma de *L. plantarum* com características tecnológicas de interesse para a produção de queijo de Coalho produzido com leite tratado termicamente (BRUNO et al., 2016).

A produção de derivados lácteos no Brasil utiliza fermentos lácticos comercializados por empresas estrangeiras, no entanto, o mercado brasileiro tem potencial para isolamento de bactérias ácido lácticas de produtos artesanais, como o queijo de Coalho (CABRAL, et al., 2016). A importação das culturas, muitas vezes, não atende as demandas das empresas de laticínios e a produção desse insumo em nível nacional geraria um mercado promissor (SALVATORI; KAPPLER; TOLDI, 2014).

A microbiota natural dos produtos lácteos tem sido amplamente estudada, na busca por culturas lácticas adequadas para a fabricação de determinados produtos e também por propriedades específicas, como atividade probiótica e a produção de bacteriocinas (RANDAZZO et al., 2009). Algumas cepas microbianas específicas têm sido isoladas a partir do leite e adicionadas como culturas *starter* ou adjuntas durante o processo de fabricação dos produtos, a fim de conferir as características sensoriais desejáveis (QUIGLEY et al., 2013). A utilização de culturas lácticas, que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, na produção de alimentos fermentados torna esses produtos mais seguros ao consumidor, bem como aumentam a sua vida de prateleira, uma vez que inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (COSTA et al., 2012).

#### **2.4 Bactérias ácido lácticas**

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão amplamente distribuídas na natureza, fazem parte da microbiota dos tratos gastrintestinal, respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies de animais. Podem ser encontrados também no solo, na água, em vegetais, grãos, leite, carne e seus derivados (RESENDE, 2011).

As BAL constituem um grupo composto por 13 gêneros de bactérias entre elas os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. São encontradas na forma de bacilos, cocos ou bastonetes e apresentam tolerância ao oxigênio e ácido, além de

não formarem esporos e se desenvolverem em temperaturas de 30°C a 50°C, podendo ser mesofílicas ou termofílicas (MAKAROVA; KOONIN 2007, *apud* HERMANNNS 2013).

Essas bactérias apresentam atividade antagonista contra microrganismos patogênicos e deteriorantes importantes em alimentos (BELLO et al., 2010). Estudos identificaram o *Lactobacillus* spp. como o principal gênero de BAL inibidor de microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* (DUARTE et al., 2016; NETO et al., 2013). Além disso, as bactérias ácido lácticas produzem uma série de enzimas que atuam sobre os principais componentes do leite e do queijo produzindo características sensoriais desejáveis (LIMA et al., 2009).

As bactérias lácticas são muito exigentes quanto às condições de crescimento, tendo necessidade de fontes de nitrogênio, vitaminas e sais minerais. O metabolismo das BAL pode apresentar duas rotas principais, a homofermentativa, com produção de ácido láctico e a heterofermentativa, com formação de ácido láctico, etanol, gás carbônico e compostos de flavor (LI et al., 2010).

#### **2.4.1 *Lactobacillus* sp.**

Entre as espécies de bactérias ácido lácticas, os *Lactobacillus* são os microrganismos de maior expressão, pertencem à lista “Generally Recognized as Safe” (GRAS) do “Codex Alimentarius” e tem sido muito utilizados como probióticos (KEMPKA, 2008). Algumas cepas de *Lactobacillus acidophilus* estão sendo utilizadas na fabricação de queijos e iogurtes com funcionalidade probiótica (XING et al., 2014) e o *Lactobacillus rhamnosus* é a espécie desse gênero com maior comercialização no mundo para emprego em produtos probióticos (RASINKANGAS et al., 2014).

O gênero *Lactobacillus* compreende microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos e encontrados nas formas de bastonetes, cocos e bacilos (FUGELSANG; EDWARDS, 2007). Quanto à capacidade de assimilar oxigênio, essas bactérias apresentam características heterogêneas, podendo ser anaeróbias, anaeróbias facultativas, aeróbias e microaerófilas (MATA et al., 2008).

O gênero possui mais de 100 espécies que são classificadas em três grupos, os quais são classificados de acordo com o produto final da sua fermentação em: *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios, que fermentam apenas hexoses e ácido láctico; *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativos, que são capazes de fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos, ácido láctico, gás

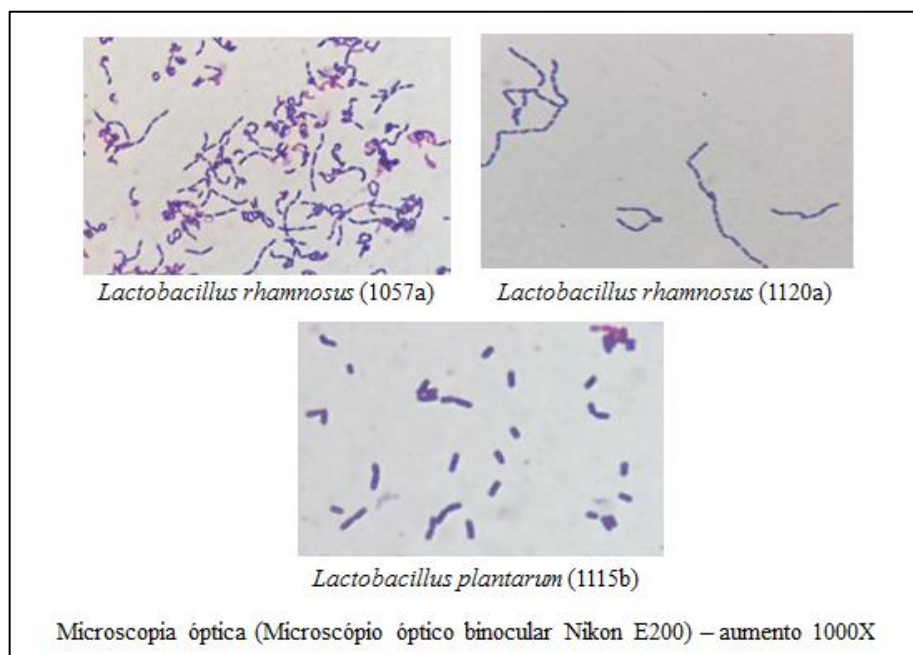
carbônico, etanol e peróxido de hidrogênio e *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos obrigatórios, que utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexose a ácido lático, ácido acético, etanol e gás carbônico (LAHTINEN et al., 2012).

#### 2.4.2 *Lactobacillus rhamnosus* (cepas 1057a e 1120a) e *Lactobacillus plantarum* (cepa 1115b)

As cepas 1057a, 1120a e 1115b foram isoladas de queijo de Coalho artesanal e são consideradas as mais adequadas para a incorporação na produção de queijo de Coalho, usando leite pasteurizado (BRUNO et al., 2016).

São bactérias em forma de bastonete (FIGURA 1), Gram-positivas, catalase-negativa e produtoras de ácido. As cepas são classificadas como fracas produtoras de ácido, em virtude do abaixamento lento do pH do meio durante a fermentação, sendo a cepa 1057a a mais acidificante e a 1115b a com menor potencial de acidificação dentre as três. As duas espécies de *Lactobacillus rhamnosus* apresentam crescimento satisfatório em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS), MRS suplementado com glicose, MRS suplementado com hidrolisado de caseína e MRS com glicose e hidrolisado de caseína, sendo consideradas cepas versáteis. A cepa de *Lactobacillus plantarum* é mais exigente que as demais quanto ao meio de cultivo, apresentando bom crescimento apenas em três dos quatro meios citados anteriormente (BRUNO et al., 2017).

**Figura 1:** Coloração de Gram das cepas bacterianas



Fonte: Elaborado pelo autor

As baixas atividades acidificante e proteolítica apresentadas pelas cepas são consideradas desejáveis na fabricação de queijo de Coalho. A baixa acidez desenvolvida por essas bactérias permite que o queijo de Coalho possa ser aquecido sem que ocorra o derretimento mantendo assim a integridade da sua forma, característica típica desse queijo (NIETO-ARRIBAS et al., 2009).

A cepa 1120a aumenta a viscosidade do leite quando inoculada nesse substrato e incubada a temperatura de 37°C. Além de crescerem bem à mesma temperatura, as três cepas são tolerantes a presença de sal e apresentam atividade antimicrobiana (BRUNO et al., 2017).

### **2.5 Condições para a produção de biomassa de *Lactobacillus***

Alguns dos aspectos importantes para a produção industrial de *Lactobacillus* estão relacionados com o próprio microrganismo, o custo dos substratos e nutrientes, e os processos utilizados na sua produção e recuperação. Além disso, são necessários parâmetros para otimização de escala e amplificação de sua produção. O processo fermentativo requer parâmetros de monitoramento do sistema de cultura em função do tempo de fermentação (PANCHENIAK, et al., 2012).

Os microrganismos são intensamente afetados pelas condições do meio onde se encontram e quatro fatores principais controlam o seu crescimento: a temperatura, o pH, a disponibilidade de água e o oxigênio (MADIGAN et al., 2016).

Os *Lactobacillus* são microrganismos que requerem uma elevada exigência nutricional, composta essencialmente por aminoácidos e vitaminas, dentre elas as do complexo B (FRANÇOISE, 2010). Man, Rogosa e Sharpe (MRS) é o meio de cultura mais comum para o cultivo de *Lactobacillus*, pois possui compostos específicos para o seu crescimento que normalmente não estão presentes em outros meios de cultura (XIMENES, et al., 2017).

A temperatura é um dos principais fatores que influenciam no crescimento das BAL. A taxa de crescimento depende das características do microrganismo utilizado, assim como das condições do ambiente. Quando a temperatura do meio se encontra fora da faixa requerida para um crescimento ótimo, a atividade microbiana é reduzida. Segundo Freire (2012) a temperatura ótima para crescimento é de 35°C a 40°C, para *Lactobacillus*. No entanto, eles também podem crescer em temperaturas mais elevadas (até 45°C).

A concentração do íon hidrogênio durante a fermentação influencia no crescimento dos microrganismos e na taxa de formação de produtos específicos. Algumas

pesquisas evidenciam que a produção de biomassa de *Lactobacillus* é satisfatória quando o pH é mantido entre 5,5 e 7,0 (MALEK et al., 2010; KUNTIYA, 2010).

Para o crescimento dos aeróbios é necessário promover uma intensa aeração forçada, enquanto que para anaeróbios o oxigênio precisa ser removido (MADIGAN et al., 2016). A taxa de oxigênio disponível no processo de cultivo pode ser controlada através da agitação em fermentadores. Alguns estudos apontam a velocidade de agitação variando entre 50 e 400 rpm para o crescimento de *Lactobacillus* (AGUIRREEZKAURIRIATZA et al., 2010; KUNTIYA et al., 2010; MALEK et al., 2010).

Para que a biomassa produzida em uma fermentação seja utilizada, ela deve ser separada do meio de cultivo, geralmente por centrifugação, e submetida a um processo de conservação. Algumas técnicas vêm sendo aplicadas para o estoque de culturas por períodos prolongados, como a secagem, o congelamento e a liofilização. A finalidade da preservação é manter as culturas em estado viável, sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas e assegurar sua completa estabilidade (MORIWAKI, 2009).

## **2.6 Processos fermentativos em biorreatores**

As fermentações realizadas em frascos agitados em *shaker* sofrem interferência pelo controle impreciso da temperatura e pela troca gasosa limitada. Não há nenhum controle do pH em frascos de agitação e em muitos casos, a cultura é alimentada uma única vez. Em contrapartida, nos processos fermentativos em biorreatores há o controle da temperatura, conseguido em recipientes de fermentação pela utilização da agitação do impulsor, uma camisa de aquecimento e um sensor inserido na dorna. Fermentadores de bancada geralmente fornecem também o monitoramento e o controle do pH através da adição de reagentes líquidos através de uma bomba. A aeração é conseguida através do sistema de agitação aliado a infusão de ar no meio de cultivo. O gás de saída do condensador fornece uma superfície fria de vapor no fluxo dos gases de escape para condensar, preservando assim o volume da cultura e densidade. Além disso, o sistema permite a alimentação da cultura ao longo do processo (OBOM; MAGNO; CUMMINGS, 2013).

Os processos fermentativos podem ser operados por diferentes formas; batelada simples, batelada alimentada, contínua e semi-contínua. Na batelada simples, é adicionada uma suspensão celular ao meio de fermentação e o processo é transcrito, sem adições de meio novo, nem retiradas de meio reacional durante o seu curso. A batelada simples é caracterizada por alterações nas condições ambientais no decorrer do processo; as

concentrações de nutrientes são reduzidas e as de células e produtos aumentadas, o que pode acarretar a inibição do crescimento celular (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A técnica de batelada alimentada é definida como um modo de operação onde um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao fermentador continuamente, sem que ocorra a retirada de material durante a operação. Na condução contínua, a alimentação com meio nutriente e a retirada de produto (meio fermentado) são realizadas continuamente. Sua principal vantagem está relacionada à operação do sistema por um maior período de tempo com aumento da produtividade. O processo de fermentação é denominado semi-contínuo quando ao final da fermentação ocorre a retirada de parte do meio fermentado para adição de meio nutriente em proporção equivalente, dando continuidade ao processo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Os biorreatores são os reatores químicos nos quais ocorre uma série de reações catalisadas por “biocatalisadores”, que podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais). Os cultivos em biorreatores são utilizados nos processos biotecnológicos para o aumento da escala produtiva de microrganismos, antibióticos, enzimas, hormônios, anticorpos, cultura de células e tecidos vegetais (AZAMBUJA, 2014; ANDRADE, 2013; VIEIRA, 2014). Há duas principais formas de realizar fermentações em biorreatores, a FSm (fermentação submersa) e a FES (fermentação com meio de cultura no estado sólido), sendo o primeiro mais utilizado em escala industrial (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

Na fermentação submersa (FSm), os microrganismos são cultivados em uma fase líquida, sob agitação e aeração específicas, e se multiplicam a partir do metabolismo de nutrientes do meio. Por outro lado, na fermentação com o meio de cultura no estado sólido (FES), o crescimento de microrganismos ocorre sobre partículas sólidas úmidas, sendo que a maior parte da água encontra-se adsorvida no substrato (LIMA, 2009b). Destes processos, a fermentação submersa em biorreatores é uma grande ferramenta para a otimização do crescimento microbiano (ALMEIDA, 2014).

Nos biorreatores, os processos fermentativos são controlados através da medição de alguns parâmetros como a temperatura, o pH, a aeração e a velocidade de agitação a fim de fornecer as melhores condições para o desenvolvimento do microrganismo. A temperatura é a variável mais frequentemente medida e seu intervalo de medida situa-se entre 0°C e 130°C. A medida e o controle da frequência de agitação são de fundamental importância para o controle do oxigênio dissolvido no meio de cultivo. O pH é frequentemente controlado devido a sua influência na atividade enzimática e no metabolismo microbiano, sendo medido

potenciometricamente por sondas esterilizáveis, que são uma combinação de eletrodos de vidro e de referência (BARRAL; LIMA, 2001).

A determinação de biomassa é um fator chave para o conhecimento e controle dos processos fermentativos, pois a concentração determina a velocidade de crescimento e formação de produtos. Todos os modelos matemáticos usados para descrever esses parâmetros contêm a biomassa como a variável de estado importante (BARRAL; LIMA, 2001).

O crescimento bacteriano apresenta quatro fases principais; a fase lag, a exponencial, a estacionária e a de declínio. A fase lag é conhecida como período de adaptação, onde ocorre intensa atividade metabólica, no entanto as células não se dividem. Na fase exponencial ou logarítmica há intensa divisão celular e máximo crescimento microbiano. Em seguida, vem à fase estacionária onde há uma redução de nutrientes disponíveis ou um aumento de produtos tóxicos que ocasionam a redução do crescimento e um equilíbrio entre o número de células novas e a quantidade de células que morrem. A fase final é a morte bacteriana, onde ocorre um declínio das células viáveis (LEVINSON, 2016).

As duas formas mais comuns para determinação do crescimento microbiano são a turbidimetria e a contagem de células viáveis. A primeira consiste em medir a turvação de uma suspensão microbiana que está relacionada à massa de microrganismos presente, comumente realizada através da leitura de absorvância em espectrofotômetro. A contagem de células viáveis é o método mais utilizado, no qual são realizadas diluições adequadas da suspensão e com inoculação de alíquotas em meio sólido. Após a incubação em temperatura e tempo previamente determinados, é realizada a contagem das colônias que cresceram (BORZANI, 2001).

### ***2.7 Redução dos custos de meios de cultura em processos fermentativos***

Substratos alternativos vêm sendo utilizados em fermentações a fim de reduzir os custos do processo. Alguns subprodutos da agroindústria são bastante apropriados para esse fim, pois são fontes de carbono e nitrogênio e ricos em vitaminas e minerais (HONORATO et al., 2007). Os substratos utilizados como meios de cultivo devem ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo e a sua composição capaz de suprir as necessidades do mesmo (ANDRADE, 2013).

Os nutrientes ideais para a composição dos meios de cultura para o cultivo de BAL estão presentes na composição do meio MRS. No entanto, por razões econômicas, em escala industrial são utilizados substratos complexos de composição variável, subprodutos de

outros processos industriais. Esses substratos são adaptados para o cultivo por meio de processos de extração, suplementação e balanceamento da sua composição visando aumentar o rendimento da produção do microrganismo selecionado. Uma alternativa ao meio MRS é o soro de tofu, um resíduo originado na fabricação de “queijos” de soja, que é utilizado como substrato na fermentação de *Lactobacillus plantarum* e obtenção de exopolissacarídeos (AZAMBUJA, 2014).

A milhocina é a água de maceração de milho, um resíduo resultante da produção de milho cultivado em grande parte do mundo. É uma fonte potencialmente útil de nitrogênio empregada com sucesso em fermentações de *Lactobacillus rhamnosus* para a produção de ácido lático (OLIVEIRA, 2011). Além de importante fonte de nitrogênio para muitos processos biotecnológicos, a milhocina é rica em vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas (HENKEL et al., 2012; MADDIPATI et al., 2011).

O soro de leite, também chamado de “lactossoro”, é o subproduto resultante da fabricação de queijo e agrega em torno de 60% do valor nutricional do leite, significando que o soro é um resíduo de alta qualidade nutricional, mas que também pode ser aproveitado como substrato para aplicações industriais (GUIMARÃES et al., 2010). O soro lácteo suplementado vem sendo utilizado em pesquisas para a produção de biomassa de *Lactobacillus rhamnosus* (LAVARI et al., 2015; LIMA, et al., 2014), bem como para a produção de etanol (ANDRADE; NETO; LOPES, 2015).

Um dos grandes desafios no cultivo de microrganismos em grande escala é o custo dos reagentes químicos necessários para a formulação dos meios de cultivo. Assim, meios simplificados de baixo custo se apresentam como uma saída para produção de biomassa.



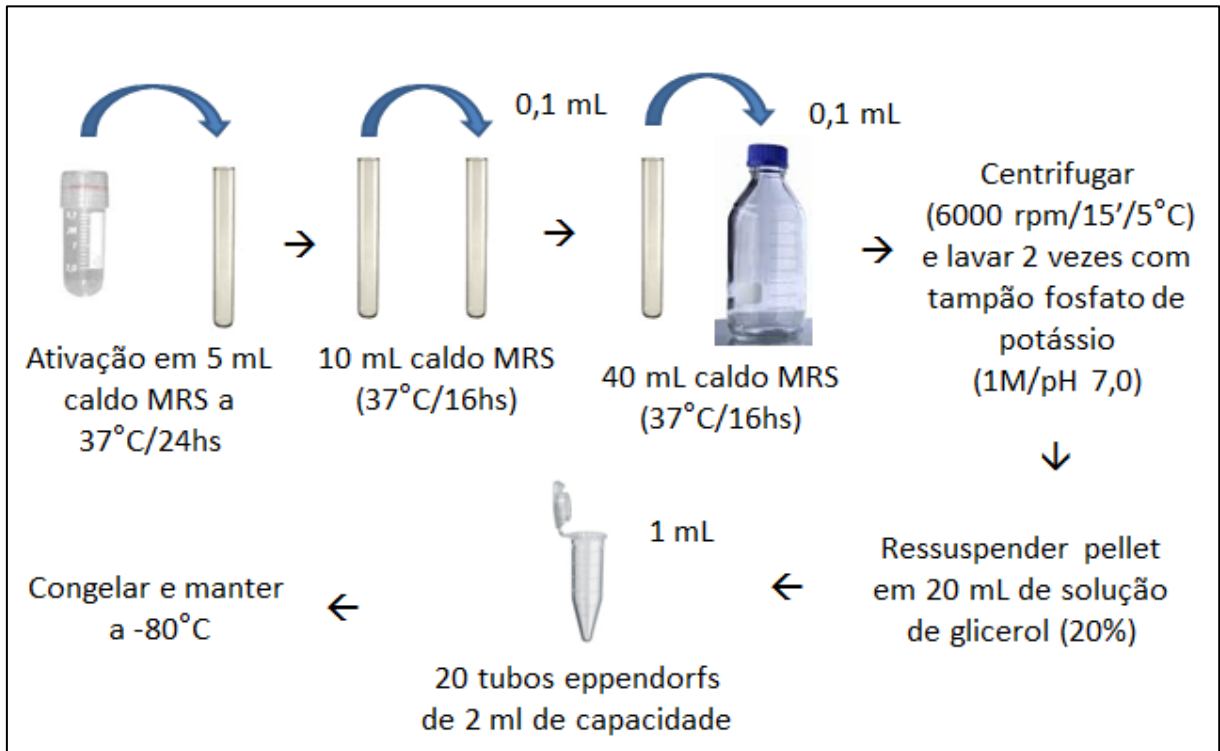
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas de bactérias ácido lácticas

Foram utilizadas três diferentes cepas de *Lactobacillus*, sendo dois *Lactobacillus rhamnosus* (cepas 1057a e 1120a) e um *Lactobacillus plantarum* (cepa 1115b). Essas bactérias foram isoladas de queijos de Coalho artesanais produzidos com leite cru e estão depositadas na Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agroindústria, da Embrapa Agroindústria Tropical, armazenadas a - 80°C. A cepa 1120a foi testada para todos os parâmetros no biorreator (BioFlo®/CelliGen®115, New Brunswick Cientific) de 3 L com volume de trabalho de 2 L. As cepas 1057a e 1115b foram submetidas às fermentações com controle de pH, utilizando os melhores parâmetros de fermentação para cepa 1120a.

#### 3.2 Preparação da cultura estoque de armazenamento

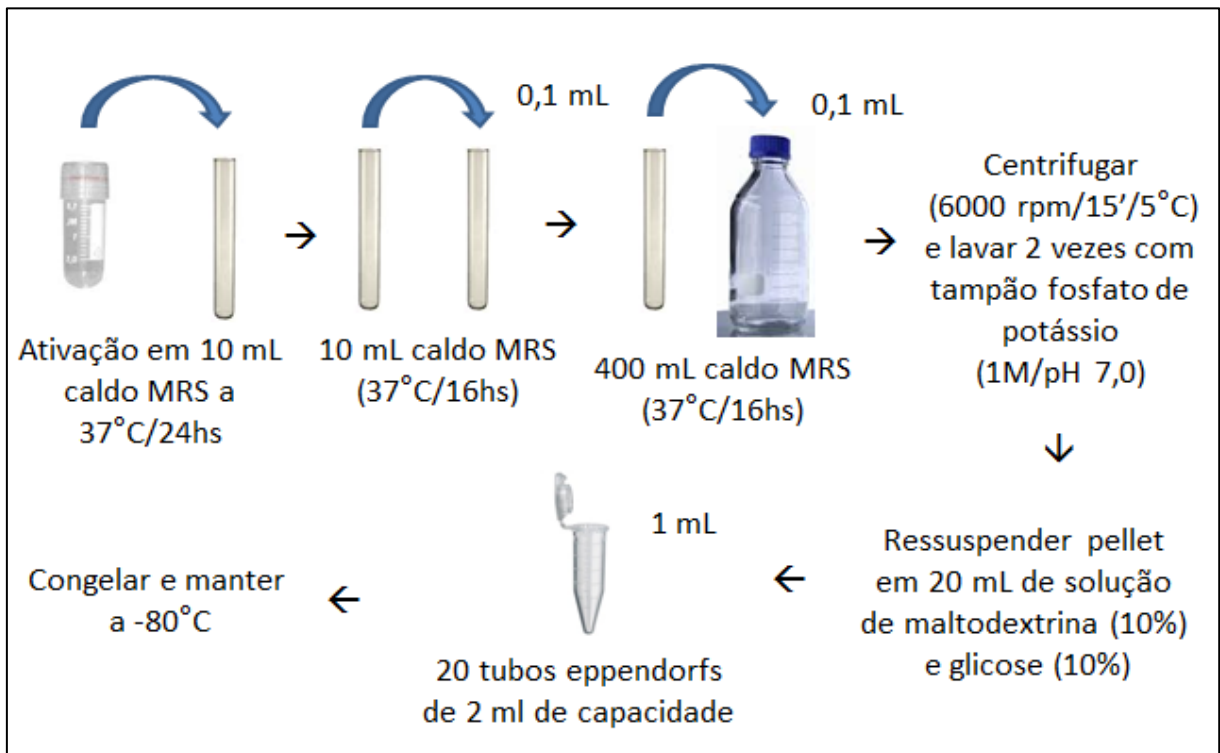
A cepa foi ativada em 5 mL de caldo MRS a 37°C por 24 horas. Uma alíquota (0,1 mL) foi retirada e inoculada em tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS e incubada a 37°C por 16 horas. Em seguida, 0,1 mL da cultura foi inoculado em 40 mL de caldo MRS e incubado a 37°C por 16 horas. Então, a cultura foi centrifugada (6000 rpm, 15 minutos, 5°C) e lavada duas vezes com solução tampão fosfato de potássio (1M, pH 7,0). Após a última centrifugação, a massa de células foi ressuspensa em 20 mL de uma solução de glicerol (20%). Alíquotas (1 mL) desse volume foram distribuídas em tubos eppendorfs de 2 mL de capacidade e armazenadas a temperatura de -80°C. Foi preparado um estoque para cada cepa (FIGURA 2).

**Figura 2:** Cultura estoque de armazenamento

Fonte: Vinderola et. al. (2000)

### 3.3 Preparação da cultura estoque de trabalho

A cultura estoque de armazenamento foi descongelada e ativada em 10 mL de caldo MRS (37°C/ 24 horas). Uma alíquota (0,1 mL) foi retirada e inoculada em tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS e incubada a 37°C por 16 horas. Em seguida, 0,1 mL da cultura foi inoculado em 400 mL de caldo MRS e incubado a 37°C por 16 horas. Então, a cultura foi centrifugada (6000 rpm, 15 minutos, 5°C) e lavada duas vezes com solução tampão fosfato de potássio (1M, pH 7,0). Após a última centrifugação, a massa de células foi ressuspensionada em 20 mL de uma solução de maltodextrina (10%) e glicose (10%). Alíquotas (1 mL) desse volume foram distribuídas em tubos eppendorfs de 2 mL de capacidade e congeladas a temperatura de -80°C para uso posterior (FIGURA 3).

**Figura 3:** Cultura estoque de trabalho

Fonte: Vinderola et. al. (2000)

### 3.4 Contagem de células viáveis

Antes do congelamento do estoque foi realizada a contagem de células viáveis de cada cepa. Foram plaqueadas as diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  em ágar MRS. E a incubação realizada a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Após esse período, foi realizada a contagem das placas que apresentaram crescimento entre 30 e 300 colônias e o resultado foi expresso em UFC/mL. A contagem de células viáveis também foi realizada em amostras recolhidas (10 mL) durante o processo de fermentação no biorreator nos tempos 0, 24 e 48 horas. Foram plaqueadas as diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  no tempo zero hora e nos demais tempos as diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ . As placas foram incubadas em BOD a 37°C por 48 horas em anaerobiose.

### 3.5 Elaboração da curva de crescimento das cepas

Para a construção da curva de crescimento foi elaborada uma curva padrão para cada cepa (Anexo A). Para a elaboração da curva de crescimento foram determinados 8 pontos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 e 48 horas. Para cada ponto foram inoculados 100  $\mu$ L da cultura estoque em frascos de 250 mL contendo 100 mL de caldo MRS, totalizando 8 frascos. A incubação foi realizada em *shaker* (Incubadora Tecnal TE-240) a 37°C sob agitação de 150 rpm por 48 horas e a cada tempo determinado uma amostra foi recolhida da fermentação. A

cultura foi centrifugada (Centrífuga Excelsa II Mod 206 BL Fanem) a 3500 rpm por 15 minutos, lavada com água destilada, homogeneizada em vortex e ressuspensa em 20 mL de água destilada. Esse procedimento foi repetido por duas vezes e a terceira ressuspensão realizada em volume aleatório escolhido a partir da quantidade de massa de células resultante da centrifugação. Foi transferido 1 mL da ressuspensão para balão volumétrico escolhido aleatoriamente a fim de propiciar a leitura em espectrofotômetro (UV Visible Spectrophotometer 50 Conc Cary) com comprimento de onda de 600 nm de modo que os valores das leituras se enquadrassem dentro do intervalo (leitura mínima e máxima) obtido na curva padrão. A concentração da biomassa foi determinada pela equação descrita abaixo e os dados das concentrações de biomassa foram colocados no programa Origin 8.0 para a construção dos gráficos.

$$C \text{ (g/L)} = \text{abs} \times f \times d \quad (1)$$

### ***3.6 Preparação do inóculo***

A cultura estoque de trabalho (100 µL) foi transferida para frasco de 250 mL contendo 100 mL de caldo MRS esterilizado e incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Esse cultivo foi utilizado como inóculo, e transferido (proporção de 1%) para o biorreator (BioFlo®/CelliGen®115, New Brunswick Cientific) em dornas de 3 L com volume de trabalho de 2 L. Para cada fermentação foi preparado um inóculo.

### ***3.7 Influência da agitação na produção de biomassa***

Para avaliar a influência da agitação na produção da biomassa foram realizadas duas diferentes fermentações, conduzidas em duplicata, sendo um processo com o uso de defletores e outro sem. Em ambos os processos foram utilizados os seguintes parâmetros: velocidade de agitação 150 rpm, temperatura 37°C, tempo 48 horas, aeração de 1 v.v.m (volume de ar por volume de meio), em meio MRS sintético, pH inicial do meio 6,5, não controlado no decorrer do processo. Foram retiradas alíquotas de 10 mL e 30 mL em tubos Falcon para determinação do número de células viáveis e concentração de biomassa (g/L), respectivamente. As alíquotas foram coletadas nos tempos; 0, 18, 24, 42 e 48 horas, determinados a partir do comportamento das cepas observados nas curvas de crescimento elaboradas para cada uma.

### ***3.8 Influência da aeração na produção de biomassa em biorreator***

A influência da aeração foi avaliada pela variação da aeração na superfície do meio ou pela injeção de ar em profundidade. As fermentações foram realizadas em duplicata, de acordo com os seguintes parâmetros: aeração de 1 v.v.m.; temperatura de 37°C, tempo 48 horas, meio MRS sintético, pH inicial do meio 6,5 não controlado no decorrer do processo. Foram retiradas alíquotas de 10 mL e 30 mL em tubos Falcon para a determinação de células viáveis e concentração de biomassa (g/L), respectivamente. As alíquotas foram coletadas nos tempos; 0, 18, 24, 42 e 48 horas.

### **3.9 Avaliação do meio de cultura na produção de biomassa**

Após a definição das condições de agitação e aeração, um novo ensaio (duplicata) foi realizado substituindo o meio de cultura MRS sintético por um caldo MRS simplificado, cujas formulações estão descritas na Tabela 1. Alíquotas de 10 mL e 30 mL em tubos Falcon foram recolhidas nos tempos 0, 18, 24, 42 e 48 horas para determinação de células viáveis e da concentração de biomassa em g/L, respectivamente (RACINE; SAHA, 2007).

**Tabela 1:** Formulações dos meios de cultura MRS sintético e simplificado

COMPONENTES	MEIOS DE CULTURA	
	MRS sintético	MRS simplificado
Glicose	20 g/L	10 g/L
Peptona	10 g/L	10 g/L
Extrato de carne	10 g/L	-
Extrato de levedura	10 g/L	5 g/L
Citrato de amônio	2 g/L	2 g/L
Acetato de sódio	5 g/L	-
Sulfato de magnésio	0,2 g/L	2 g/L
Fosfato dipotássico	2 g/L	-
Twen 80	1 mL/L	-

Fonte: Elaborado pelo autor

### **3.10 Influência do pH na produção de biomassa em biorreator**

Com base no pH do meio determinado ao final da fermentação em MRS, foram estabelecidos três valores de pH, 4,7; 5,2 e 5,7, para controle do processo. O controle foi realizado por meio da adição de solução de NaOH 1N. A fermentação foi conduzida a temperatura constante de 37°C, sob agitação de 150 rpm por 24 horas, em meio MRS simplificado com pH ajustado e aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e sem defletores. Alíquotas de 10 mL e 30 mL foram recolhidas em tubos Falcon nos tempos 0, 16, 20 e 24 horas para determinação de células viáveis e concentração de biomassa, respectivamente. Nesses ensaios o tempo de fermentação foi reduzido em virtude dos primeiros resultados

obtidos nas fermentações com tempo total de 48 horas. Os ensaios de controle do pH para a produção de biomassa foram realizados separadamente para cada cepa, em duplicata.

### ***3.11 Concentração de biomassa***

Uma alíquota de 20 mL foi retirada das amostras recolhidas (30 ml) nos tempos 0, 18, 24, 42 e 48 horas. Esse volume foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos, lavado com água destilada e homogeneizado em vortex. Em seguida foi ressuspensado em 20 mL de água destilada, submetido a nova centrifugação. A segunda ressuspensão foi realizada em balão volumétrico apropriado escolhido de acordo com a quantidade de massa de células obtida. Foi retirada uma alíquota de 1 mL da ressuspensão e transferida para um balão volumétrico aleatório a fim de obter uma leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm dentro do intervalo (leitura mínima e máxima) obtido na curva padrão. A água destilada foi utilizada como branco. Foi realizada a determinação do pH do sobrenadante descartado após a primeira centrifugação. A concentração da biomassa foi determinada segundo equação (1) e os dados das concentrações de biomassa foram colocadas no programa Origin 8.0 para a construção dos gráficos.

### ***3.12 Determinação do pH***

O sobrenadante da primeira centrifugação das amostras utilizadas na determinação da biomassa teve seu pH aferido em potenciômetro (Calibration Check pH HI222, Hanna Instruments) conforme metodologia descrita por Lutz (2008).

### ***3.13 Análise de açúcar***

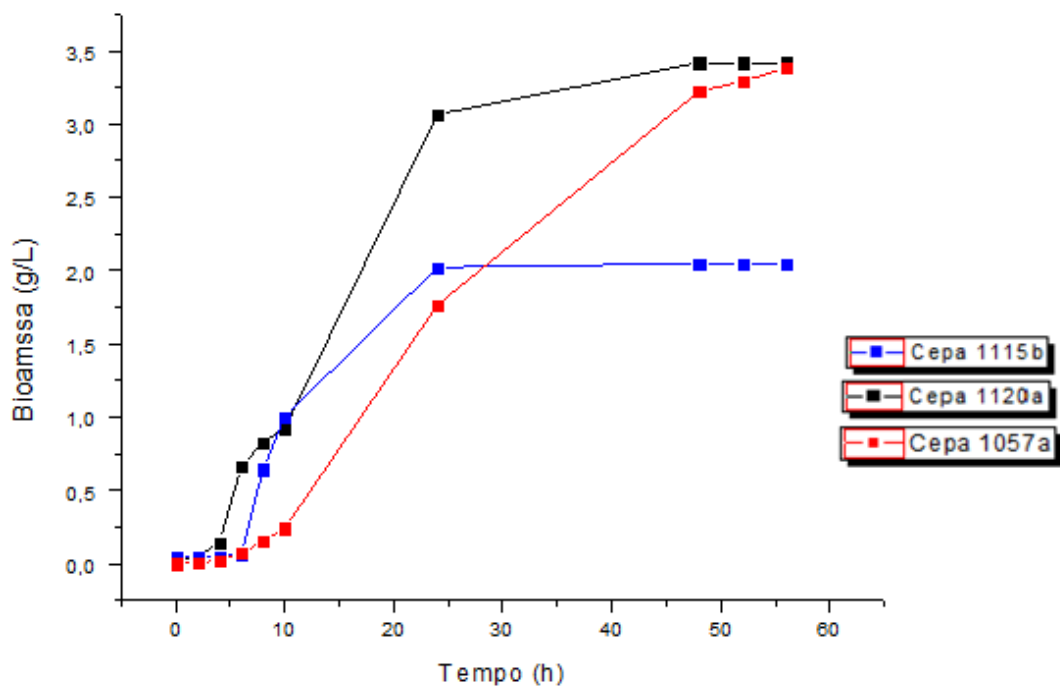
A determinação de açúcar redutor total foi realizada pelo método do DNS (MILLER, 1959) nos tempos 0 e 48 horas da fermentação, utilizando o sobrenadante da primeira centrifugação das amostras recolhidas para determinação de biomassa. Um volume de 0,5 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) foi adicionado a 1 mL do sobrenadante diluído (1:100). O controle foi realizado com 1 mL de água destilada (branco). Os tubos de ensaio foram levados ao Banho Maria a 100°C por 15 minutos e após esse período resfriados. Foi adicionado a cada tubo 4 mL de água destilada e após homogeneização em vortex, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. As análises foram realizadas em triplicata nas fermentações com controle de pH tanto nas que usaram MRS, como MRS simplificado como meio de cultivo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cultivo em shaker

As cepas 1120a, 1057a e 1115b foram cultivadas a 37°C sob agitação (150 rpm) em *shaker* durante 48 horas. Após 24 horas de cultivo as cepas 1120a e 1115b entraram na fase estacionária de crescimento, na qual praticamente não ocorreu incremento na quantidade de biomassa produzida (g/L). Por outro lado, a cepa 1057a só entrou na fase estacionária após 48 horas de cultivo (FIGURA 4). Com base nesse comportamento das cepas foi estabelecido 48 horas como o tempo máximo de fermentação.

**Figura 4** – Curva de crescimento de biomassa das cepas de *Lactobacillus rhamnosus* 1120a e 1057a e de *Lactobacillus plantarum* 1115b, em *shaker* a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm)



Fonte: Elaborado pelo autor

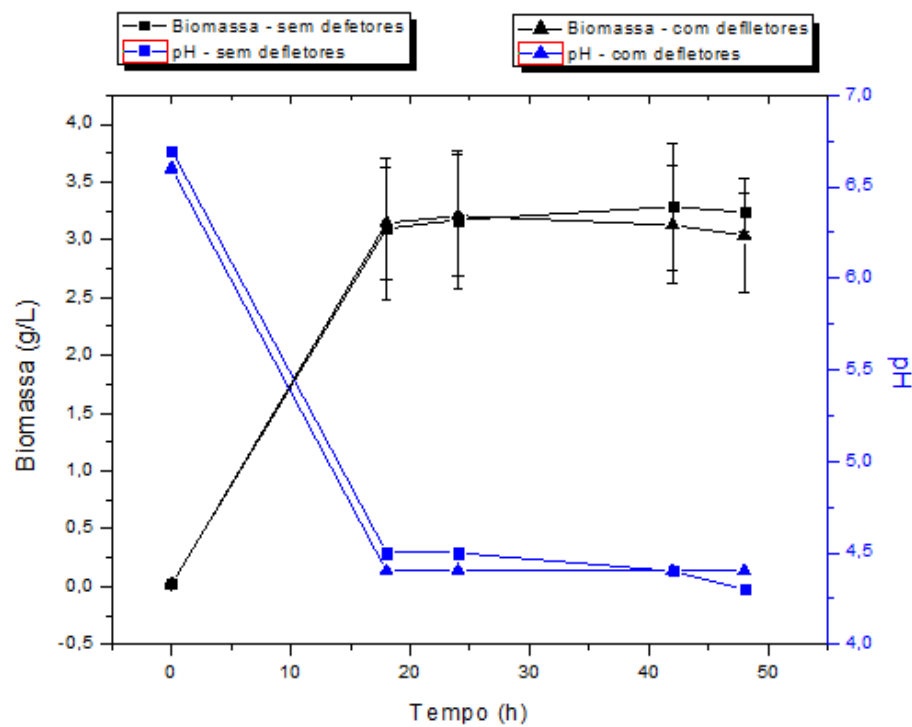
### 4.2 Produção de biomassa em biorreator

A cepa 1120a foi cultivada em biorreator de 3L, utilizando 2L de MRS como volume de trabalho, a temperatura de 37°C, agitação de 150 rpm, aeração de 1 v.v.m na superfície do meio, com e sem a utilização de defletores. Os defletores são peças internas inseridas nas dornas, que auxiliam na turbulência do meio e incorporação de oxigênio ao

mesmo. A biomassa produzida no ensaio sem defletores foi 3,1 g/L e de 3,2 g/L, na batelada com defletores, após as primeiras 24 horas de fermentação (FIGURA 5).

Durante a fermentação foi observado que houve uma queda do pH de  $6,5 \pm 0,2$  (pH do meio MRS) para 4,4 após 24 horas, devido a produção de ácido lático pela célula. A cepa 1120a apresentou um comportamento de crescimento semelhante ao do cultivo em *shaker*.

**Figura 5** – Produção de biomassa da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1120a, em meio MRS, no biorreator com e sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio

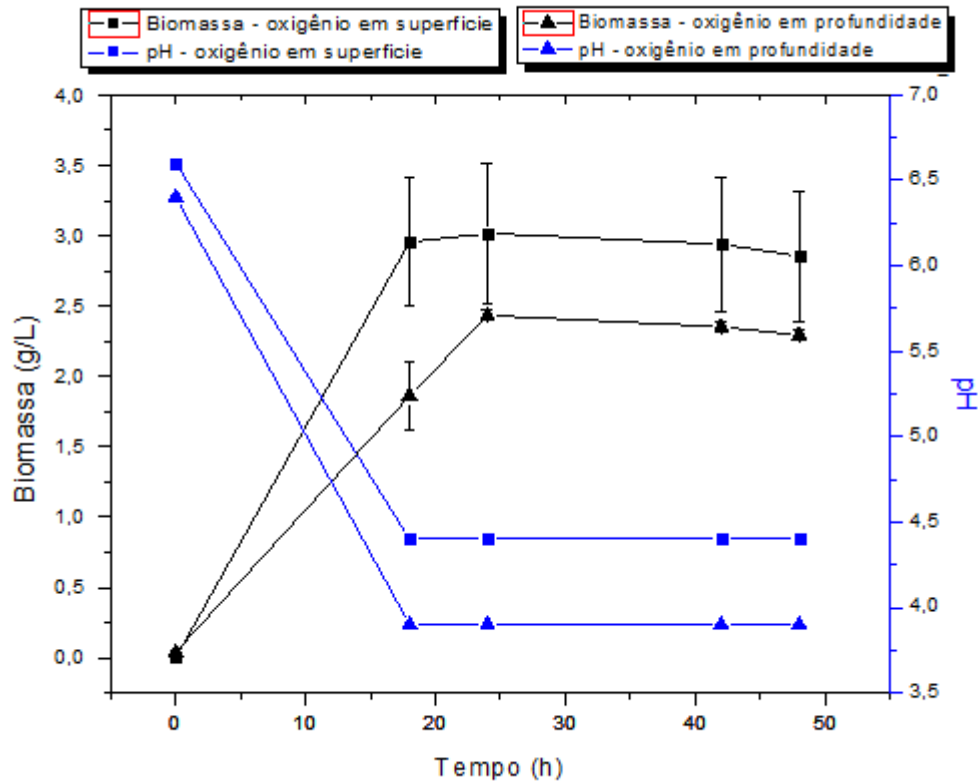


Fonte: Elaborado pelo autor

A influência da aeração foi avaliada pela variação da aeração na superfície do meio e pela injeção de ar em profundidade. A cepa 1120a apresentou produção de biomassa de 3,2 g/L e 2,4 g/L quando o oxigênio foi inserido na superfície do meio e em profundidade, respectivamente, após 24 horas de fermentação (FIGURA 6). Quando o oxigênio foi inserido no fundo da dorna foi observado um declínio maior do pH nas primeiras 24 horas de fermentação, o que justifica a quantidade menor de biomassa produzida.



**Figura 6** – Produção de biomassa da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1120a, em meio MRS, no biorreator com defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e em profundidade



Fonte: Elaborado pelo autor

Os cultivos aeróbicos e respiratórios fornecem benefícios para algumas bactérias ácido láticas. As vias aeróbica e respiratória foram investigadas em *Lactobacillus lactis* (LECHARDEUR et al. 2011; PERDERSEN et al., 2015) *Lactobacillus plantarum* (ZOTTA et al., 2014), e alguns membros do grupo de *Lactobacillus casei* (IANNIELLO et al., 2015). As cepas melhoraram tecnologicamente, produzindo mais biomassa e apresentando uma maior resposta ao estresse.

Ianniello et al. (2016) ao investigar a influência do oxigênio no crescimento da cepa de *Lactobacillus casei* N87 em biorreator de 3 L a 37 ° C por 24 horas e utilizando 1% de inóculo, observou que a utilização de injeção de oxigênio combinada com a suplementação do meio de cultura contribuiu para uma maior produção de biomassa (5,28 g/L) quando comparada com o processo em anaerobiose (4,06 g/L).

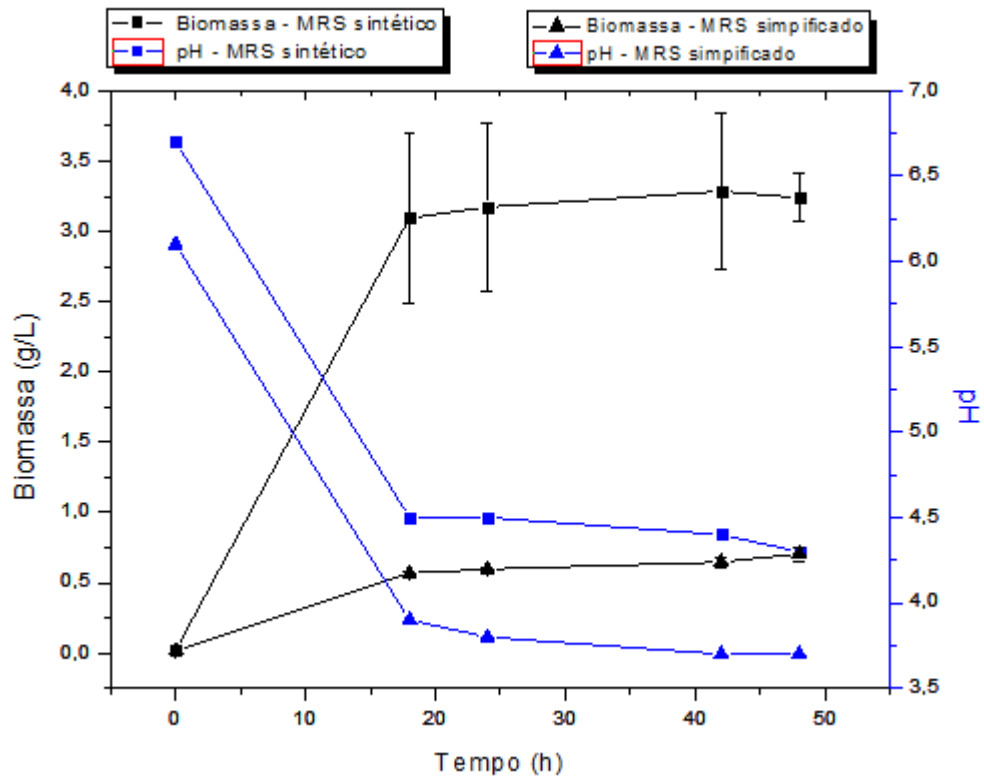
Zotta et al. (2012) em sua pesquisa para avaliar a influência da aeração sobre o crescimento de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 e a sua tolerância ao estresse observou que a

produção de biomassa nos processos aeróbio e anaeróbio foi de 3,4 g/L e 3,1 g/L e não apresentaram diferença significativa. No entanto, as células cultivadas em aerobiose foram significativamente mais resistentes quando submetidas ao calor, ao estresse oxidativo e ao armazenamento a frio em tampão com nutrientes esgotados. Esse fato representa um importante avanço tecnológico para a produção de probióticos e culturas adjuvantes contendo esta espécie, uma vez que as células apresentaram maior resistência quando submetidas ao processo de secagem (PEIGHAMBARDOUST et al., 2011).

A composição do meio, bem como as condições de cultivo, é essencial para o crescimento do microrganismo. Alguns meios de cultura formulados com substratos alternativos apresentaram bons resultados para o desenvolvimento de BAL. Foram realizados ensaios com substituição do MRS sintético pelo MRS simplificado, um meio de cultura formulado em laboratório a partir de glucose, extrato de levedura, peptona, citrato de amônia e sulfato de manganês. Comparado ao MRS, ele é um meio mais simples, com menor teor de nutrientes, porém economicamente mais viável.

A cepa 1120a foi cultivada em biorreator utilizando 2L de MRS simplificado a temperatura de 37°C, aeração de 1 v.v.m na superfície do meio, sem a utilização de defletores e agitação de 150 rpm. A produção de biomassa no meio de cultura de menor custo foi de 0,5 g/L nas primeiras 24 horas de fermentação e 0,7 g/L ao final do processo. Nos ensaios com o MRS simplificado, o pH inicial do meio ( $6,5 \pm 0,2$ ) sofreu uma redução após a adição do inóculo para  $6,0 \pm 0,2$  (FIGURA 7). Esse fato pode ser explicado pela ausência de um agente tamponante na sua formulação. A fermentação inicia com pH menor e conseqüentemente, após 24 horas de fermentação, o pH sofre uma maior queda quando comparado aos ensaios com MRS sintético.

**Figura 7** – Produção de biomassa da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1120a, em meio MRS sintético e simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio



Fonte: Elaborado pelo autor

Krzywonos e Eberhard (2011) constataram que a combinação de vinhaça de trigo, melão de beterraba e extrato de levedura influenciou positivamente o cultivo de bactérias produtoras de ácido láctico. Outro meio utilizado para o cultivo de *Lactobacillus plantarum* foi o caldo de cana-de-açúcar suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônia. O crescimento dessa cepa nesse meio foi considerado satisfatório, com contagens finais de  $10^8$  UFC/mL (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2013). Valores semelhantes foram encontrados nesse trabalho após 24 horas de fermentação. Em meio MRS simplificado e sintético a cepa 1120a apresentou contagens de  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL, respectivamente.

A detecção de carboidratos durante o processo fermentativo é importante para se avaliar a velocidade de consumo dessas fontes de carbono e o quanto de açúcar deixou de ser fermentado. (NEGRULESCU et al., 2012). O consumo de açúcar da cepa 1120a nas fermentações nos dois meios de cultura utilizados pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2** – Teor de açúcar nos meios MRS e MRS simplificado no início e final do processo de fermentação para a produção de biomassa da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1120a, no biorreator a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm) e com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio.

Meio	Açúcar (g/L)		Y <sub>x/s</sub>
	Inicial	Final	
<b>MRS sintético</b>	22,68 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,15 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,17
<b>MRS simplificado</b>	10,52 ± 0,31 <sup>b</sup>	3,50 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,10

Fonte: Elaborado pelo autor

<sup>a,b</sup>. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na mesma coluna, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05).

A menor produção de biomassa no meio MRS simplificado pode ser explicada pela menor proporção de açúcar presente nesse meio no início da fermentação. No MRS sintético 82% do açúcar inicial foi consumido no processo de fermentação, enquanto no MRS simplificado esse valor foi de 67%. Apesar de o MRS simplificado possuir uma quantidade de açúcar inicial 50% menor, a cepa 1120a apresentou um bom consumo e aproveitamento desse nutriente ao longo da fermentação, uma vez que o açúcar residual ao final do processo não apresentou diferença significativa (p≤0,05) quando comparados os dois meios de cultura. Após 48 horas de fermentação, os ensaios realizados na cepa 1120a mostraram que, a melhor taxa de conversão do substrato (Y<sub>x/s</sub> - conversão estequiométrica de glicose em biomassa), com maior concentração de biomassa ocorreu quando o meio MRS sintético foi utilizado na fermentação.

Um meio de cultura semelhante ao MRS simplificado foi utilizado por Hwang et al. (2015) em sua pesquisa com *Lactobacillus acidophilus* com volume de trabalho de 10 mL em frascos de 50 mL, agitação de 150 rpm e inóculo de 1%. Com o meio composto por glicose (10 g/L), extrato de levedura (10 g/L), peptona de soja (10 g/L), citrato de amônia (2 g/L) e sulfato de magnésio (0,2 g/L), com o diferencial da presença de acetato de sódio (5 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L) e suplementação com xarope de milho (10 ml/L) eles obtiveram uma produção máxima de biomassa de 4,54 g/L (peso seco).

Berecka (2011) determinou que a composição média ótima para o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* é de glicose (15,44 g/L), piruvato de sódio (3,92 g/L), extrato de carne (8,0 g/L), fosfato de potássio (1,88 g/L), acetato de sódio (4,7 g/L) e citrato de amônia (1,88 g/L). O extrato de carne e os sais (fosfato de potássio, acetato de sódio e citrato de

amônia) quando adicionados na composição do meio apresentam bom rendimento em biomassa (15 g/L em peso seco). O rendimento da biomassa é significativamente maior (24 g/L em peso seco) ao aplicar uma fonte mista de carbono, glicose e piruvato de sódio, que é o substrato preferido para o crescimento desse microrganismo.

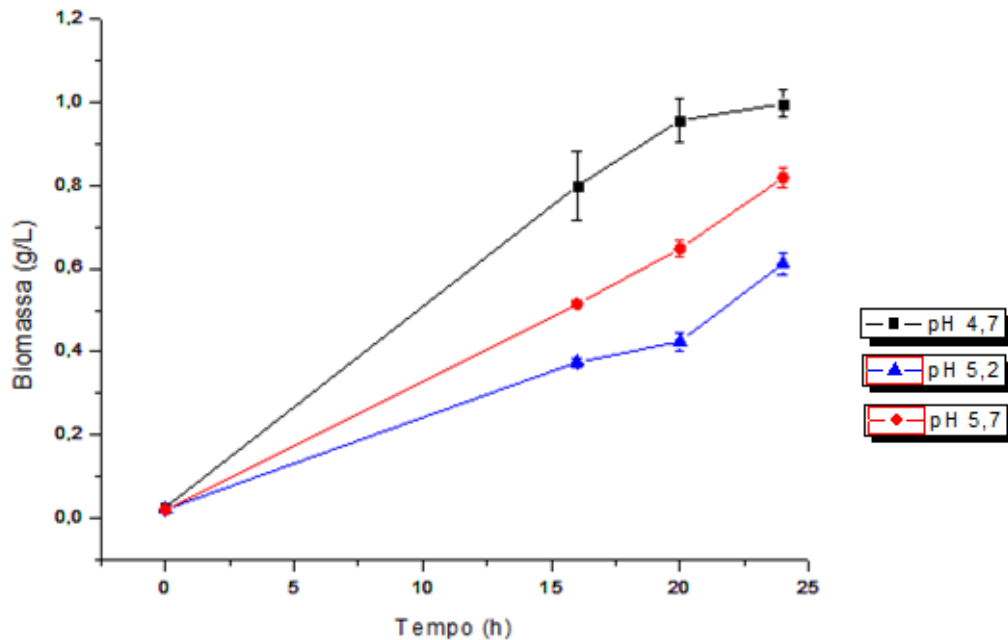
Racine e Saha (2007) em seu estudo para produção de manitol por *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 em fermentações descontínua e contínua, utilizaram o MRS simplificado como meio para a preparação dos inóculos. Em biorreator, utilizando um volume de trabalho de 2L de meio contendo licor de milho e glicose como fontes industriais de nutrientes baratas, suplementadas com uma pequena quantidade de peptona e manganês de soja e obtiveram 4,0 g/L  $\pm$  0.2 após 17 horas de fermentação alimentada conduzida sob agitação de 130 rpm, temperatura de 37° e controle do pH em 5,0.

#### **4.3 Produção de biomassa em biorreator com pH controlado**

O crescimento do *Lactobacillus sp.* é inibido pelo ácido lático produzido, sendo o principal desafio da engenharia de produção de biomassa por bactérias lácticas contornar essa inibição. Uma das estratégias utilizadas é o controle do pH por meio da adição de um neutralizante (AGUIRREEZKAURIATZA et al., 2010).

No início da fermentação, o pH do meio era 6,0, após 16 horas, quando o pH estava em 4,7 foi iniciado o seu controle por meio da adição de solução de NaOH 1 N. Nos ensaios realizados com o MRS simplificado, no qual o pH foi controlado em 4,7, a produção de biomassa foi de 0,9 g/L em 24 horas de fermentação (FIGURA 8). Isso representa aumento de 0,4 g/L, respectivamente, quando comparado com os resultados obtidos nas primeiras 24 horas de fermentação no meio MRS simplificado sem controle do pH (0,5 g/L).

**Figura 8** – Produção de biomassa da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1120a, em meio MRS simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm), com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7



Fonte: Elaborado pelo autor

Quando o controle de pH foi realizado no valor de 5,2, também após 16 horas de fermentação foi observado um pequeno período de adaptação das células entre os tempos 16 e 20 horas. Após as 24 horas de fermentação a quantidade de biomassa produzida foi a mesma dos ensaios em que o controle do pH não foi realizado (0,6 g/L). Quando a fermentação foi realizada com o controle do pH em 5,7 a biomassa final obtida foi de 0,8 g/L. Nesse ensaio podemos observar um crescimento contínuo da cepa durante as 24 horas de fermentação. A biomassa inicial encontrada nas duas dornas foi de 0,02 g/L. Assim como nos demais controles da fermentação para essa cepa, o pH inicial foi 6,0.

Dentre os três controles de pH utilizados na fermentação em biorreator para a cepa 1120a (*Lactobacillus rhamnosus*), o que apresentou a melhor produção de biomassa foi o controle em pH 4,7. Durante esse processo fermentativo o valor máximo de biomassa produzido foi de 1,0 g/L. Ao comparar essa produção com as fermentações realizadas sem o controle do pH com o mesmo meio (MRS simplificado) observou-se um aumento de 0,4 g/L

em 24 horas de fermentação. No entanto, a quantidade de biomassa final não representou 50% da produzida em meio MRS sintético (3,2 g/L).

Após 24 horas de fermentação, os ensaios realizados na cepa 1120a mostraram que, a melhor taxa de conversão do substrato ( $Y_{x/s}$  - conversão estequiométrica de glicose em biomassa), com maior concentração de biomassa e melhor consumo do substrato foram obtidas quando o controle do pH foi realizado em 4,7. O açúcar residual total ( $3,1 \pm 0,2$ ) nesse pH foi significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) e o coeficiente de conversão do substrato em biomassa superior (0,14) quando comparado aos demais controles (TABELA 3). Verificou-se também um aumento no aproveitamento do açúcar pela cepa quando foi realizado o controle do pH durante a fermentação. Nos ensaios sem controle do pH em meio MRS simplificado o aproveitamento de açúcar pela cepa 1120a foi de 67%, enquanto que em pH controlado em 4,7, 5,2 e 5,7 foi de 70%, 69% e 75%, respectivamente.

**Tabela 3** – Valores da concentração de biomassa final, do açúcar residual total e do fator de conversão do substrato em biomassa após 24 horas de fermentação em meio MRS simplificado e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7 para as cepas 1120a, 1057a e 1115b.

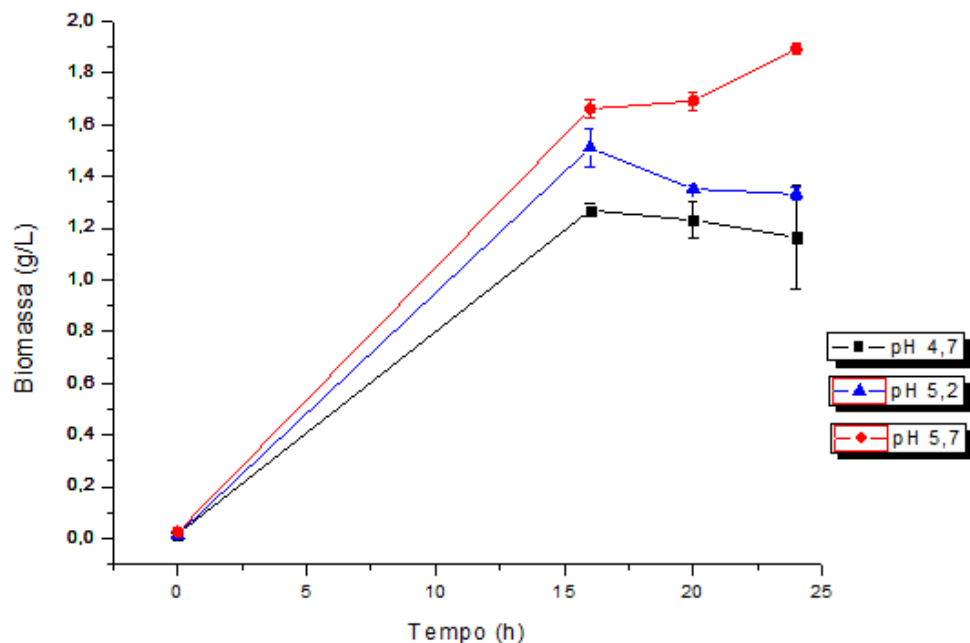
Cepas	pH de controle	X (g/L)	Açúcar residual total (g/L)	$Y_{x/s}$
<b>1120a</b>	4,7	$0,9 \pm 0,03$	$3,1 \pm 0,20$	0,14
	5,2	$0,6 \pm 0,02$	$3,9 \pm 0,07$	0,06
	5,7	$0,8 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,15$	0,08
<b>1057a</b>	4,7	$1,1 \pm 0,19$	$2,8 \pm 0,15$	0,12
	5,2	$1,3 \pm 0,02$	$2,7 \pm 0,27$	0,13
	5,7	$1,9 \pm 0,02$	$2,6 \pm 0,16$	0,21
<b>1115b</b>	4,7	$1,0 \pm 0,03$	$3,8 \pm 0,02$	0,13
	5,2	$0,9 \pm 0,09$	$2,7 \pm 0,04$	0,08
	5,7	$1,1 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,46$	0,09

Fonte: Elaborado pelo autor

As cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (1057a) e *Lactobacillus plantarum* (1115b) foram cultivadas em biorreator nos mesmos parâmetros utilizados para a cepa 1120a, a fim de verificar o seu desempenho nos diferentes controles de pH em meio MRS simplificado. A cepa 1057a (*Lactobacillus rhamnosus*) apresentou o melhor desempenho na produção de biomassa em biorreator com a utilização do caldo MRS simplificado quando comparada com

as demais cepas. Quando o pH de 4,7 foi utilizado como controle, a produção de biomassa foi de 1,2 g/L nas primeiras 24 horas (FIGURA 9). Com o controle do pH em 5,2 a produção de biomassa foi 1,5 g/L após 16 horas de fermentação. A biomassa final quando o processo foi controlado em pH 5,7 foi de 1,9 g/L. Esse valor foi a maior quantidade de biomassa obtida dentre todos os ensaios realizados com essa e as demais cepas.

**Figura 9** – Produção de biomassa da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1057a, em meio MRS simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm), com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7



Fonte: Elaborado pelo autor

O açúcar total residual obtido por essa cepa durante a fermentação não apresentou diferença ao nível de 5% de significância nos três controles de pH. No entanto, a conversão de substrato em biomassa foi maior ( $Y_{x/s} = 0,2$ ) em pH controle de 5,7, esse mesmo valor somente foi alcançado nas fermentações realizadas com a cepa 1120a com utilização do MRS sintético (TABELA 3).

O comportamento dessa cepa foi semelhante ao observado por Yue et al. (2013) em seu estudo realizado com *Lactobacillus brevis* para a produção de manitol em pH controlado. A quantidade de biomassa produzida aumentou conforme o valor de controle de pH foi aumentado. Em pH 4,5 e 6,5, a produção foi de 7,8 g/L e 8,9 g/L, respectivamente. No

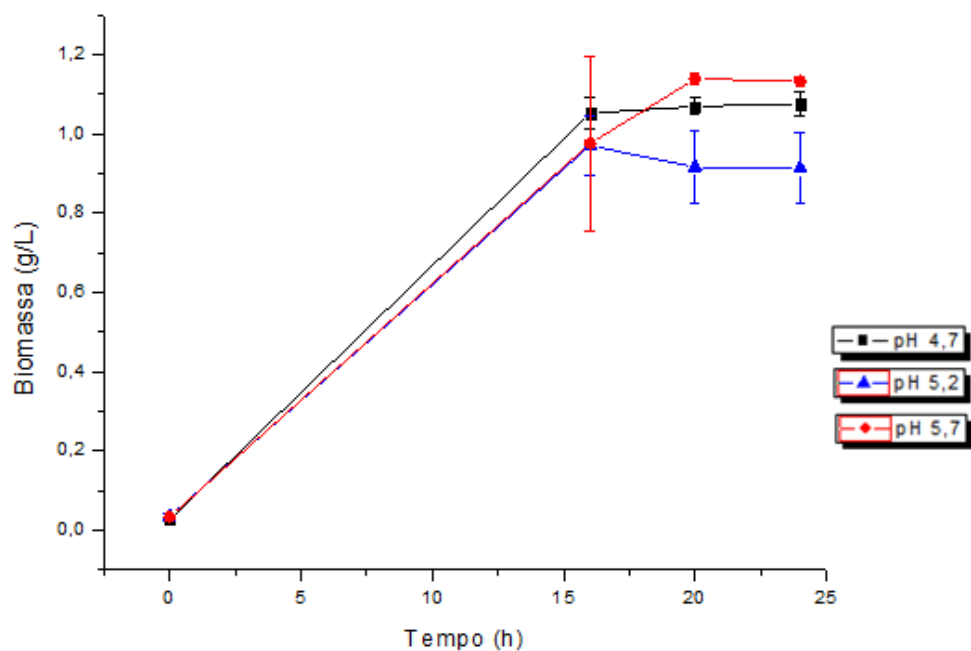


entanto, os valores de biomassa obtidos por ele foram bem superiores aos encontrados para a cepa 1057a.

A cepa de *Lactobacillus plantarum* (1115b) apresentou comportamento semelhante ao da cepa 1120a nos diferentes controles de pH em meio MRS simplificado. O processo em que o controle do pH foi em 5,2 apresentou a menor produção de biomassa (0,9 g/L). Nos demais controles de pH o crescimento foi equivalente, 1,0 g/L e 1,1 g/L em pH 4,7 e 5,7, respectivamente (FIGURA 10). Com o controle do pH em um valor maior (5,7), a cepa 1115b apresentou crescimento até às 20 horas, entrando na fase estacionária após isso, enquanto os demais controles esta fase teve início após as 16 horas de fermentação.

A cepa 1115b foi a que obteve uma produção de biomassa nas condições fixadas em biorreator em caldo MRS simplificado (1,1 g/L em pH controle 5,7) mais próxima da produção em MRS sintético obtida *shaker* (1,8 g/L) após 24 horas de fermentação. Apesar da pequena diferença nas taxas de conversão  $Y_{x/s}$  (conversão estequiométrica de glicose em biomassa) calculada para essa cepa em pH 4,7, 5,2 e 5,7 que foram 0,13, 0,08 e 0,09, respectivamente, o açúcar residual em pH controle de 4,7 foi significativamente maior ( $3,8 \pm 0,02$ ) quando comparado aos demais ensaios ao nível de significância de 5% (TABELA 3).

**Figura 10** – Produção de biomassa da cepa de *Lactobacillus plantarum* 1115b, em meio MRS simplificado, no biorreator sem defletores a 37°C/ 48 h, sob agitação (150 rpm), com aeração de 1 v.v.m na superfície do meio e controles de pH em 4,7, 5,2 e 5,7



Fonte: Elaborado pelo autor

O consumo de açúcar pelo microrganismo *Lactobacillus reuteri* em meio MRS contendo 20 g/L de glicose foi de 18 g/L, esse valor representa um consumo de 90% do açúcar total (VIEIRA, 2014). A cepa de *Lactobacillus rhamnosus* (1120a) aqui estudada apresentou consumo menor (82%) nas mesmas condições. Ao utilizar o meio MRS simplificado (cuja concentração de glicose é de 10 g/L), a única cepa que apresentou aproveitamento semelhante (81%) foi a 1115b (*Lactobacillus plantarum*) em pH controlado em 5,7. As cepas 1057a (*Lactobacillus rhamnosus*) e 1120a (*Lactobacillus rhamnosus*) apresentaram um aproveitamento do açúcar total de 79% e 75% em pH controlado em 5,2 e 5,7, respectivamente.

Coghetto et al. (2016) em uma fermentação com *Lactobacillus plantarum* utilizando como meio a fração líquida resultante das etapas de lavagem e separação durante a produção isolada de proteína de soja e fixando as condições do processo em 30 horas de duração a 200 rpm, com aeração de 4,5 v.v.m, a temperatura de 25°C e pH controlado a 5,5 obteve uma produção de biomassa de  $10,85 \pm 0,03$  g/L.

Brinques et al. (2010) ao estudarem a otimização da produção de probiótico e ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* em sistemas de biorreatores submersos utilizando soro de queijo (lactose) como fonte de carbono principal relataram uma produção de biomassa de 10,2 g/L (peso seco) no processo de fermentação com duração de 48 horas à temperatura de 34°C, aeração de 3,5 v.v.m, agitação de 200 rpm e pH controlado em 5,2.

As contagens de células viáveis realizadas nos diferentes controles de pH nas três cepas estudadas não apresentaram diferença entre si, apresentando crescimento de  $10^9$  UFC/mL após as 24 horas de fermentação em meio MRS simplificado. Com exceção para o pH controle de 5,7 realizado na cepa 1120a, no qual a contagem final foi superior ( $10^{10}$  UFC/mL), em virtude da contagem inicial também ter sido maior ( $10^7$  UFC/mL).

Rohm (2011) em sua pesquisa com *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus* observou que, independente de sua concentração, o crescimento da cepa era pobre quando a glicose era fornecida como a única fonte de carbono. A diferença de contagem de células para esses experimentos foi  $2,2 \times 10^7$  e  $4,1 \times 10^7$  UFC/mL. Para estimular o crescimento celular, foi necessário o enriquecimento do meio com suplementos, incluindo nucleobases e vitaminas, para cumprir as elevadas necessidades nutricionais do microrganismo.

Peng e al. (2013) ao estudar o controle do pH e da temperatura na produção de ácido gama-aminobutírico por *Lactobacillus brevis* observou que a maior biomassa celular foi

obtida quando o pH foi controlado em 5,0 após 32 h de cultivo, enquanto houve crescimento celular fortemente inibido quando o pH foi mantido em 4,0.

Em uma fermentação utilizando o MRS sintético como meio de cultivo são gastos R\$ 162,00 reais com meio de cultura em uma única fermentação com volume de trabalho de 2 L. Ao substituir o MRS sintético pelo simplificado na fermentação, considerando os custos com o funcionamento do equipamento e aeração compatíveis e calculando apenas a variação dos gastos com meio de cultura, são gastos aproximadamente R\$ 26,00 reais para a formulação desse meio. A peptona é o principal componente da formulação do MRS simplificado responsável pelo aumento dos custos desse meio. No entanto, em uma fermentação com MRS sintético são produzidos em torno de 3 g/L de biomassa (cepa 1120a), portanto cada grama (peso úmido) produzido dessa cepa nesse meio custa aproximadamente R\$ 54,00 reais. Com o MRS simplificado é produzido 1g/L de fermento (peso úmido) por processo, sendo necessárias três fermentações para produzir a mesma quantidade do MRS sintético, o que acarreta o aumento dos demais custos. Para que o uso do MRS simplificado como meio de cultivo seja viável, economicamente, são necessários alguns ajustes em suas deficiências para que ele produza a mesma quantidade de biomassa do MRS sintético em uma única fermentação.

Os fermentos lácticos comerciais para queijos podem ser encontrados em diversas faixas de preços. Um sachê de fermento láctico para muçarela contendo 1,2 g custa em média R\$ 25,00. Estes podem ser encontrados na forma de cápsula cujo valor da embalagem contendo 50 cápsulas custa R\$ 75,00. Outro fermento liofilizado 5U chega a custar R\$ 93,00 o pacote.

## 5 CONCLUSÃO

O meio de cultura alternativo utilizado, o MRS simplificado, não apresentou um bom desempenho na produção de biomassa quando comparado com o MRS sintético. A menor concentração de nutrientes e a ausência de um agente tamponante na composição do meio de cultura são fatores que contribuem para a performance limitada do MRS simplificado.

O controle de pH durante a fermentação em meio MRS simplificado aumenta a produção de biomassa das três cepas estudadas, com destaque para a cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1057a. A cepa 1115b (*Lactobacillus plantarum*) obteve o melhor desempenho em biorreator com o meio de cultura alternativo utilizado (1,9 g/L em pH 5,7 após 24 horas de fermentação) quando comparado com o crescimento em shaker com MRS sintético (1,1 g/L de biomassa).

Na avaliação da influência de diferentes parâmetros de cultivo na produção de biomassa de três cepas de bactérias ácido lácticas pode-se inferir que a cepa de *Lactobacillus rhamnosus* 1120a apresenta a maior produção de biomassa em biorreator sob condições de agitação de 150 rpm e aeração de 1 v.v.m sobre a superfície do meio em MRS sintético, além disso o uso dos defletores não apresentou influência significativa na produção de biomassa.

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar outra formulação de MRS simplificado composto por glucose (10 g/L), extrato de levedura (10 g/L), peptona de soja (10 g/L), citrato de amônia (2 g/L) e sulfato de magnésio (0,2 g/L), acetato de sódio (5 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L) proposto por Hwang et al. (2015);
- Substituir a peptona da formulação por outra fonte de nitrogênio como a milhocina ou o soro lácteo;
- Combinar a glucose com outra fonte de açúcar, o açúcar invertido;
- Realizar fermentações em outras faixas de pH de controle, com valores acima de 5,7 e ajustar o pH inicial do meio para 6,5;
- Aumentar o inóculo a ser inserido na dorna para 10%, iniciando a fermentação com uma concentração de células maior.

## REFERÊNCIAS

- ABIQ, 2017. KARAM, R. Consumo per capita no país praticamente dobrou em uma década, mas, continua abaixo da Argentina, para citar um vizinho. ABIQ. 2017. Disponível em: <<http://meucardapio.net.br/noticia/160.htm>>. Acesso em: 13 abr. 2018.
- ABIQ, 2018. CAETANO, M. Produção de queijo deve crescer 2,5% neste ano com aumento do consumo. ABIQ. 2018. Disponível em: <<https://www.dci.com.br/industria/producao-de-queijo-deve-crescer-2-5-neste-ano-com-aumento-do-consumo-1.698571>>. Acesso em: 13 abr. 2018.
- AGUIRREEZKAURIATZA, E. J.; AGUILARYÁÑEZ, J. M.; RAMÍREZMEDRANO, A.; ALVAREZ, M. M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed batch cultures. **Bioresource Technology**, v.101, n.8, p.2837–2844, 2010.
- ALMEIDA, T. C. Produção de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
- ANDRADE, A. P. C. **Produção de biomassa de levedura com potencial antagônico contra fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae***. 2013. 103f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) –Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.
- ANDRADE, R. S.; NETO, . A. de A.; LOPES, R. de C. S. de Q. Valorização biotecnológica de soro de leite para fermentação utilizando *Saccharomces cerevisiae*. Estudos Tecnológicos em Engenharia, v.11, n.2, p. 82-91, 2015.
- AZAMBUJA, A. A. **Fermentação de *Lactobacillus plantarum* para produção de exopolissacarídeos**. 2014. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. 2014.
- BARRAL, M. F.; LIMA, P. S. P. Biotecnologia Industrial – Engenharia bioquímica. Cap. 18 – **Automação e controle de processos fermentativos**. São Paulo: Blucher, 2001.
- BELLO, B. D.; RANTSIOUA, K.; ZEPPA, A. G.; AMBROSOLIA, R.; CIVERAB, T.; COCOLINA, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of autochthonous population. **Food Science and Tecnology**, v.43, n.7, p.1151-1159, 2010.
- BERECKA, M. P.; WASKO, A.; WIATER, M. K.; TARONSKI, Z.; KOMAR, A. K. Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1485-1494, 2011.
- BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3 ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. v. 1, General Aspects, p. 287-317.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de Março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário oficial da União**. Brasília, 16 jul. 2001.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 7.216, de 17 de junho de 2010. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de Dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, da Qualidade de Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011.

BRINQUES, G. B.; PERALBA, M. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. **Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, p. 205–212, 2010.

BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Fundamentos**. São Paulo: Blucher, 2001.

BRUNO, L. M. **Microrganismos: bactérias ácido lácticas**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 19. Fortaleza, CE. Embrapa Agroindústria Tropical. 2011.

BRUNO, L. M.; BORGES, M. de F.; LIMA, J. R.; MAGALHÃES, H. C. R.; CARVALHO, J. G. D. **Elaboração de queijo de coalho com bactérias lácticas autóctones**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 117. Fortaleza, CE. Embrapa Agroindústria Tropical. 2016.

BRUNO, L. M.; MARCÓ, M. B.; CAPRA, M. L.; CARVALHO, J. G. D.; MEINARD, C.; QUIBERONI, A. Wild *Lactobacillus* strains : Technological characterizations and design Coalho cheese lactic culture. **International Journal of Dairy Technology**, v.70, 2017.

CABRAL, M. L. .; LIMA , M. D. S. F. D.; ARAÚJO, G. A. D.; COSTA, E. F. D.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Journal Bioen. Food Sci.**, v.3, n.4, p.207-215, 2016.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, J. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p. 181-188, 2010.

CHIPETA, Z. A.; DU PREEZ, J. C.; CHRISTOPHER, L. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology*. v. 35, p. 587-594, 2008.

COGHETTO, C. C.; VASCONCELOS, C. B.; BRINQUES, G. B.; AYUBA, M. A. Z. *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v.47, p. 941-948, 2014.

COSTA, G. N.; SUGUIMOTO, H. H.; MIGLIORANZA, L. H. da. S.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “in vitro”. *Ciências Agrárias*, v.33, n.5, p.1839-1846, 2012.

DUARTE, M. C. K. H.; VORTEZ, N. M. dos. S.; MACEDO, N. C. de.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. ***Journal of Bioenergy Food Science***, v.3, n.1, p.1-10, 2016.

FRANCIOSI, E.; SETTANI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. ***International Dairy Journal***, v.19, n.1, p.3-11, 2009.

FRANÇOISE, L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. ***Food Microbiology***, v.27, n.2, p.698-709, 2010.

FREIRE, V. A. P. **Viabilidade de culturas probióticas de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* em iogurte adicionado de polpa e farinha do albedo do maracujá (*Passiflora edulis*)**. 2012. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. ***Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures***. 2 ed. New York: Springer, 2007.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGGUES, L. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. ***Biotechnology Advances***, v.28, n.3, p. 375-388, 2010.

GONZÁLEZ, L.; SACRISTÁN, N.; ARENAS, R.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M. E. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. ***Food Microbiology***, v.27, n.5, p.592-597, 2010.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next generation rhamnolipid production. ***Process Biochem***, v.47, p. 1207-1219, 2012.

HERMANS, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijo artesanais**. 2013. 100f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Rurais. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rio Grande do Sul, 2013.



HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p. 1409-1415, 2007.

HWANG, C. F.; LIN, C. K.; YAN, S. Y.; CHANG, R. H.; TSEN, H. Y. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain *Lactobacillus acidophilus* DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. **African Journal Biotechnol.**, v.14, p.248–256, 2015.

IANNIELLO, R. G.; RICCIARDI, A.; PARENTE, E.; TRAMUTOLA, A.; REALE, A.; ZOTTA, T. Aeration and supplementation with heme and menaquinone affect survival to stresses and antioxidant capability of *Lactobacillus casei* strains. **Food Science Technol.** v. 60, p. 817-824, 2015.

IANNIELLO, R. G.; ZOTTA, T.; MATERA, A.; GENOVESE, F.; PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Investigation of Factors Affecting Aerobic and Respiratory Growth in the Oxygen Tolerant Strain *Lactobacillus casei* N87. **PLoS ONE Journal**. v. 11, p. 1-19, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4ª ed. São Paulo: IMESP, 2008.

KEMPKA, A. P; KRUGER, R. L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHER, H.; CANSIAN, R., OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas**, v.28, n.1, p.170-177, 2008.

KRZYWONOS, M.; EBERHARD, T. High density process to cultivate *Lactobacillus plantarum* biomass using wheat stillage and sugar beet molasses. **Electron Journal Biotechnol.**, v.14, n.2, p. 99-105, 2011.

KUNTIYA, A.; HANMOUNGJAI, P.; TECHAPUN, C.; SASAKI, K.; SEESURIYACHAN, P. Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute. **International Journal of Science and Technology**, v.4, n.2, p.318-330, 2010.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. et al. **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects**. 4 ed. New York, CRC Press, p, 2; 40; 77-92, 2012.

LAVARI, L. IANNIELLO, R.; PAEZ, R.; ZOTTA, T.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; PARENTE, E. VINDEROLA, G. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **Food Science and Technology**, v.63, n.1, p.322-330, 2015.

LECHARDEUR, D.; CESSÉLIN, B.; FERNANDEZ, A.; LAMBERET, G.; GARRIGUES, C.; PEDERSEN, M. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. **Curr Opin Biotech.** v. 22, p.143-149, 2011.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 13 ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill Education e Artmed, 2016.

LIMA, C.; LIMA, L.; CERQUEIRA, M.; FERREIRA E.; ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.266-272, 2009.

LIMA, T. de. **Modelo de interferência para a estimação da umidade do leite de um biorreator de fermentação no estado sólido**. 2009. 166f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009b.

LIMA, C. P. **Resistência de bactérias lácticas a bacteriófagos isolados na produção de queijos de coalho no Ceará**. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LIMA, J. R.; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; FINKLER, C. L. L. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. **Revista Ciência e Saúde**, v.7, n.1, p.27-34, 2014.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. **Sustainable Biotechnology**, Springer Netherlands, 2010. p.211-228.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S. BUCKLEY, D. H. STHAL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MADDIPATI, P.; ATIYEH, H. K.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresour Technology**, v.102, p. 6494-6501, 2011.

MALEK, R.A.; HAMDAN, S.; EL ENSHASY, H.A.; OTHMAN, N.Z.; ZAINOL, N.A.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. A. **Production of *Lactobacillus salivarius*, a new probiotic strain isolated from human breast milk, in semindustrial scale and studies on its functional characterization** In: Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology A. Mendéz-Vilas (Ed.) Badajoz: Formatex Research Center, v.2, p.1196- 1204, 2010.

MAMEDE, P. L. **Efeito da temperatura de cozimento sobre as propriedades tecnológicas do queijo coalho**. 2008. 97f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas- Departamento de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2008.

MATA, P. C.; ARLINDO, S.; BOEHME, K.; MIGUEL, T.; PASCOAL, A. VELAZQUEZ, J. B. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v.1, n.1, p.43–63, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORIWAKI, C.; MAZER, C.; PAZZETTO, R.; MATIOLI, G. Avaliação de métodos para manutenção e preservação de bactéria esporulada produtora da enzima CGTase. **Acta Scientiarum**, v.31, n.2, p.113-118, 2009.

MOURA, R. **A consolidação do queijo de coalho**. Agroindústria Tropical, Fortaleza, n.140, p. 5-12, 2012.

NEGRULESCU, A.; PATRULEA, V.; MINCEA, M. M.; IONASCU, C.; VLAD-OROS, B. A.; OSTAFE, V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012.

NETO, J. P. de M. L. **Queijos – aspectos tecnológicos**. 1ª ed. Minas Gerais: Instituto Cândido Tostes de Laticínios, 2013.

NIETOARRIBAS, P.; POVEDA, J. M.; SESEÑA, S.; PALOP, L.; CABEZAS, L. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v.20, n.12, p.1092–1098, 2009.

OBOM, K. M.; MAGNO, A.; CUMMINGS, P. **Journal Operation of a Benchtop Bioreactor**, v. 79, 2013.

OLIVEIRA, K. A.; EVÊNCIO NETO, J.; PAIVA, J. E.; MELO, L. E. H. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.435-440, 2010.

OLIVEIRA, P. M. de. Produção de L (+) – ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* através de batelada alimentada. 2011. 46f. TCC (Graduação em Biociências) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, D. F. de.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Produção de ácido láctico e viabilidade celular de *Lactobacillus plantarum* inoculado em caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) suplementado. **Revista Pan-Amaz Saúde**, v. 4, n. 4, p. 67-71, 2013.

PANCHENIAK, E. D. F. R.; MAZIERO, M. T.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; PARADA, J. L.; SPIER, M. R.; SOCCO, C. R. Molecular characterization and biomass and metabolite production *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001: a potencial probiotic. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol.43(1), pp. 135-47, Jan-Mar, 2012.

PEDERSEN, MB.; GAUDU, P.; LECHARDEUR, D.; PETIT, MA.; GRUSS, A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. **Annu Rev Food Sci Technol**. v.3, p. 37-58, 2015.

PEIGHAMBARDOUST, S. H.; GOLSHAN, T.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science e Technology**. v. 22, n. 5, p. 215-224, 2011.

PENG, C.; HUANG, J.; HU, S.; ZHAO, W.; YAO, S.; MEI, L. A Two-stage pH and Temperature Control with Substrate Feeding Strategy for Production of Gamma-aminobutyric

Acid by *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v.21, n. 10, p. 1190—1194, 2013.

PEREDA, J. A. O.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SAANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. de F.; PERALES, L. de L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos – alimentos de origen animal**. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005. P 85-103.

PEREIRA, R.N.; VICENTE, A.A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. **Food Research International, Elsevier**, v.43, n.7, p.1936-1943, 2010.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology**. v.37, n.5, p.664-698, 2013.

RACINE, F. M.; SAHA, B. C. Production of mannitol by *Lactobacillus intermedius* NRRL B3693 in fedbatch and continuous cellrecycle fermentations. **Process Biochemistry**, v.42, n.12, p.1609–1613, 2007.

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, v.78, n.1, p.1–9, 2009.

RASINKANGAS, P.; REUNANEN, J.; DOUILLARD, F. P.; RITARI, J.; UOTINEN, V.; PALVA, A. Genomic characterization of non-mucus adherent derivatives of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals genes affecting pilus biogenesis. **Appl Environment Microbiology**, v.80, n.22, p.7001-7009, 2014.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.

ROHM, H.; MENDE, S.; KRZYKANOWSKI, L.; WEBER, J.; AROS, D. Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 185–191, 2012.

SALVATORI, R. U.; KAPPLER, T. I.; TOLDI, M. Crescimento de cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* em meios de cultura industriais. **Revista Destaques Acadêmicos**, v.6, n.3, 2014.

SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H.; VALLE, A.B.F.; OLIVEIRA, M.L.C. **Cursos práticos em bioquímica**. Instituto de Química-UFRJ. 6ª ed. 1996.

SCHMIDLL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biotecnologia Industrial – Engenharia bioquímica. Cap. 8 – **Biorreatores e processos fermentativos**. São Paulo: Blucher, 2001.

TODESCATTO, C. Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da mesorregião sudoeste do Paraná. 2014. 171f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2014.

VIEIRA, P. B. Estudos de processos para a produção de 1,3-propanodiol por *Lactobacillus reuteri*. 2014. 169f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*. v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.

XIMENES, E. A.; MESQUITA, A. R. C. D.; COSTA, C. R. R.; FRUTUOSO, J.; PINHEIRO, I. O.; MOTA, A.; FRANCHITTI, A. A. Activity of metabolites produced by new strains of *Lactobacillus* in modified de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium against multidrug resistant bacteria. *African Journal Microbiology Research*. Vol.11(8), pp. 345-355 , February 2017.


XING, Y.; XU, Q.; MA, Y.; CHE, Z.; CAI, Y.; JIANG, L. Effect of porous starch concentrations on the microbiological characteristics of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. **Food Function**, v.5, n.5, p.972-83, 2014.

YUE, M.; CAO, H.; ZHANG, J.; LI, S.; MENG, Y.; CHEN, W.; HUANG, L.; DU, Y. Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations. **World Journal Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p.1923–1930, 2013.

ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; G.; GUIDONE, A.; SACCO, M.; MUSCARIELLO, L.; MAZEO, M. F.; CACACE, G.; PARENTE, E. Inactivation ccpA an aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **International Journal of Food Microbiology**. v.155, p. 51-59, 2012.

ZOTTA, T.; IANIELLO, R. G.; GUIDONE, A.; PARENTE, E.; RICCIARDI A. Selection of mutants tolerant of oxidative stress from respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17. **Journal Appl Microbiology**. v.116, p. 632-643, 2014.

## ANEXO A – PROCEDIMENTO PARA ELABORAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE CRESCIMENTO MICROBIANO

	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento		
Código 000.00.00.00.0.000	Revisão 000	Cópia Não Controlada	Página 1 / 10
Título:	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA		

### 1. OBJETIVO

Este procedimento tem como finalidade descrever o método de determinação de curva padrão para microrganismos não filamentosos. A curva padrão microbiana é o instrumento necessário para a realização da correlação entre os valores lidos de absorbância e a concentração celular presente em determinada suspensão homogênea.

### 2. MATERIAL E REAGENTES

#### Reagentes e Soluções


- Meio de cultura
- Água destilada

#### Equipamentos e Materiais

- Tubos de centrífuga de 50 mL
- Centrífuga
- Capela de fluxo laminar
- Agitador de tubos, tipo vortex
- Balões volumétricos
- Espectrofotômetro
- Cubetas

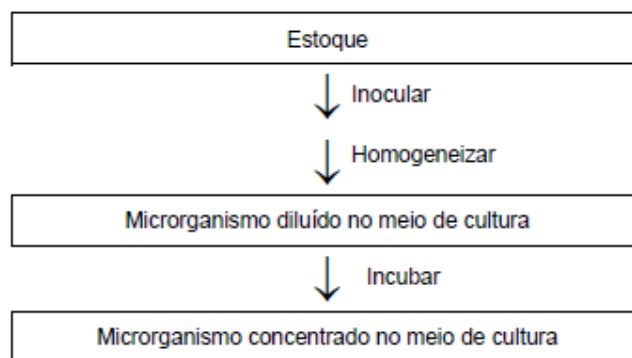
### 3. OPERAÇÃO

A construção da curva padrão microbiana corresponde, resumidamente a duas etapas: 1) determinação do peso seco de uma suspensão de volume conhecido e 2) Determinação da densidade óptica da suspensão em diferentes concentrações. A partir da correlação entre esses dados obtém-se uma curva padrão, que servirá de base para determinar a biomassa de determinado cultivo do mesmo microrganismo.

	<b>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</b> <b>Embrapa Agroindústria Tropical</b> <b>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</b>		
<b>Código</b> 000.00.00.00.0.000	<b>Revisão</b> 000	<b>Cópia</b> Não Controlada	<b>Página</b> 1 / 10
<b>Título:</b>	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA		


### 3.1. Obtenção da suspensão microbiana

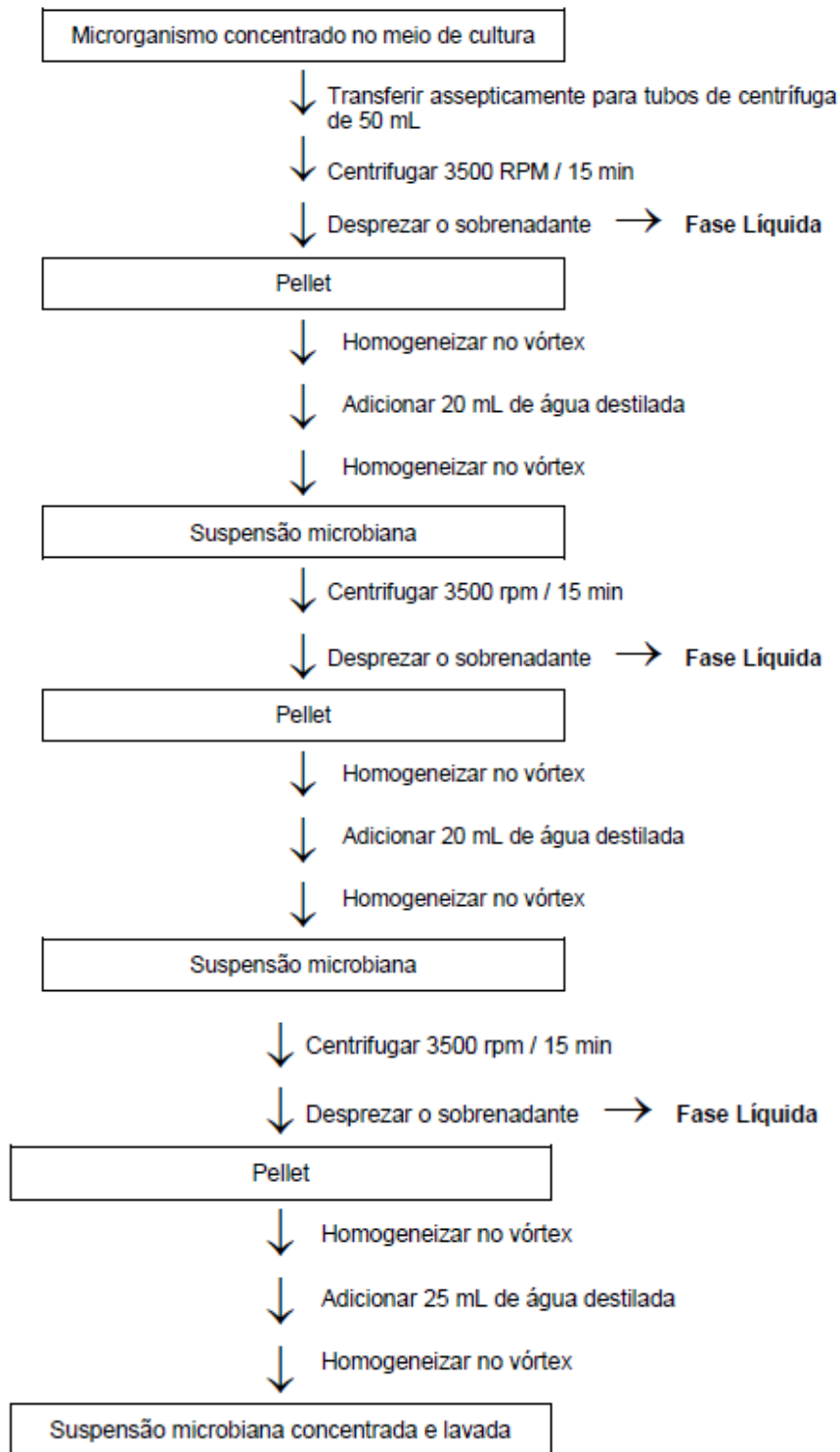
Altos valores de biomassa do microrganismo desejado, podem ser obtidos incubando-o em meio adequado conforme esquema abaixo:



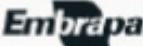
### 3.2. Preparação da biomassa

Após o crescimento a biomassa encontra-se suspensa no meio de cultura parcialmente exaurida. Esta deve ser preparada (lavada), ou seja, deve-se remover da presença das células, todas as substâncias que possam causar interferência na análise, para tanto, deve-se proceder como o fluxo a seguir:

	<b>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</b> <b>Embrapa Agroindústria Tropical</b> <b>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</b>		
<b>Código</b> 000.00.00.00.0.000	<b>Revisão</b> 000	<b>Cópia</b> Não Controlada	<b>Página</b> 1 / 10
<b>Título:</b>	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA</b> <b>DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA</b>		



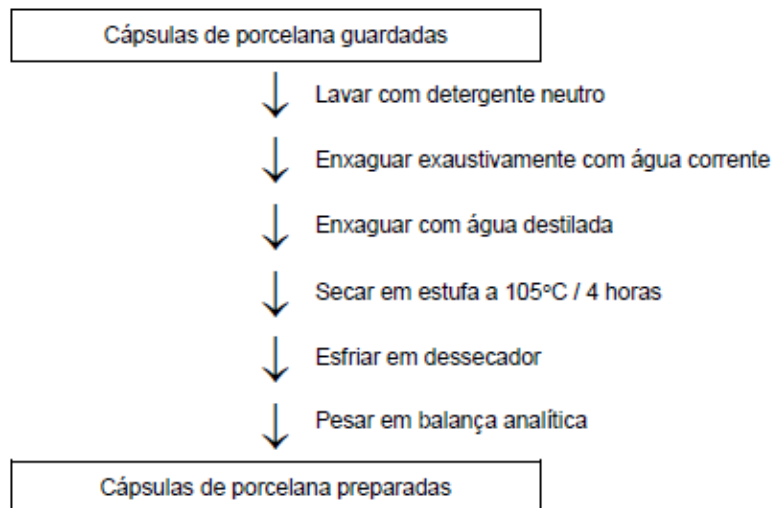


	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento		
Código 000.00.00.00.0.000	Revisão 000	Cópia Não Controlada	Página 1 / 10
Título:	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA		

**OBS.: 1:** Caso dois ou mais tubos de centrífuga estejam sendo utilizados para a lavagem das células, recomenda-se que toda a biomassa seja transferida para um único tubo de centrífuga, antes da centrifugação final.

**OBS.: 2:** O sobrenadante resultante das centrifugações deve ser desprezado em recipiente adequado para posterior esterilização.


### 3.3. Preparação das cápsulas de porcelana

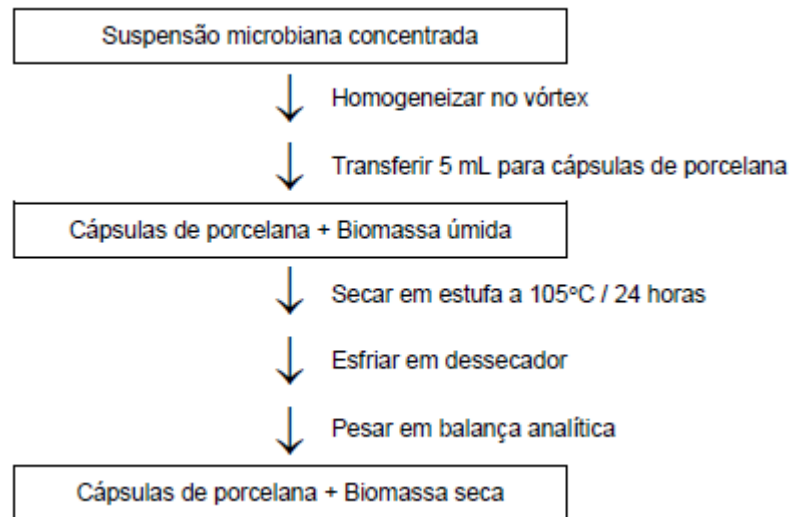


**OBS.:** Após a retirada das cápsulas de porcelana da estufa, deve-se evitar o contato manual, ou com superfícies sujas.

### 3.4. Determinação da biomassa seca

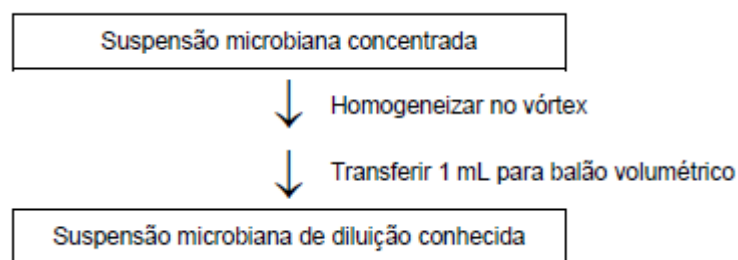
Esta etapa deve ser feita em triplicata.

	<b>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</b> <b>Embrapa Agroindústria Tropical</b> <b>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</b>		
Código 000.00.00.00.0.000	Revisão 000	Cópia Não Controlada	Página 1 / 10
Título:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA</b> <b>DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA</b>		



### 3.5. Preparo das diluições


Devem-se usar balões volumétricos de diferentes volumes (5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000 mL e 2000 mL). A escolha de volumes dos balões depende da quantidade de biomassa desenvolvida no período de incubação.



### 3.6. Leitura de absorbância

As diferentes diluições devem ser lidas em espectrofotômetro, tendo como branco, água destilada.

O comprimento de onda deve ser 600nm.

	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento		
Código 000.00.00.00.0.000	Revisão 000	Cópia Não Controlada	Página 1 / 10
Título:	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA		

### 3.7. Cálculos

#### Biomassa seca

Cápsula de porcelana + Biomassa seca (g): \_\_\_\_\_

- Cápsula de porcelana (g): \_\_\_\_\_

-----  
 Biomassa seca (g): \_\_\_\_\_

#### Concentração de biomassa seca

$$[\text{Biomassa seca}] = \frac{\text{Biomassa seca (g)}}{0,005 \text{ (L)}}$$

[Biom. Seca] : Concentração de biomassa seca (g/L)

0,005: Volume de solução utilizada (L)


### 3.8. Tabulação para a construção da curva-padrão microbiana

Tabela 1: Exemplo de tabela para construção de curva padrão

Diluição	Conc. de biomassa seca (g/L)	Absorbância
2000		
1000		
500		
250		
200		
100		
50		
25		
10		
5		

### 3.9. Curva-padrão microbiana

A curva-padrão de conversão de valores de absorbância em concentração, para um microrganismo específico, em um espectrofotômetro específico, é obtida por meio de uma regressão linear dos dados tabulados, sendo assim:

	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento		
Código 000.00.00.00.0.000	Revisão 000	Cópia Não Controlada	Página 1 / 10
Título:	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA		

$$Y = aX + b$$

**OBS.:** Deve-se tomar como válidas apenas as curvas-padrões, com fatores de correlação (R<sup>2</sup>) iguais ou superiores a 0,99. Ao plotar o gráfico, definir 6 casas decimais no rótulo da linha de tendência, para evitar arredondamentos automáticos do programa. Definir **b≠0**.

### 3.10. Fator de conversão de absorvância em concentração de biomassa seca

O fator que será usado rotineiramente para converter a absorvância lida em valores de concentração de biomassa seca é calculado pela fórmula abaixo.

$$f = 1 / a$$

f: Fator de conversão de absorvância para concentração

a: Coeficiente angular obtido por regressão linear

Para os cálculos de concentração é possível substituir os valores médios de absorvância diretamente na equação da reta obtida no gráfico ou através da fórmula:

$$C = \text{abs} \times f \times d + b$$

C: concentração de biomassa seca (g/L)


abs: valor médio das absorvâncias

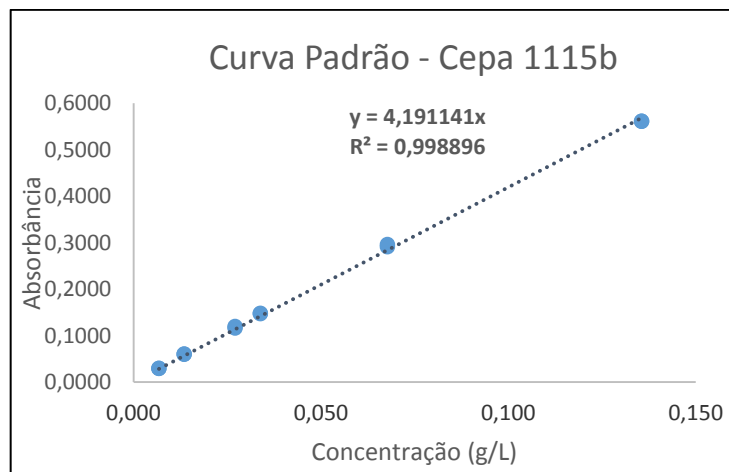
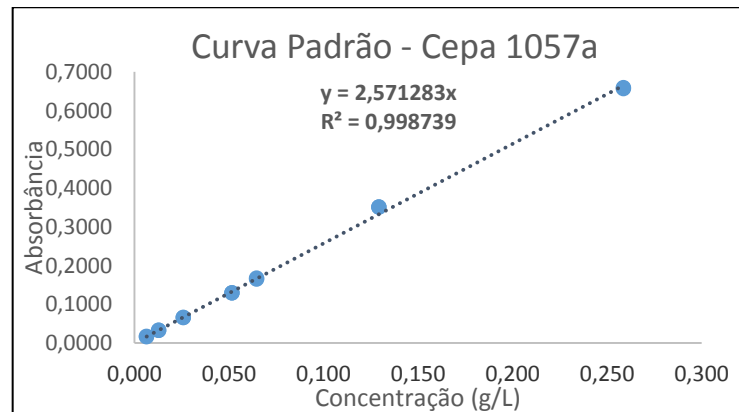
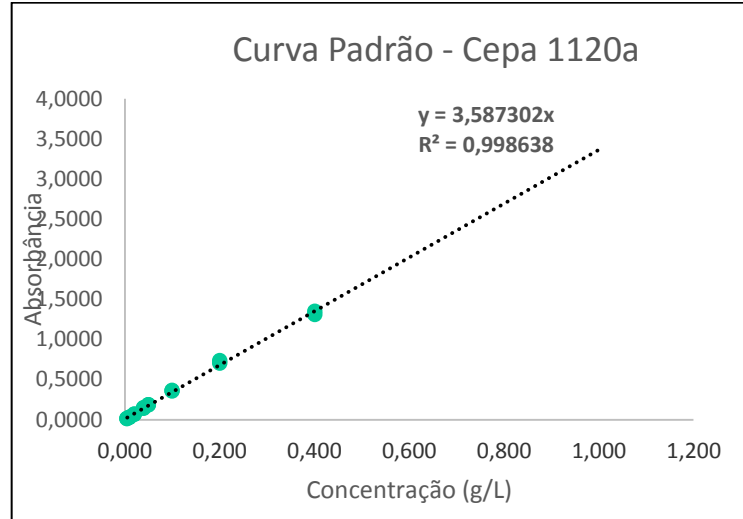
f: fator de conversão de absorvância para concentração

d: inverso do valor da diluição usada

b: coeficiente linear obtido na equação da reta

### 3.11. Gráfico da curva padrão

	<b>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</b>		
<b>Código</b> 000.00.00.00.0.000	<b>Revisão</b> 000	<b>Cópia</b> Não Controlada	<b>Página</b> 1 / 10
<b>Título:</b>	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CURVA PADRÃO DE BIOMASSA MICROBIANA</b>		



#### **4 Bibliografia**

SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H.; VALLE, A.B.F.; OLIVEIRA, M.L.C.

**Cursos práticos em bioquímica.** Instituto de Química-UFRJ. 6a ed. 1996.