



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

CARLA PORTO DOURADO

FILIPPE MARCONDES FERRAZ

GIULIA EVELIN OLIVEIRA CASTRO

ISABELA CORREIA DE ASSIS NETTO

Produção de Ácido Lático a partir da fermentação do soro de leite pelo *Lactococcus*
lactis

Araraquara – SP

2024

**CARLA PORTO DOURADO
FILIPE MARCONDES FERRAZ
GIULIA EVELIN OLIVEIRA CASTRO
ISABELA CORREIA DE ASSIS NETTO**

**Produção de Ácido Lático a partir da fermentação do soro de leite pelo
*Lactococcus lactis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Ariela Veloso de Paula

**Araraquara – SP
2024**

P964

Produção de Ácido Lático a partir da fermentação do soro de leite pelo
Lactococcus lactis / Carla Porto Dourado... [et al.]. - Araraquara,
2024.
62 f. : il.

Orientadora: Ariela Veloso de Paula.

Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Ácido lático. 2. *Lactococcus lactis*. 3. Soro de leite. I. Dourado,
Carla Porto. II. Ferraz, Filipe Marcondes. III. Castro, Giulia Evelin
Oliveira. IV. Netto, Isabela Correia de Assis. VI. Paula, Ariela Veloso de,
orient. VII. Título

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

Esta ficha não pode ser modificada

AGRADECIMENTOS

Carla: Agradeço a Deus, a quem aprendi a buscar e confiar, mesmo nos momentos mais desafiadores. Aos meus pais Elair e José Fábio, que sempre priorizaram os meus estudos e me ensinaram sobre respeito e gratidão. Ao meu irmão Fábio e meus familiares, que sempre me incentivaram a buscar o meu diploma. Aos meus amigos, que durante toda a minha trajetória me ouviram e aconselharam, compartilhando momentos de alegria e desafios. Ao meu noivo Caique, que torna meus dias mais leves, me apoia, encoraja e dá forças para seguir em frente. Aos meus colegas de TCC Filipe, Isabela e Giulia, por terem me acolhido e me ensinado tanto. À Unesp, docentes, técnicos e servidores, que deram todo o suporte necessário para aprendermos e executarmos nosso trabalho.

Filipe: Agradeço aos meus pais, Erédio e Cleide, também a minha irmã Fabiana, por sempre terem me incentivado aos estudos e pelo apoio durante toda essa jornada acadêmica. Aos professores, técnicos e colegas de curso, que compartilharam conhecimentos, experiências e motivações ao longo dos anos. Agradeço também aos amigos, que compreenderam minhas ausências e ofereceram apoio nos momentos mais difíceis. Por fim, gostaria de expressar também minha sincera gratidão para todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto e a Unesp por fornecer os recursos necessários.

Giulia: Agradeço aos meus pais, Evandro e Sandra, por sempre me darem todo o apoio e o suporte para poder realizar todas as minhas expectativas. À minha família e amigos por aguentarem os meus surtos, me ajudarem nos momentos difíceis e estarem sempre por perto, especialmente ao bebedouro salva noix. Também quero agradecer ao meu grande amor, Guilherme Augusto, por fazer a minha vida muito mais leve e feliz, no ônibus ou no avião.

Isabela: Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Claudia e Davi, os quais sempre moveram montanhas para que pudesse estar aqui hoje, sendo meu porto seguro e suporte sempre. Também gostaria de demonstrar minha gratidão à minha irmã, Giovana, minha grande inspiração desde o início e quem me dá combustível para ir cada vez mais longe. À minha sala, EBB 08, que me mostra

diariamente o valor da união e companheirismo, sem vocês nada disso seria possível, e sou extremamente grata por ter tido a sorte de entrar nessa aventura ao lado de vocês. Agradeço também a cada técnico, professor, mestrando que nos aconselhou durante o processo, enriquecendo nosso conhecimento e nos guiando em meio aos obstáculos; e também aos meus companheiros de TCC, Carla, Giulia, Filipe, a singularidade de cada um foi fundamental para concretização desse trabalho, obrigada por tantos ensinamentos.

RESUMO

O ácido láctico é um produto com alto valor agregado, seu mercado está estimado em cerca de US\$ 511,11 milhões, dessa forma a produção dessa biomolécula gera grande interesse. Visando minimizar os custos de produção do ácido láctico, o presente trabalho tem como objetivo produzi-lo a partir do soro de leite proveniente da produção de queijo utilizando o *Lactococcus lactis*, promovendo assim o aproveitamento desse resíduo de forma concomitante. Para tanto foram realizados ensaios preliminares para avaliar a influência de diferentes meios de cultura sobre o microrganismo, sendo eles o soro de leite coagulado e o filtrado (sem os coágulos), ademais, foi analisado o meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe) como controle positivo, sendo analisados o consumo de açúcar redutores e a produção de ácido láctico, atingindo uma produção de respectivamente, 1,64; 1,51 e 7,63 g/L do ácido. A partir dos resultados desta etapa, foi determinado que o soro de leite coagulado seria utilizado para o ensaio no reator STR, nele foi examinado o crescimento das células, bem como a quantificação de açúcares redutores e ácido láctico, obtendo-se 1,86 g/L da biomolécula. Em seguida, o caldo fermentado no reator foi purificado, resultando em uma amostra cerca de 6 vezes mais pura, e os resíduos deste processo foram analisados, por terem uma composição semelhante ao soro de leite e não apresentarem compostos tóxicos, demonstraram ter potencial para novas aplicações como ração animal, desta forma, cria-se uma circularidade econômica. Por fim, o processo apresenta uma possibilidade de reaproveitamento do soro de leite, porém seriam necessários ajustes para que o mesmo se torne eficiente.

Palavras-chave: Ácido láctico, *Lactococcus lactis*, Soro de leite

ABSTRACT

Lactic acid is a product with high added value, its market is estimated at around US\$511.11 million, therefore the production of this biomolecule generates great interest. Aiming to minimize the costs of producing lactic acid, the present work aims to produce it from whey from cheese production using *Lactococcus lactis*, thus promoting the use of this residue concomitantly. To this end, preliminary tests were carried out to evaluate the influence of different culture media on the microorganism, namely coagulated whey and filtrate (without clots), in addition, the MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) was analyzed as positive control, analyzing the consumption of reducing sugar and the production of lactic acid, reaching a production of 1.64, respectively; 1.51 and 7.63 g/L of the acid. From the results of this step, it was determined that coagulated whey would be used for the test in the STR reactor, where cell growth was examined, as well as the quantification of reducing sugars and lactic acid, obtaining 1.86 g /L of the biomolecule. Then, the broth fermented in the reactor was purified, resulting in a raise of purity in about 6 times, the residues from this process were analyzed, as they have a composition similar to whey and do not present toxic compounds, demonstrating potential for new applications such as animal feed, in this way, economic circularity is created. Finally, the process presents a possibility of reusing the whey, but adjustments would be necessary for it to become efficient.

Keywords: Lactic acid, *Lactococcus lactis*, Whey

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Condição do soro com coágulo após o processo de autoclavagem.....	26
Figura 2 – Controlador e Biorreator de 7L utilizados no procedimento.....	28
Figura 3 – Equipamento de destilação utilizado para o método de kjeldahl.....	32
Figura 4 – Equipamento soxhlet usado para a extração de lipídios.....	33
Figura 5 – Curva de calibração do ácido láctico e sua respectiva equação da reta	36
Figura 6 – Curva analítica de DQO com a solução de KHP.....	37
Figura 7 – Curva de calibração para o método do Miller.....	39
Figura 8 – Curva de calibração para o método de Bradford.....	40
Figura 9 – Produção de ácido láctico em relação ao tempo no meio MRS.....	41
Figura 10 – Produção de ácido láctico em relação ao tempo no Soro de Leite Filtrado.....	41
Figura 11 – Produção de ácido láctico em relação ao tempo no Soro de Leite Coagulado.....	42
Figura 12 – Produção de ácido láctico em relação ao tempo.....	44
Figura 13 – Fotos das Culturas Plaqueadas do meio MRS.....	46
Figura 14 – Fotos das Culturas Plaqueadas do meio Soro de Leite Filtrado.....	46
Figura 15 – Fotos das Culturas Plaqueadas do meio Soro de Leite Coagulado.....	47
Figura 16 – Produção de ácido láctico em relação ao tempo no Reator.....	48
Figura 17 – Crescimento de Células em relação ao tempo.....	49

Figura 18 – Sobreposição dos cromatogramas da biomassa e do soro fermentado.....	53
Figura 19 –Sobreposição do cromatograma com a curva padrão.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades termodinâmicas do Ácido Lático.....	14
Tabela 2 – Estudos sobre produção de ácido láctico	23
Tabela 3 – Rendimento da produção de ácido láctico para cada um dos meios.....	45
Tabela 4 – Grau de pureza das amostras.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Ácido Lático: Propriedades e Aplicações.....	14
2.2. Mercado de ácido lático.....	16
2.3. Bactérias ácido-láticas.....	17
2.4. Lactococcus lactis.....	19
2.5. Mercado da Indústria de Laticínios.....	20
2.6. Ácido Lático: da produção à purificação.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Materiais e Reagentes.....	25
4.2. Metodologia.....	25
4.2.1. Preparo dos meios e caracterização do soro.....	25
4.2.2. Ensaio de fermentação em erlenmeyer.....	26
4.2.3. Ampliação de escala.....	27
4.2.4. Purificação.....	29
4.2.5. Tratamento de Resíduos.....	30
4.3. Métodos analíticos.....	34
4.3.1. Bradford.....	34
4.3.2. Miller.....	34
4.3.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	35
4.3.4. Quantificação de células por Unidade Formadora de Colônias (UFC). 36	
4.3.5. Análise de Demanda Química de Oxigênio.....	36
4.3.6. Análise por Cromatografia Gasosa.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Caracterização do Soro de Leite.....	39
5.1.1. Açúcares redutores.....	39
5.1.2. Proteínas totais.....	40
5.2. Produção de ácido lático em diferentes meios de cultura.....	40
5.3. Avaliação da produção em Reator STR operando em batelada.....	47
5.4. Purificação do ácido lático produzido no reator.....	50
5.5. Análise dos resíduos gerados pela produção.....	52
5.5.1. Biomassa.....	52
5.5.2. Impurezas.....	54
5.5.3. Destino final dos resíduos.....	55
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico é uma molécula com a fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, com a massa molar de 90,078 g/mol, ponto de fusão de 16,8°C e de ebulição equivalente a cerca de 122°C. Ele é caracterizado por ser solúvel na água, com baixa volatilidade e descrito como seguro (Lauffer, 2019).

Sua produção pode ser via química ou biológica. Considerando que a síntese química do ácido láctico é dispendiosa e prejudicial ao meio ambiente, a produção biotecnológica surgiu como uma alternativa promissora e vantajosa, sendo bastante empregada para esse produto, além de possibilitar o uso de co-produtos agroindustriais de baixo valor agregado como substrato fermentativo (Haris *et al.*, 2023).

Segundo pesquisas do Mordor Intelligence (2024), o mercado de ácido láctico é estimado, no ano de 2024, em um valor de US\$ 511,11 milhões, e há previsão de crescer para US\$ 624,54 milhões até 2029, indicando não apenas o impacto desse produto, como também sua expectativa de incremento de investimentos no futuro. A produção do ácido láctico via fermentação pode apresentar dois isômeros diferentes, o L(+) e o D(-), dependendo do microrganismo e das condições de cultivo aplicadas. Já a síntese química é conhecida por gerar usualmente a mistura racêmica dos dois isômeros (Beitel *et al.*, 2020).

Essa produção biotecnológica envolve um microrganismo, muitas vezes do gênero *Lactobacillus*, capaz de realizar a fermentação de açúcares ou compostos lignocelulósicos, gerando como produto o ácido láctico. Muitas vezes esses organismos possuem como pH ideal a faixa de 5 a 7 (Yankov, 2022).

Uma das espécies do gênero é o *Lactococcus lactis*, o qual é uma bactéria gram positiva com elevado conhecimento disponível cientificamente, então é uma fábrica bastante utilizada em diversos processos fermentativos. Ela é bastante aplicada na indústria de produtos lácteos, como de queijos, e é muito interessante por não produzir, usualmente, endotoxinas ou metabólitos tóxicos, possibilitando sua ampla aplicação na indústria de alimentos (Tavares, 2020).

Em relação ao substrato, esse microrganismo é capaz de utilizar os açúcares provenientes de resíduos agroindustriais para gerar a fermentação. Esse processo é de grande interesse ao trazer uma economia ao processo, além de agregar valor a um material que antes seria descartado, mas que possui uma qualidade nutricional interessante para muitas espécies de microrganismos, reduzindo drasticamente o

impacto ambiental de diversos processos de produção (Yankov, 2022). A indústria do leite, por exemplo, é atrativa para esse tipo de prospecção, visto que ano passado atingiu uma produção global de mais de 944 milhões de toneladas, gerando mais de 200 milhões de toneladas de resíduo líquido, conhecido como “soro do leite” (Mukherjee *et al.*, 2023).

O “soro de leite” é um co-produto bastante promissor como substrato fermentativo, pois é altamente nutritivo, sendo resultante do processo de produção de queijo e iogurtes. Desse modo, é necessário realizar a precipitação de proteínas específicas, gerando esse soro, o qual contém alto valor de lactose, proteínas, minerais e lipídeos. Além de nutritivo, o planejamento de um destino para esse soro é extremamente necessário, visto que o descarte incorreto do mesmo pode provocar degradação da flora, prejudicar a qualidade da água e contaminar o solo. Então, cabe à indústria planejar um tratamento para esse co-produto antes do descarte, o que gera gastos para o processo. Assim, são crescentes os estudos procurando alternativas que agreguem valor a esse resíduo e aproveitem esses nutrientes, reduzindo o impacto ambiental (Mukherjee *et al.*, 2023).

Assim, o *Lactococcus lactis* apresenta alto potencial para a geração de produtos de alto valor agregado, destacando-se por sua capacidade de fermentar a lactose presente no soro de leite, que também possui outros componentes como proteínas e lipídeos. Este trabalho visa explorar a produção de ácido láctico por *Lactococcus lactis* utilizando soro de leite como matéria-prima, uma abordagem que não só agrega valor a um resíduo industrial, mas também contribui para a sustentabilidade ambiental.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ácido Lático: Propriedades e Aplicações

A produção de ácido láctico tem ganhado crescente atenção devido às suas diversas aplicações industriais, que abrangem desde a conservação de alimentos até a produção de polímeros biodegradáveis, cosméticos e produtos farmacêuticos. O ácido láctico, também conhecido como ácido 2-hidroxipropânico, é um composto orgânico de grande importância biotecnológica, sendo classificado como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) pelo órgão regulatório Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (Monteiro, 2024).

Segundo Komesu (2017), o ácido láctico é um líquido inodoro que a 15 °C e 1 atm apresenta coloração amarela a incolor, sendo o ácido hidroxicarboxílico mais simples. Algumas de suas propriedades termodinâmicas podem ser observadas na Tabela 1, sendo dextrógiro (“D”) e levógiro (“L”) seus dois enantiômeros existentes. Descoberto inicialmente por Scheele em 1780 no leite azedo e posteriormente produzido por fermentação por Fremi em 1881, o ácido láctico pode ser obtido por vias químicas ou biotecnológicas, sendo esta última preferida devido a suas vantagens econômicas e ambientais (Ojo, 2023).

Tabela 1 - Propriedades termodinâmicas do Ácido Lático (C₃H₆O₃).

Propriedade	Valor
Densidade a 20 °C (g/L)	1,249
Ponto de fusão (°C)	52,8 (D); 53,0 (L); 16,8 (DL)
Ponto de ebulição (°C)	82,0 (DL) a 0,5 mmHg; 122,0 (DL) a 15 mmHg; 103 (D) a 15 mmHg
Constante de dissociação (pKa) a 25 °C	3,83 (D); 3,79 (L)
Capacidade térmica (J/mol.°C) a 20 °C	190 (DL)
Calor de solução (kJ/mol) a 25 °C	7,79 (L)
Calor de fusão (kJ/mol)	16,86 (L); 11,33 (DL)

Fonte: Holten *et al.*, 1971; Perry e Chilton, 1999 *apud* Komesu 2017.

Para a produção por via química, produz-se o ácido através de múltiplas etapas, utilizando fontes petroquímicas. O produto formado é uma mistura racêmica de ácido D (-) e L (+) láctico, após oxidação catalítica do etileno para obter o acetaldeído, que em seguida é convertido em lactonitrila e hidrolisado. Também foram relatados outros métodos por rota química inviáveis técnica e economicamente, como a hidrólise do ácido cloropropiônico e a oxidação do propileno ou propilenoglicol (Yankov, 2022).

Atualmente, a produção de ácido láctico utilizando fontes de carbono para fermentação microbiana representa mais de 90% do total. Neste processo, microrganismos em condições favoráveis convertem açúcares fermentáveis e para isso é necessária a observação de parâmetros como temperatura, pH, presença de nutrientes, concentração de substrato e produto. O metabolismo celular, essencial para a adequada reprodução dos microrganismos, bem como o consumo do substrato e conversão em ácido láctico, sofrem grande influência de fatores como temperatura e pH (Ojo, 2023).

Quando a produção do ácido láctico ocorre via fermentação, têm-se algumas vantagens como o menor consumo de energia e aplicação de matérias-primas mais baratas e renováveis, tornando o processo muito mais sustentável. Também é possível, utilizando microrganismos e condições favoráveis, a obtenção de D ou L ácido láctico opticamente puro (Eş, 2018).

A obtenção do ácido láctico contendo apenas um enantiômero permite que ele seja utilizado para determinadas aplicações especializadas. Considerando a incapacidade das células animais de metabolizar o enantiômero D, sua aplicação torna-se restrita em certos casos na indústria alimentícia. Desta forma, o alvo da maioria das produções biotecnológicas é o enantiômero L. Uma outra forte aplicação do AL, a produção de ácido polilático (PLA), tem impulsionado o mercado e também requer grande pureza enantiomérica (Mora-Villalobos, 2020).

A produção tradicional do ácido é através de processos descontínuos, por conta de sua simplicidade técnica, mas estratégicas, como batelada alimentada. Esse método tem vantagens como o aumento da produtividade e diminuição de inconvenientes com inibição pelo substrato. Pesquisas recentes também indicam como mais viável economicamente o processo contínuo na produção de AL, sugerindo que este processo seja favorecido futuramente. (Mora-Villalobos, 2020)

As matérias-primas utilizadas como substrato e os processos de fermentação, responsáveis por cerca de 40 a 70% dos custos da produção de AL, estão entre os maiores desafios para tornar a sua produção mais econômica. Presentemente, a produção é dependente de açúcares refinados e amidos, competindo com recursos alimentares. Desta forma, uma proposta crescente é a utilização de matérias-primas não alimentares mais econômicas, como resíduos alimentares, microalgas e biomassa lignocelulósica. Um exemplo de material celulósico que tem sido indicado como uma opção de substrato para este processo de produção é o melaço de cana-de-açúcar, por ser alta fonte de carbono. Além disso, materiais amiláceos, tais como raízes de malte e extrato de farelo de soja com variadas concentrações de grãos aplicados em cervejaria, foram estudados para a produção do isômero L puro do ácido láctico (Ahmad, 2020).

Outro co-produto com grande potencial para aplicação na produção de ácido láctico é o soro de leite, que é produzido abundantemente devido ao grande crescimento da produção global de leite e seus derivados. Apesar de já ser muito aplicado na indústria alimentícia e farmacêutica, um volume expressivo ainda é descartado, gerando problemáticas ambientais relacionadas à sua alta demanda biológica de oxigênio. Por outro lado, por conter grandes quantidades de lactose, pode ser considerado uma fonte de carbono disponível para produção de bioquímicos como o ácido láctico (Mukherjee, 2023).

2.2. Mercado de ácido láctico

Com a problemática decorrente da predominância de petroquímicos como fonte de energia e matéria-prima até os dias de hoje, a questão ambiental tem se tornado um tópico de grande preocupação. Para frear as mudanças climáticas relacionadas a esta questão, é necessário que sejam encontradas alternativas para substituir os petroquímicos. Diversos produtos derivados da biomassa, conhecidos como bioprodutos, se encaixam como parte dessas alternativas, sendo o ácido polilático (PLA) um grande candidato à substituição do plástico convencional, à base de petróleo. O PLA pode ser aplicado de diversas formas, entre elas no mercado da engenharia biomédica, por ter alta capacidade de biodegradação e propriedades mecânicas satisfatórias, além de ser biocompatível e versátil. O ácido láctico, um dos derivados de biomassa, é o monômero que constitui o PLA, além de ter diferentes aplicações nas áreas química, alimentícia, farmacêutica e cosmética. É esperado

que o mercado global de ácido láctico, que em 2016 era de 1220 quilotons, tenha aumento para 1960 em 2025, representando um crescimento anual de 16,2% (Ma et al., 2023).

Segundo análises recentes do Grand View Research (2023) a estimativa de tamanho do mercado global de ácido láctico em 2023 era de USD 3,37 bilhões, com taxa composta de crescimento anual (CAGR) esperada de 8% no período de 2024 a 2030. Além disso, a cana-de-açúcar tem sido a principal matéria-prima para sua produção, com uma participação na receita de cerca de 38,8% em 2023. A abundância desta biomassa disponível é uma explicação para esta porcentagem alta.

Em relação às aplicações do ácido láctico, o mercado global foi dominado pela aplicação em ácido polilático (PLA), que representou cerca de 28% da receita. Em segundo lugar, teve-se a aplicação em bebidas e alimentos, projetando significativo crescimento (Future Market Insights, 2022).

Devido às crescentes indústrias, farmacêutica, de alimentos, bebidas e de cuidados pessoais na América do Norte, esta foi a região que dominou o mercado em 2023, representando cerca de 45,2% da receita (Grand View Research, 2023). A Ásia Pacífica é uma região que também tem apresentado um crescimento acentuado em participação de mercado do ácido láctico, o que pode ser explicado pelos novos avanços tecnológicos, aumento nas exportações de panificados e assistência federal (Future Market Insights, 2022).

Até 2017, os três maiores produtores de ácido láctico eram a Purac, Cargill e Henan Jindan Lactic Acid Technology Co. Juntos eles atingiram a capacidade combinada de 505 mil toneladas em 2013. A Cargill fornece ácido láctico como matéria-prima para a produção de ácido láctico pela NatureWorks. O Departamento de Energia dos Estados Unidos publicou em 2010 um relatório sobre as substâncias químicas tidas como potenciais alicerces para o futuro. Entre eles estava o ácido láctico (Komesu, 2017).

2.3. Bactérias ácido-láticas

O desenvolvimento de biorrefinarias tem como marco a pesquisa, desenvolvimento e utilização de cepas microbianas com capacidade de utilização de diferentes substratos e produção de diversos produtos. Entre estas cepas microbianas, as bactérias ácido lácticas (BAL) demonstram um potencial para

aplicação em biorrefinarias integradas. As bactérias do ácido láctico são imóveis, aerotolerantes, ácido-tolerantes, Gram-positivas, catalase-negativas e tem formato de bastonetes ou cocos (Mora-Villalobos, 2020).

Sua mais marcante característica é ter o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos. Sua energia, devido à ausência de um sistema para respiração funcional, é obtida com a fosforilação do substrato através de duas vias metabólicas que resultam na fermentação da hexose. A primeira delas é a via homofermentativa, na qual ocorre a quebra da glicose, resultando principalmente em ácido láctico. Já a segunda, a via heterofermentativa, também conhecida como via das pentoses fosfato, tem como produtos finais o gás carbônico e etanol, juntamente com o ácido láctico (Mora-Villalobos, 2020).

Alguns dos gêneros de BAL são *Lactococcus sp. (L.)*, *Leuconostoc sp. (Lc.)*, *Streptococcus sp. (S.)*, *Pediococcus sp.*, *Alloiococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Dolosigranulum sp.*, *Aerococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Oenococcus sp.*, *Tetragenococcus sp.*, *Vagococcus sp.* e *Weissella sp. (W.)*, *Lactobacillus sp. (Lb.)*, o maior gênero (Emkani, 2022). Segundo Wang (2021), os gêneros mais utilizados em fermentações com fins alimentares incluem *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.* e *Weissella sp.*

A capacidade destas bactérias de crescer em ambientes com pH ácido e realizar fermentação de diversos carboidratos faz com que elas tenham grande potencial de aplicação em alimentos e processos industriais. Isto destaca a importância da realização de estudos sobre seu metabolismo e potencial biotecnológico (Wang, 2021).

Diversas hidrolases são necessárias para que os polissacarídeos sejam degradados pelas bactérias lácticas. Esta degradação, em alimentos fermentados, não apenas fornece energia para as bactérias lácticas, mas também produz uma variedade de substâncias benéficas para a espécie humana. Diferentes polissacarídeos são metabolizados por diferentes bactérias lácticas, o que tem influência direta no panorama de aplicações de cada uma na indústria de alimentos (Wang, 2021).

As bactérias lácticas têm sido aplicadas para fermentação em sistemas tanto em estado sólido quanto em estado líquido, sendo este o mais estudado e aplicado na indústria. O sistema em estado líquido tem como finalidade isolar, entre outros

produtos, peptídeos bioativos, etanol e os ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico. Quando é finalizada a fermentação, etapas de isolamento e purificação são aplicadas a fim de extrair as biomoléculas de interesse da biomassa ou sobrenadante. O ácido láctico e as bacteriocinas estão entre os produtos extracelulares que permanecem no caldo fermentado, após contínua produção durante o crescimento (Mora-Villalobos, 2020).

A biomassa, que normalmente seria descartada após o término da fermentação, tem se destacado por ser uma potencial fonte de proteína para outros processos e em alguns casos, a depender do gênero da bactéria, pode ser aplicada como probiótico. Ainda, alguns compostos presentes na parede celular das BAL como peptidoglicano, LTAs e certas proteínas também têm potencial para aplicações biotecnológicas, se devidamente separados e purificados. Desta forma, o desenvolvimento de processos com maior eficácia e sustentabilidade, resultando em diferentes produtos, também podem ser beneficiados pelas múltiplas rotas metabólicas das BAL (Mora-Villalobos, 2020).

2.4. *Lactococcus lactis*

Entre os microrganismos mais estudados para a produção via rota biológica, destaca-se o *Lactococcus lactis*, uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, que se destaca pela capacidade de fermentar a lactose presente no soro de leite, um subproduto abundante da indústria de laticínios (Vijayakumar, 2024).

A produção de ácido láctico e o metabolismo do carbono em *L. lactis* têm sido muito estudados, devido ao seu importante papel na conservação de alimentos através da fermentação. A maior parte dos isolados lácteos desse microrganismo tem como característica uma capacidade limitada de utilizar como substratos para o crescimento hidratos de carbono como glicose, manose, frutose, galactose, lactose, maltose e celobiose (Kleerebezem, 2020).

O *L. lactis*, por décadas, foi utilizado como microrganismo modelo no estudo das BAL, tendo grande contribuição para o conhecimento científico sobre essas bactérias em relação ao seu metabolismo, genética, biologia molecular e regulação genética. A pesquisa sobre seu funcionamento e iniciação da engenharia genética foram exemplo e fonte de inspiração nos anos 70, após contribuírem para a informação sobre as principais funções de *L. lactis* nos processos fermentativos lácteos (Kleerebezem, 2020).

Nas décadas mais recentes, abordagens pós-genômicas também foram abrangidas pelas pesquisas científicas sobre esta bactéria. Paralelamente, também houve um grande avanço no conhecimento relacionado à genética, evolução e diversidade das BAL em geral, devido ao aumento das pesquisas pós-genômicas de outras bactérias do grupo. Apesar desse aumento de pesquisas sobre outras espécies diminuir a posição de *L. lactis* como microrganismo modelo, ela segue como uma das BAL mais investigadas (Kleerebezem, 2020).

2.5. Mercado da Indústria de Laticínios

O Brasil se destaca no mercado de lácteos, considerado o terceiro maior produtor de leite de vaca de todo o mundo, sendo essa atividade bem distribuída ao longo da extensão territorial do país. Além desse impacto, observa-se também que há muitos anos o país investe nessa atividade agropecuária, e foi desenvolvido um intenso crescimento da produção nas últimas décadas, sendo que em 2001 a produtividade foi de 20,5 bilhões, enquanto em 2021 esse número aumentou para 35,3 bilhões de litros, acompanhado por um aumento de produtividade por cabeça de gado de mais de 90% nesse intervalo (Andrade *et al.*, 2023).

O país é um grande produtor e exportador dessa *commodity*, e a indústria de produção de seus derivados também é muito expressiva no território nacional. Em geral, as fábricas produtoras de queijo, por exemplo, realizam a precipitação da caseína presente no líquido, aproveitando cerca de 10 a 20% do leite, e o volume restante (80 a 90%) é tratado como um resíduo, mesmo contendo altas concentrações de proteínas, minerais, açúcares e lipídeos (Mukherjee *et al.*, 2023).

Além disso, percebe-se que é crescente a preocupação das indústrias e órgãos governamentais com relação a uma produção sustentável e com menor pegada de carbono, visando cumprir as agendas mundiais para um desenvolvimento mais equilibrado. A indústria de produtos lácteos também está inclusa nessa demanda global, visto que tendem a gerar substâncias com elevado teor de matéria orgânica e alterações químicas que podem causar enorme desequilíbrio ambiental no momento do descarte. Assim, são crescentes as estratégias para promover aplicações para esses resíduos, como na produção de biogás, ou recuperação da água do material, promovendo maior circularidade do processo (Mukherjee *et al.*, 2023).

O descarte desse alto volume de líquido em corpos d'água é crime, além de representar um prejuízo de toda a qualidade nutricional que ele poderia agregar em outros processos. No entanto, esse descarte incorreto ainda é uma realidade especialmente entre produções de pequeno ou médio porte, pois é exigido um gasto financeiro com uma equipe ou operação especializada no tratamento de efluentes, então essa ação pode acabar sendo negligenciada, o que promove um aumento da poluição ambiental, comprometimento da diversidade e alterações químicas no solo ou corpo d'água (Sandim, 2018).

Um importante fator para análise da possibilidade de descarte de uma substância é a Demanda Química de Oxigênio, um indicador que estipula a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica. Para o descarte da substância em rios, a resolução do CONAMA estabelece um valor máximo de DBO de 120 mg/L para o lançamento de efluentes em corpos d'água. O soro do leite apresenta uma demanda de oxigênio que pode chegar até 80 g/L, representando um líquido de alta complexidade para tratamento, exigindo procedimentos que sejam capazes de reduzir drasticamente esse valor (Tamburus, 2020; Mukherjee *et al.*, 2023).

Essa análise é ainda mais relevante ao analisar a posição do Brasil na produção de queijos, de modo que, segundo dados de 2021, o país é um dos maiores produtores desse derivado do mundo, gerando mais de 1,5 milhões de toneladas no ano. Devido a essa grande produção, o volume de soro de leite gerado é também extremamente significativo para o país, então são válidos estudos que busquem aplicações que agreguem valor a esse líquido (Magalhães, 2023).

Segundo Revadan (2021), mesmo com novos estudos possibilitando o desenvolvimento de “produtos lácteos” ou “misturas lácteas” que aproveitam esse soro, além do crescimento da produção de *whey protein* como suplemento alimentar, ainda há uma grande parcela desse soro que não possui aplicação, configurando cerca de 40% do volume. Em 2021, um estudo do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia revelou que um dos motivos para o descarte irregular e não reutilização do soro é por conta de sua tendência na proliferação de bactérias e fungos, limitando sua utilização dentro da indústria de alimentos e exigindo maiores cuidados e investimentos.

2.6. Ácido Lático: da produção à purificação

Apesar de ter sido amplamente investigada e otimizada, a produção de ácido láctico com técnicas convencionais demonstrou insuficiência em relação à produtividade necessária ao atendimento dos rigorosos critérios de qualidade exigidos pelo público consumidor da atualidade. Por conta desta problemática, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para tornar os bioprocessos em larga escala mais produtivos e viáveis, focando em métodos mais inovadores e com potencial de vencer as limitações dos processos tradicionais, melhor atendendo as demandas atuais de mercado (Eş, 2018).

Os Reatores de Tanque Agitado (STR), por conta de sua grande capacidade e facilidade de controle dos parâmetros, vêm sendo bastante utilizados para a produção de ácido láctico. Desde a primeira batelada, os estudos sobre esta aplicação do STR já passaram por processos com células livres e imobilizadas em diferentes suportes, utilizando também diferentes substratos e microrganismos que vão de fungos filamentosos a bactérias ácido lácticas. Mais recentemente, os reatores STR vêm sendo estudados em combinação com reatores de leite empacotado e leite fibroso, buscando maior eficiência (Eş, 2018).

Na Tabela 2, reunimos alguns estudos sobre a produção de ácido láctico, com seus respectivos autores, assim como microrganismos, substrato e condições de cultivo empregados.

Tabela 2 - Estudos sobre produção de ácido láctico

Referência	Microrganismo	Substrato	Reator utilizado
Ramchandran, 2012	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> strain ASCC930119	Meio à base de soro de leite composto por extrato de levedura, leite em pó desnatado, lactose monohidratada e soro de leite em pó	Cultivo por membrana submersa
Shi, 2012	<i>L. lactis</i> ATCC19435 (células imobilizadas)	Hidrolisado de alcachofra de Jerusalem	Biorreator de leito fibroso
Tejayadi, 1995	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Permeado de soro de leite com extrato de levedura	Biorreator de membrana contínuo
Amrane, 1996	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain <i>milano</i>	Meio à base de soro de leite com hidrólise prévia de proteínas	Biorreator agitado magneticamente
Kim, 2012	Cultura mista	Glicose	Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente
Tashiro, 2011	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> QU 41	Meio MRS	Célula de reciclagem com membrana de fibra oca
Wang, 2013	<i>L. plantarum</i>	Glicose	Eletrodialise com membrana bipolar
Li, 2015	Cultura mista	Glicose	Imobilização celular com palha de milho
Ahring, 2016	<i>Bacillus coagulans</i>	Corn stover hydrolysate	Fermentação contínua

Fonte: Autores, 2024.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho se propôs a utilizar o *Lactococcus lactis* para o aproveitamento do soro de leite visando sintetizar ácido láctico. Além disso, almejou-se encontrar a configuração mais eficiente para a produção da biomolécula, utilizando resíduo agroindustrial como substrato, objetivando uma maior viabilidade econômica.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a composição nutricional do soro de leite
- Comparar a produtividade do processo que utiliza o meio padrão em relação ao que emprega o resíduo da produção de queijo;
- Compreender os efeitos do aumento de escala para o processo;
- Planejar o tratamento ou destinação dos resíduos gerados ao longo de todo o processo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O processo de produção do ácido láctico realizado no presente trabalho pode ser agrupado em 3 principais etapas, sendo elas, ensaios de fermentação, aumento de escala e purificação, como pode ser observado no fluxograma presente no anexo 1.

4.1. Materiais e Reagentes

O soro de leite foi obtido de um produtor artesanal de queijo da região de Araraquara, em um total de 20 L de produto, e o mesmo foi armazenado refrigerado durante o transporte, e posteriormente foi congelado no freezer Electrolux® H500 a temperatura de -4°C para evitar a degradação de seus componentes. A colônia do microrganismo *Lactococcus lactis* estava refrigerada, e foi obtida dos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP-Araraquara. Outros reagentes incluem: Meio Ágar MRS da Kasvi® (São José dos Pinhais/Brasil), Ácido tricloroacético (TCA), soro albumina bovina (BSA), reagente DNS, ágar bacteriológico da Kasvi®. Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

4.2. Metodologia

4.2.1. Preparo dos meios e caracterização do soro

Utilizando uma balança analítica, foram pesados 52,25g do meio MRS da Kasvi®, e essa massa foi misturada em 1L de água destilada, utilizando a base magnética e um peixinho para realizar a homogeneização da mistura, seguindo as orientações do fabricante. O pH desse meio foi medido usando o phmetro TECNAL® (Piracicaba/Brasil). Em seguida, o meio produzido foi distribuído em algumas vidrarias para que fosse autoclavado.

O soro de leite foi colocada em banho-maria, sob uma temperatura de 37°C, até o completo descongelamento do produto, e uma porção desse soro foi colocada em um béquer sob o phmetro para que fosse possível a medição do pH, e esse foi ajustado para que alcançasse um valor semelhante ao do meio MRS. O soro foi distribuído em dois boecos de 1L, e todas as vidrarias foram autoclavadas na autoclave vertical da Phoenix Luferco® (Araraquara/Brasil) por 20 minutos, a 120°C, sob pressão de 1 kgf/cm².

Em seguida, um dos frascos de reagente com soro foi mantido fechado para análise, sendo nomeado como soro com coágulo (SC), assim como demonstra a

Figura 1. Já o outro passou por um processo de filtração a vácuo para remoção da matéria que coagulou, e esse filtrado foi novamente autoclavado, sendo nomeado como soro filtrado (SF), e utilizado como comparação para os ensaios.

Figura 1 - Condição do soro com coágulo após o processo de autoclavagem.



Fonte: Autores, 2024.

Os soros filtrado e coagulado passaram por análises de proteínas e açúcares redutores, pelo método de Bradford (seção 4.3.1) e Miller (seção 4.3.2).

4.2.2. Ensaio de fermentação em erlenmeyer

4.2.2.1. Pré-inóculo

Partindo de uma placa de Petri com o cultivo, foi utilizada uma alça descartável, em uma capela, e inoculada uma colônia do *Lactococcus lactis* em cada um dos 3 tubos de 15mL de meio MRS, e estes foram dispostos em incubadora refrigerada TE-421 da TECNAL® (Piracicaba/Brasil) com uma rotação suficiente para gerar uma leve agitação e não provocar aeração (por volta de 50 rpm), a uma temperatura de 30°C, por 24h (Sayed *et al.*, 2020, modificado).

4.2.2.2. Preparação dos meios

Foi realizado o cálculo de quantidade de açúcar presente no meio MRS, com base na descrição do fabricante Kasvi®, e esse valor foi mantido como base para os demais soros, para que fosse possível a comparação entre os resultados. Assim, as substâncias lácteas, após a avaliação de Miller, foram diluídas com água destilada

autoclavada, visando a manutenção da mesma concentração de açúcar do meio padrão.

4.2.2.3. Inóculo

Foram separados três erlenmeyers de 125mL, e em cada um foram adicionados 5mL do pré-inóculo e 95mL do soro coagulado já diluído. O mesmo procedimento foi realizado para o outro soro e para o meio padrão. Dessa forma, os nove erlenmeyers foram incubados no shaker Amerex Gyromax 737R ® (Hampton, EUA) a 30°C, 100 rpm, por 48h (Sayed *et al.*, 2020, modificado).

4.2.2.4. Preparação das amostras

Ao longo do processo fermentativo, foram coletados pontos com um volume de 2mL para análise das condições do cultivo nos tempos 0, 15, 20, 24, 38 e 48h. Após cada coleta, foi necessário realizar a centrifugação da amostra a 10.000 rpm por 5 minutos para remoção das células, sendo recuperado o sobrenadante. A partir deste, foi realizada a desativação enzimática utilizando o ácido tricloroacético (TCA) 10%. Para isso, foi misturada 1 parte de TCA para 9 de amostra, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foi descartado o pellet e o sobrenadante foi armazenado no refrigerador para posterior análise (Barbosa *et al.*, 2021, modificado).

Durante o processo, os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, buscando compreender se havia diferença significativa entre os diferentes meios de crescimento.

4.2.3. Cálculo do rendimento

O cálculo do rendimento teórico de ácido láctico pode ser calculado com base na estequiometria das reações presentes nas equações 1 e 2, com isso é possível calcular o rendimento da produção utilizando a equação 3.



$$Rendimento = \frac{\text{Concentração de Produto gerado}}{\text{Rendimento Teórico da geração de produto}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.2.4. Ampliação de escala

O processo de aumento de escala ocorreu em um volume de 3L, sendo aplicado em um biorreator STR Tecnal 2 TEC-BIO-FLEX® (Piracicaba/Brasil) de 7L para avaliação do perfil de produção, assim como ilustra a Figura 2.

Figura 2 - Controlador e Biorreator de 7L utilizados no procedimento.



Fonte: Autores, 2024

Para preparação do inóculo, foram coletadas três colônias do *Lactococcus lactis*, e adicionadas cada uma em um tubo de ensaio de 10mL contendo o meio MRS. Esse volume foi colocado na incubadora refrigerada TE-421 da TECNAL® (Piracicaba/Brasil) com uma rotação suficiente para gerar uma leve agitação e não provocar aeração (por volta de 50 rpm), a uma temperatura de 30°C, por 24h. Em seguida, 5mL desse conteúdo celular foi transferido para um erlenmeyer com mais 95mL de soro MRS, e essas três vidrarias foram incubadas no shaker Amerex Gyromax 737R ® (Hampton, EUA) a 30°C, 150 rpm, por 24h.

Ao mesmo tempo, foi realizada a autoclavagem do reator com o soro em seu interior. Visando a manutenção da concentração de lactose dos experimentos em erlenmeyer, foi feita uma diluição do soro a ser aplicado no reator, utilizando água destilada, seguindo a Equação 4 abaixo:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \quad (\text{Equação 4})$$

Em que C corresponde à concentração de açúcar na amostra, V é o volume, e há comparação do valor inicial (i) com o final (f). Após a diluição, o volume dos três

erlenmeyers contendo os microrganismos foram misturados aos 2700mL de soro diluído, sendo adicionado ao biorreator para início do experimento. O processo ocorreu sob agitação com duas turbinas Rushton a 300 rpm, temperatura de 30°C, por 48h e sem aeração visando a manutenção da anaerobiose.

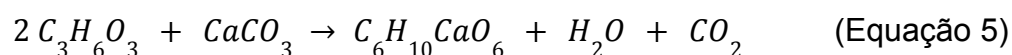
Durante o processo fermentativo, foram coletados alguns pontos para quantificação de células e produção do metabólito de interesse. Os tempos de coleta ocorreram em 0, 4:30, 7:30, 24, 32 e 48h, e foram feitas de forma esterilizada com o auxílio de uma chama e houve a adição de nitrogênio para manter o ambiente anaeróbio.

Os pontos seguiram para as análises de Miller, HPLC e quantificação de células por unidades formadoras de colônia. Posteriormente o cálculo do rendimento foi realizado da forma apresentada anteriormente (tópico 4.2.3).

4.2.5. Purificação

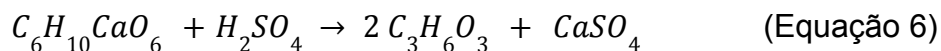
Visando a purificação do ácido láctico produzido, o conteúdo do reator foi coletado após 48h de reação e passou por um processo de centrifugação na centrífuga *Hitachi CR22N®* (Tóqui/Japão) a 8.000 rpm por 10 minutos para separação da biomassa e do sobrenadante. O último foi coletado, aquecido a 70 °C durante 30 min visando a precipitação das proteínas e eliminação dos microrganismos, seguido de uma filtração a vácuo.

Em seguida, foi adicionado a ele carbonato de cálcio para que fosse feita a conversão do ácido láctico em lactato de cálcio, e essa reação aconteceu sob agitação com o auxílio de uma barra e base magnéticas por 30 minutos. A quantidade de carbonato foi calculada com base na estequiometria da Equação 5 abaixo, sendo que o reagente foi adicionado com excesso de 20% (Vijayakumar *et al.*, 2008).



Em seguida, o caldo foi adicionado ao rotaevaporador *Heidolph®* (Schwabach, Alemanha) até que ocorresse a cristalização do lactato de cálcio e remoção da água, sob pressão de 50 mbar e temperatura de 70°C (Yu *et al.*, 2015). Em seguida, o volume restante foi coletado e acrescido de ácido sulfúrico, também com 20% em excesso, baseado na estequiometria da Equação 6 para promover a

remoção do cálcio na forma de sulfato de cálcio por 30 minutos sob agitação branda, liberando a molécula de ácido láctico (Nakano *et al.*, 2012).



Para remoção do sulfato de cálcio, compostos coloridos e impurezas sólidas, o líquido foi misturado ao carvão ativado sob proporção de 5% (massa/volume) sob agitação branda por 1 hora. Então, a amostra passou por uma série de ciclos de centrifugação para remoção do carvão ativado, sendo que cada ciclo ocorria sob uma rotação de 8000 rpm por 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi coletado e armazenado e passou novamente pela leitura de HPLC para análise da composição da amostra, seguindo a metodologia proposta no tópico 4.3.4 (Nakano *et al.*, 2012). Para fins de comparação, esse mesmo processo de remoção de impurezas foi realizado com o auxílio da bentonita no lugar do carvão ativado, seguindo o mesmo procedimento.

Por fim, foi realizado o cálculo do grau de pureza das amostras finais com base na equação 7, bem como da amostra relativa ao ponto final do reator para que fosse possível estimar o quanto a amostra foi purificada.

$$\text{Grau de Pureza} = \frac{\text{concentração produto (g/L)}}{\text{Densidade (g/L)}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

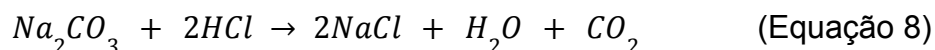
4.2.6. Tratamento de Resíduos

Ao longo do processo, foram observadas algumas saídas de impurezas, as quais passaram por um adequado processamento, visando ou o descarte favorável, ou a aplicação em algum produto de valor agregado, buscando a geração de um processo mais sustentável.

O principal resíduo foi a biomassa obtida após a centrifugação do material que fora retirado do biorreator, sendo que essa foi coletada e parte dela deixada sob uma placa de petri na estufa Solab® (Piracicaba/ Brasil) com circulação e renovação de ar SL- 102 a cerca de 60°C por 24h para completa remoção de umidade do material. Dessa maneira, com a biomassa seca, foi possível realizar análises de quantificação de nitrogênio e lipídios para compreensão da composição do material a ser tratado.

4.2.6.1. Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl

Para iniciar esse experimento, foi realizada a padronização do ácido clorídrico, sendo que foi adicionada a massa de Na_2CO_3 suficiente para consumo de 15mL do HCl, seguindo a Equação 8.



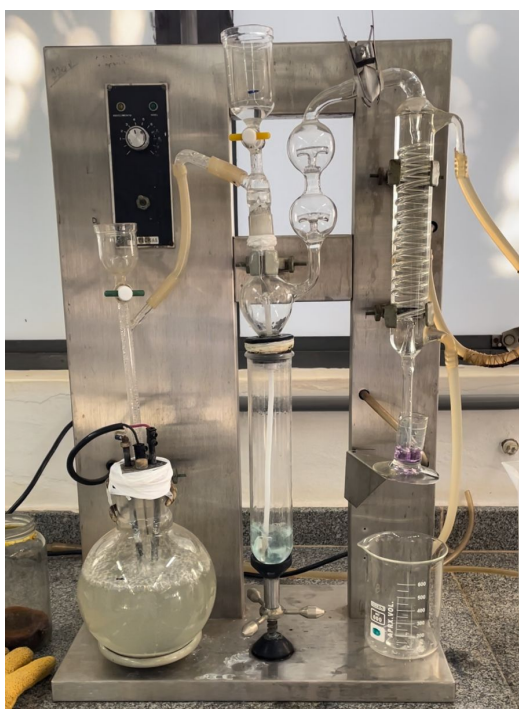
Também foi preparada a solução de ácido bórico saturada, de modo que foram aplicadas 30g de ácido para 500mL de água destilada. Para a preparação do vermelho de metila, foi coletada 1g do mesmo, e ele foi diluído em 60mL de álcool, e em seguida em 40mL de água destilada. E visando a preparação da mistura indicadora, composta por vermelho de metila e azul de metileno (2:1) a uma concentração de 0,02%, os reagentes também foram diluídos na mesma proporção do anterior de água e álcool.

A massa de carbonato de sódio foi misturada a 25mL de água destilada e algumas gotas do indicador vermelho de metila em um erlenmeyer de 250mL. Assim, com o auxílio de uma bureta, foi titulado o HCl 0,02N, e foi possível, em seguida, calcular a normalidade do ácido e o fator de correção.

A princípio, 100 mg da amostra foi pesado usando uma balança analítica e adicionado a um tubo de ensaio, junto a 1 grama do catalisador $K_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (4:1) e 5mL de ácido sulfúrico concentrado, dentro da capela. Também foi feito um branco, no qual não havia a presença da amostra. Esses tubos foram adicionados ao digestor, com um aumento gradual de temperatura até que o líquido ficasse translúcido e não houvesse resíduos nas paredes do vidro, podendo durar de 2 a 4h. Após o término, aguardou-se até o resfriamento da amostra e foi feita a transferência para um tubo de destilação.

Abaixo do condensador foi adicionada uma proveta, na qual foram adicionados 500mL de ácido bórico e algumas gotas da mistura indicadora. No tubo da amostra, acrescentou-se também 10mL da solução de NaOH (60%), depois foi feito o aquecimento e posterior destilação até que o nitrogênio todo tivesse sido transferido para a vidraria com ácido bórico. O equipamento utilizado está demonstrado na figura 3.

Figura 3 - Equipamento de destilação utilizado para o método de kjeldahl



Fonte: Autores, 2024.

Foi necessário, em seguida, realizar o processo de titulação, em que o destilado foi transferido para um erlenmeyer de 250mL, foram adicionadas mais gotas de mistura indicadora e o frasco foi deixado sob a bureta que continha ácido clorídrico 0,02N, sendo anotado o volume necessário para observar a mudança de cor.

4.2.6.2. Extração dos lipídeos

4.2.6.2.1. Lipídios da Biomassa

Para realizar a extração do teor lipídico da biomassa, foi necessário realizar a extração usando o aparato Soxhlet ilustrado pela Figura 4. Para iniciar o processo, 3g da amostra seca foi adicionado ao envelope de papel filtro, fechado e inserido dentro do aparelho, o qual possui capacidade de cerca de 100mL. Também foi

preparada uma solução de hexano puro, e essa foi usada para realizar a extração lipídica por um período de 4h (Tesfaye e Tefera, 2017, modificado).

O balão de 250mL foi retirado com a mistura de solvente com o extrato lipídico, e foi submetido ao rotaevaporador *Heidolph®* (Schwabach, Alemanha) a uma temperatura de 50°C, rotação de 70 rpm e pressão variando entre 200 e 300 mbar, até a evaporação completa do solvente. A massa do balão foi pesada e seguiu-se para o processo de metilação para que fosse possível a análise por cromatografia gasosa (Tesfaye e Tefera, 2017, modificado).

Figura 4 - Equipamento soxhlet usado para a extração de lipídios



Fonte: Autores, 2024.

4.2.6.2.2. Extração de lipídios do Soro

Para realizar o processo de extração, foram coletados 120mL do soro retirado do biorreator após a centrifugação, e, em um funil de separação, foi adicionado um volume de 40mL de hexano e houve agitação por cerca de 3 minutos. A amostra foi deixada em repouso por cerca de 30 minutos para que ocorresse a separação de fases. Em seguida, foi removida a porção inferior dessa separação, e a extração foi realizada mais duas vezes (Vicente, 2018, modificado).

4.2.6.3. Metilação

Seguindo a metodologia de AOCS (2004), foi necessário realizar o preparo da solução metanólica de hidróxido de sódio 0,2 M, seguindo a Equação 9:

$$m_{NaOH} = V \cdot 0,2 \cdot mm \cdot \frac{100}{pureza} \quad (\text{Equação 9})$$

Em que o primeiro termo se refere à massa de hidróxido de sódio em gramas, “V” é o volume desejado em L, “mm” a massa molar do hidróxido de sódio (g/mol), e a “pureza” se refere ao teor de pureza do reagente.

Também foi preparada a solução metanólica de ácido sulfúrico a 1M, e para encontrar a quantidade necessária do ácido, foi usada a Equação 10.

$$V_{H_2SO_4} = V \cdot mm \cdot \frac{1}{\rho} \cdot \frac{100}{pureza} \quad (\text{Equação 10})$$

Nessa relação, o primeiro termo corresponde ao volume de ácido sulfúrico (mL), V é o volume desejado (L), mm a massa molar do ácido (g/mol), ρ a densidade dele (g/mL).

Para o preparo da solução metanólica saturada de NaCl, foi usado um béquer de 150mL, com uma agitação magnética suficiente para provocar homogeneização do sistema. Nele foram adicionados 30mL de metanol, e posteriormente foram adicionadas pequenas quantidades de NaCl até a saturação do sistema.

Para a realização do ensaio de metilação, foi adicionado a um vial de 20mL 50mg da amostra, somado a 2mL de solução de NaOH, sendo esses agitados com o auxílio de uma barra magnética em um banho de glicerina a 80°C por 15 minutos. Em seguida, aguardou-se pelo resfriamento da amostra até que fosse possível a manipulação e adicionou-se 2mL de solução metanólica de H_2SO_4 , realizando a agitação sob aquecimento nas mesmas condições do processo anterior. Após o resfriamento, foi realizada a extração dos glicerídeos com a adição de 2mL de hexano e 1mL de solução saturada de NaCl, agitando a mistura por 30 segundos e deixando em repouso até que houvesse a separação das fases, podendo esse processo ser feito mais duas vezes.

Com o auxílio de uma pipeta, foi coletada a fase orgânica em outro vial de 20mL, secando o hexano em nitrogênio, e o frasco foi armazenado a 6°C para posterior análise em cromatografia gasosa.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Bradford

Partindo de uma solução de Soro Albumina Bovina de 0,2 mg/mL, foram montadas diferentes concentrações dos reagentes em tubos de ensaio, com água destilada e o reagente de Bradford, seguindo diferentes concentrações, sendo elas 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/mL. Esses valores foram anotados, as absorbâncias anotadas em uma leitura de 595nm e plotados em um gráfico e utilizados para a montagem da curva de calibração do método.

Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados com o uso de vórtex e deixados em repouso por cerca de 5 minutos. A amostra foi transferida para uma cubeta para leitura no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595nm, sendo os valores anotados (Bradford, 1976).

Para a caracterização do soro, foram usados 800µL de amostra, e a mesma quantidade do reagente, realizando, posteriormente, o mesmo protocolo descrito acima, sendo o processo feito em duplicata.

4.3.2. Miller

Foi aplicado o método de Miller (1959) para quantificar os açúcares redutores através da redução do ácido 3-5-dinitrosalicílico à 3-amino-5-nitrosalicílico. Assim, o procedimento iniciou com o preparo da curva de calibração com soluções padrão de lactose D(+) monohidratada da Vetec/Sigma, partindo de uma concentração de 1mg/mL, e as concentrações variaram de 0,2; 0,4; 0,8; 1; 1,4; 1,8; 2; 3; 4 mg/mL.

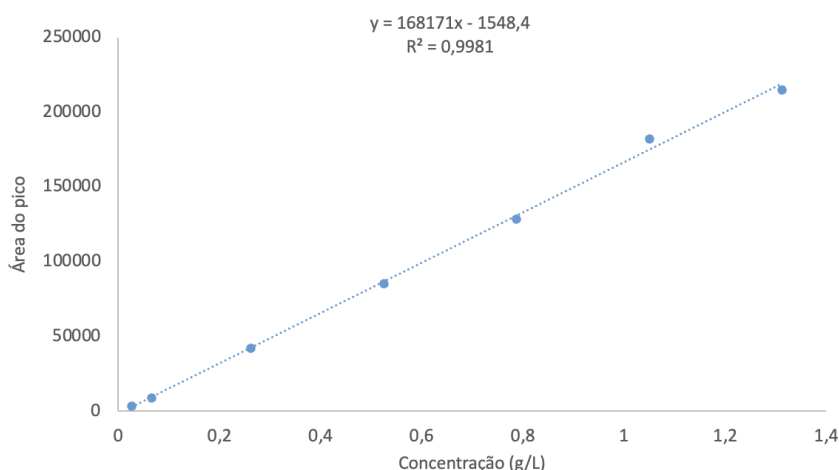
Após o preparo dos tubos e a adição do DNS, eles foram aquecidos por 5 minutos em banho seco, a uma temperatura de 100°C, sendo posteriormente refrigerados em banho de gelo e acrescidos de 1mL de água destilada. Após uma homogeneização, foi realizada a leitura de absorbância no leitor de placas Perkin Elmer EnSpire® (Waltham, USA), em um comprimento de onda de 540nm utilizando a placa de 96 poços (Miller, 1959).

Para a execução do método de Miller, foram utilizados 100µL de amostra e o mesmo volume do DNS, realizando também o procedimento idêntico ao descrito no tópico acima, sendo os resultados anotados e comparados com o modelo construído. A análise foi feita em duplicata.

4.3.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a realização da análise por HPLC, foi necessário passar 1mL da amostra por um filtro de 0,45µm com o auxílio de uma seringa, e após esse processo de filtração, foram realizadas as diluições específicas para cada um dos pontos, visando a obtenção de dados válidos na leitura. Em seguida, as amostras diluídas foram identificadas e as leituras foram realizadas na coluna Aminex Hpx-87h® da Bio-Rad (Berkeley, Estados Unidos), com ácido sulfúrico (0,05 M) como fase móvel sendo o cromatograma obtido utilizado para a identificação e quantificação da produção de ácido lático (Sayed *et al.*, 2020, modificado). A curva de calibração do ácido lático está representada pela Figura 5 abaixo, além de sua equação da reta, ela foi fornecida pelo departamento de bioprocessos e biotecnologia da faculdade de ciências farmacêuticas, Unesp Araraquara.

Figura 5 - Curva de calibração do ácido lático e sua respectiva equação da reta.



Fonte: DEBB, 2024

4.3.4. Quantificação de células por Unidade Formadora de Colônias (UFC)

4.3.4.1. Preparação das placas de cultivo

Foram pesados 26,125g de MRS e esses foram misturados com 8g de ágar bacteriológico e com 500mL de água destilada, conforme as especificações do fabricante. Em seguida, aproximadamente 10mL desse meio foram adicionados em cada placa de Petri, e estas foram armazenadas vedadas até seu uso.

4.3.4.2. Processo da quantificação

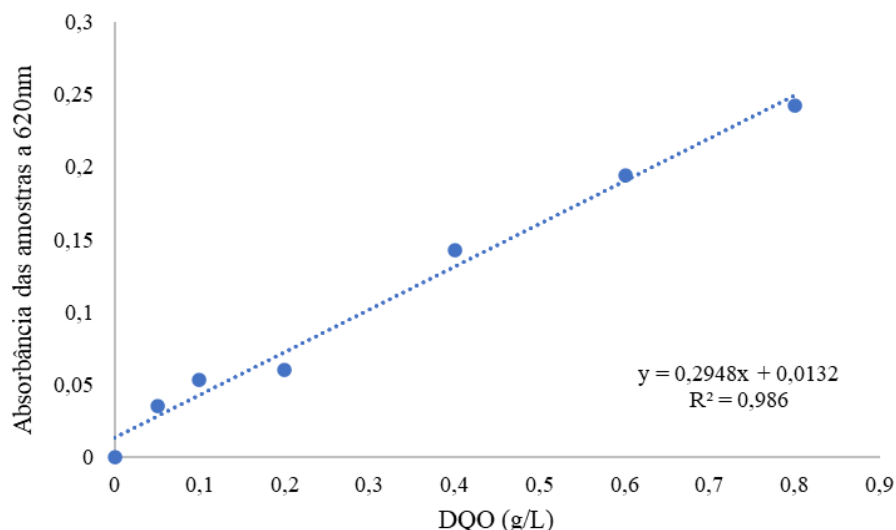
Ao longo do processo fermentativo em erlenmeyer, um ponto foi coletado de cada frasco após 24h de reação para fazer essa quantificação de células, e para que a leitura pudesse ser feita a olho nu, o processo visava que cada placa apresentasse de 30 a 300 unidades formadoras de colônia. Assim, foram realizados os cálculos de diluição para cada um dos tempos de coleta. Os seis pontos coletados na etapa de aumento de escala também foram analisados e diluídos para a quantificação.

Dessa forma, 100µL de cada ponto foram plaqueados seguindo a técnica de espalhamento, e em seguida incubados na incubadora BOD SL 200, a 30°C por 24h. Após o processo de crescimento, foi realizada a contagem das células a olho nu.

4.3.5. Análise de Demanda Química de Oxigênio

Inicialmente, foram misturadas 10,12g de sulfato de prata em 1L de ácido sulfúrico concentrado. Depois, foi feita a solução de digestão, misturando-se sulfato de mercúrio (33,3 g/L), dicromato de potássio (10,216 g/L), ácido sulfúrico (167 mL/L), em água destilada e hidrogenoftalato de potássio (padrão primário) de modo que 1 mg de KHP apresenta DQO de 1,176mg. As soluções foram manipuladas dentro da capela e com o uso de luvas nitrílicas. Foi fornecida a curva analítica pelo Prof. Dr. Guilherme Peixoto, representada pela Figura 6.

Figura 6 - Curva analítica de DQO com a solução de KHP.



Fonte: Prof. Dr. Guilherme Peixoto, 2024

Em seguida, o digestor foi acionado para uma temperatura de 150°C. A amostra de soro fermentado foi filtrada, e, em capela de exaustão, 2,5mL dela foi

coletada usando a pipeta automática, e adicionada em um tubo de ensaio de 12mL (Hach®). Depois, adicionou-se 1,5mL da solução de digestão e 3,5mL da solução de ácido sulfúrico+sulfato de prata, sendo essa mistura agitada em vórtex, e o ensaio conduzido em duplicata. Também foi produzido o tubo considerado “branco”, o qual, ao invés da amostra, continha 2,5mL de água destilada.

Na etapa seguinte, levou-se os tubos envoltos em papel alumínio para o digestor a 150°C por 2h. Após esse período, as amostras foram resfriadas em ausência de luz, e seguiram para a leitura de absorbância em cubetas de vidro no espectrofotômetro Bel Photonics® (Valinhos/Brasil), a um comprimento de onda de 620nm. Os valores foram anotados com base no branco, e foi possível o cálculo da demanda química de oxigênio (Aquino *et al.*, 2006, modificado).

4.3.6. Análise por Cromatografia Gasosa

Após a realização do processo de metilação das amostras de soro e biomassa, descrito no ponto 4.2.5.3, foi possível a análise por cromatografia gasosa para a determinação do perfil lipídico. Os frascos passaram por um processo de filtração a 0,45µm, e as amostras foram injetadas no cromatógrafo gasoso da Shimadzu® (Kyoto, Japão). A coluna utilizada foi a *Stabilwax-DA* de comprimento de 30 m e a composição lipídica foi obtida através do método Ce-2-66 da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 2011).

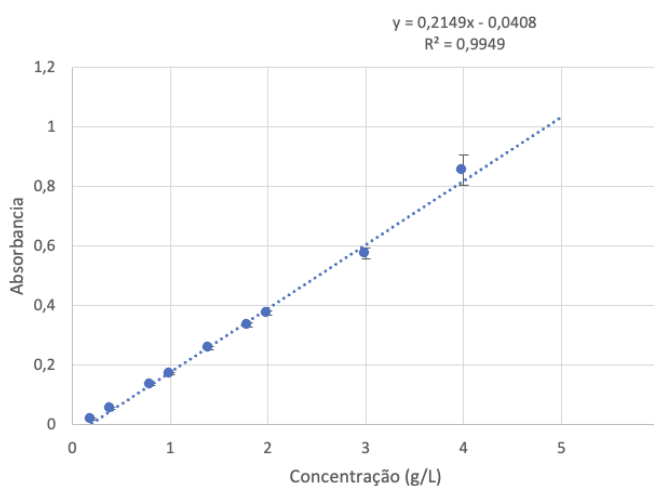
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do Soro de Leite

5.1.1. Açúcares redutores

A partir da montagem da curva de calibração, representada pela Figura 7, obteve-se a equação 11. Através da análise da curva é possível afirmar que a mesma se adequa bem ao modelo linear, ao passo que seu coeficiente de determinação ficou bem próximo à 1. Dessa forma a determinação da concentração de açúcares redutores com base nela foi realizada de forma mais assertiva, assim determinou-se que o soro de leite possui cerca de $31,68 \pm 3,45$ g/L de açúcares redutores.

Figura 7 - Curva de calibração para o método do Miller



Fonte: Autores, 2024

$$y = 0,2149x - 0,0408 \quad (\text{Equação 11})$$

Ademais, foi realizada a medição dos açúcares redutores presentes no soro de leite filtrado, como dito anteriormente, ele foi obtido após o processo de autoclavagem do soro de leite, no qual ocorreu a formação de coágulos que foram posteriormente filtrados. O resultado dessa filtração (filtrado) foi analisado, nele estão presentes $23,11 \pm 0,86$ g/L de açúcares redutores. Esta diferença, entre o soro bruto e o filtrado, pode ter ocorrido devido a uma parcela dos açúcares terem ficado retidos nos coágulos que foram removidos.

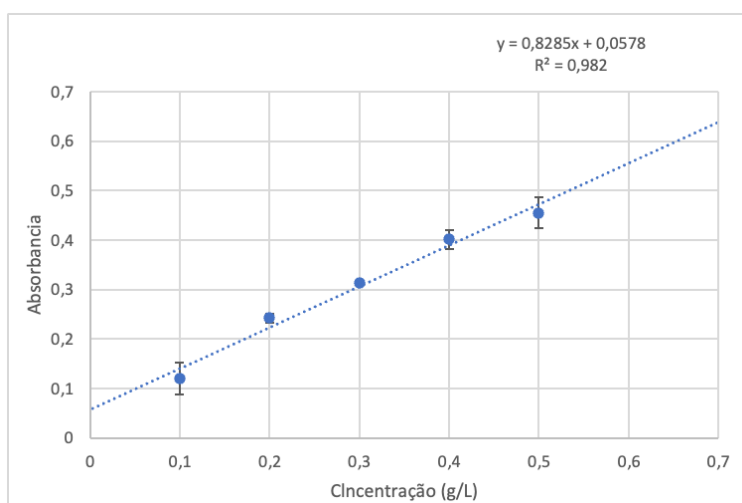
Em comparação com os dados da literatura, o soro de leite utilizado no presente trabalho apresenta uma concentração inferior ao padrão. Normalmente, o

soro de leite contém cerca de 55% dos nutrientes do leite, sendo composto por aproximadamente 93% de água, 5-6% de lactose, 0,85% de proteína, 0,53% de minerais e 0,36% de lipídios. Porém, essas diferenças são normais de ocorrerem, uma vez que a composição do soro varia de acordo com o tipo de queijo do qual este foi extraído e das etapas de processamento (Jorge *et al.*, 2021).

5.1.2. Proteínas totais

De forma análoga à determinação dos açúcares totais, também foi montada uma curva de calibração (Figura 8) para a determinação de proteínas cuja equação está representada na Equação 12. Da mesma forma, a curva se adequou bem ao modelo linear. Assim, a concentração de proteínas totais pode ser determinada em cerca de $2,09 \pm 0,32$ g/L de proteínas. Já o soro de leite filtrado, apresentou uma concentração de $1,13 \pm 0,08$ g/L.

Figura 8 - Curva de calibração para o método de Bradford



Fonte: Autores, 2024.

$$y = 0,8285x + 0,0578 \quad (\text{Equação 12})$$

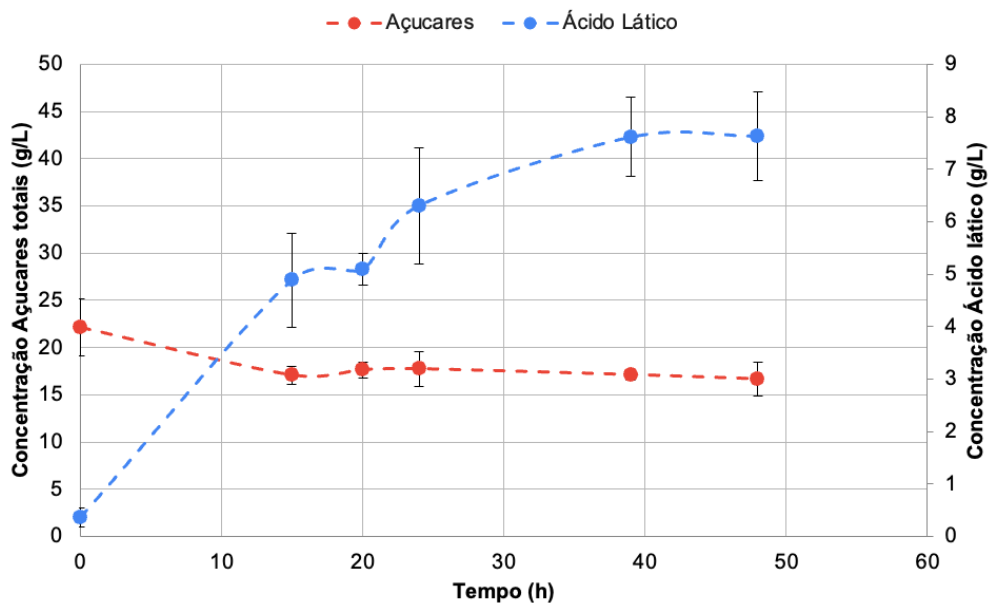
Novamente, a diferença entre o soro bruto e o soro obtido após a remoção dos coágulos, se dá pelos coágulos serem compostos principalmente pelas proteínas que desnaturam no momento da autoclavagem em alta temperatura.

5.2. Produção de ácido láctico em diferentes meios de cultura

Para avaliar a produção de ácido láctico foram utilizadas duas composições de soro de leite, filtrado e coagulado, e o meio MRS, este foi utilizado como um controle positivo uma vez que é muito utilizado para o cultivo de bactérias lácticas. As figuras

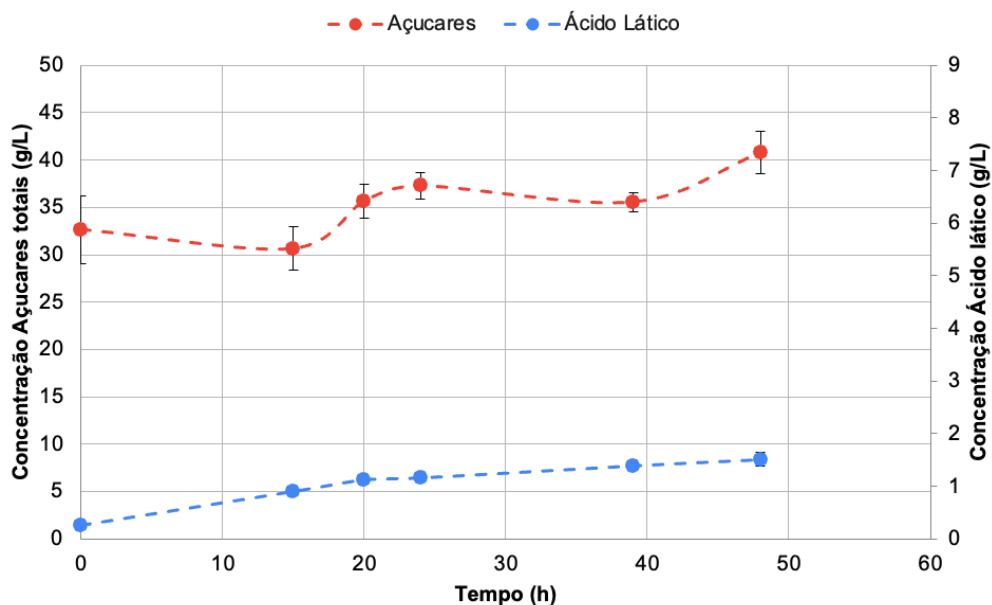
9, 10 e 11 representam a produção de ácido láctico e o consumo de açúcares ao longo do tempo para cada um dos meios, MRS, soro de leite filtrado e o coagulado, respectivamente. A partir deles, é possível afirmar que de uma forma geral as triplicatas realizadas foram uniformes, uma vez que o desvio padrão foi baixo, salvo pela produção do ácido no meio MRS, que apresentou um desvio maior.

Figura 9 - Produção de ácido láctico em relação ao tempo no meio MRS

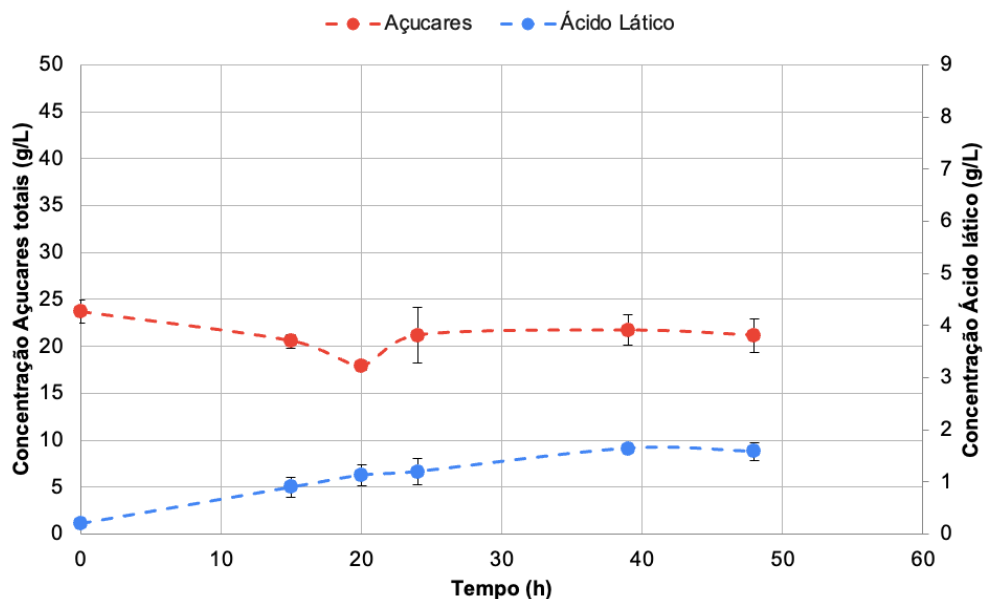


Fonte: Autores, 2024

Figura 10 - Produção de ácido láctico em relação ao tempo no Soro de Leite Filtrado



Fonte: Autores, 2024

Figura 11 - Produção de ácido láctico em relação ao tempo no Soro de Leite Coagulado

Fonte: Autores, 2024

Em todos os casos é possível constatar que houve uma oscilação na concentração de açúcares redutores, ao contrário do que seria o esperado, uma vez que não se observou um decaimento constante que representaria o consumo da fonte de carbono. Porém, no caso do meio MRS o aumento da concentração dos açúcares redutores foi mínima, podendo ser resultante de erros experimentais. Já em relação aos soros, o aumento da concentração de açúcares pode estar relacionado com a análise utilizada, o método de Miller (1959) identifica tanto a lactose quanto os monossacarídeos que a formam, glicose e galactose, dessa forma quando o microrganismo quebra uma molécula de lactose ele gera outros dois açúcares que são identificados pelo método, por isso a quantidade de açúcares redutores oscila.

Cabe ressaltar também que o DNS reage de formas diferentes com os monossacarídeos e os dissacarídeos, de forma a gerar distinções pequenas, porém, relevantes nas leituras de absorbância nos produtos da reação. Saqib e Whitney (2011) afirmam que essas alterações podem causar diferenças expressivas nos resultados obtidos para amostras com misturas de açúcares redutores e, portanto, devem ser analisadas com cuidado. Com isso, é correto afirmar que os elevados desvios observados nos gráficos são decorrentes desse comportamento.

No gráfico presente na Figura 11, é possível observar que a concentração inicial de açúcares redutores no soro de leite filtrado é diferente da quantificada antes do início do experimento. Isso se deve ao fato de o mesmo ter sido autoclavado duas vezes, após o primeiro processo de esterilização realizado ocorreu a formação dos grumos, então para a retirada dos mesmos ele perdeu a sua esterilidade, dessa forma foi necessário realizar outro processo de autoclavagem. Esses repetidos ciclos de assepsia podem ter resultado na quebra das moléculas de lactose em glicose e galactose, uma vez que o aquecimento desse dissacarídeo a temperaturas superiores a 80 °C podem levar a hidrólise do mesmo (Berg, 1993 *apud* De, 2022). Como dito anteriormente, a quebra do mesmo gera alteração na leitura do resultado obtido pelo método de Miller (1959).

Já em relação à produção de ácido láctico, foi observada uma produção maior no meio MRS, atingindo um pico de $7,63 \pm 0,84$ g/L, enquanto os soros coagulado e filtrado apresentaram resultados mais baixos, porém semelhantes, com pontos máximos de produção de $1,64 \pm 0,05$ g/L e $1,51 \pm 0,13$ g/L, respectivamente. Em um estudo conduzido por Cock e Stouvenel (2006), o *Lactococcus lactis* foi utilizado e as autoras implantaram condições semelhantes às empregadas no presente projeto, sendo elas 20 g/L de glicose, pH 6 inicial e 32 °C com uma duração de 48 h, no entanto, elas atingiram uma produção de 13,7 g/L do ácido. Essa diferença provavelmente está ligada à cepa da bactéria, uma vez que as autoras a isolaram de um canavial, logo é esperado que as mesmas tenham uma maior facilidade em metabolizar glicose.

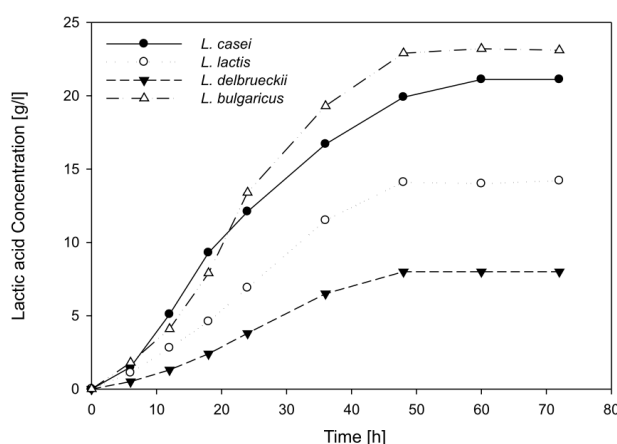
Por outro lado, no estudo realizado por Lopes (2009), é realizado ensaios com diferentes cepas de bactérias lácticas em meio MRS (pH 6, 30 °C, 150 rpm) durante 72h, foram obtidas concentrações de 5,85; 7,35; 12,75 e 15,30 g/L de ácido láctico respectivamente pelas bactérias *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.1, *Lactobacillus fermentum* 292B e *Lactobacillus delbrueckii* 103.10.2. Nesse caso, o presente estudo apresentou resultados superiores às duas primeiras cepas. A partir disso, é possível concluir que a baixa produtividade de ácido láctico em meio MRS pode tanto estar ligada a cepa escolhida, como ao tempo de cultivo e ajustes finos nos demais parâmetros utilizados no experimento, como temperatura e pH.

Com relação aos ensaios realizados com soro de leite, eles podem ser comparados com a análise realizada por Rojas, Montañó e Bastidas (2015), nesse

estudo os autores utilizaram soro de queijo (47 g/L de lactose, 72h de fermentação) suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como meio para uma cultura contendo *Lactobacillus delbrueckii* e *Streptococcus thermophilus*. Nele, os autores atingem a produção de 36,7 g/L, que foi muito superior à determinada neste projeto. Essa grande diferença pode estar relacionada a dois fatores, o primeiro seria a utilização de duas cepas distintas que ao trabalhar em conjunto podem superar o metabolismo do *Lactococcus lactis*, mas pode ser simplesmente em decorrência à suplementação de fontes de nitrogênio, que podem ter potencializado o metabolismo das células utilizadas.

Em outro estudo realizado por Taleghani, Najafpour e Ghoreyshi (2016), foram comparados o desempenho da produção de ácido láctico por 4 diferentes bactérias, *L. delbrueckii* ATCC 9649, *L. casei* ATCC 39392, *L. bulgaricus* ATCC 11842 e *Lactococcus lactis* ATCC 11454. A fermentação láctica dessas cepas foi realizada em soro de queijo contendo 50 g/L de lactose e suplementado com extrato de levedura, ela foi conduzida por 72h e o resultado está presente na Figura 12. A partir dela é possível concluir que o *Lactococcus lactis* apresentou o segundo pior desempenho entre as cepas analisadas, indicando que não seria a mais adequada para a produção de ácido láctico. No entanto, ainda assim, a concentração de ácido atingida por ela foi muito superior à apresentada no presente estudo, essa grande diferença possivelmente está ligada à suplementação de nitrogênio, já que as demais condições de cultivo são semelhantes.

Figura 12 - Produção de ácido láctico em relação ao tempo



Fonte: (Taleghani; Najafpour; Ghoreyshi, 2016)

Ademais, o cálculo do rendimento do processo foi realizado considerando que os açúcares redutores presente no ponto zero do experimento eram apenas lactose para ambos os soros. A partir da Equação 1 e Equação 2 é possível calcular a produção teórica de ácido láctico. Com esse dado em mãos, calculou-se o rendimento com base na Equação 3. A Tabela 3 apresenta os resultados do cálculo do rendimento, com base em sua análise é correto afirmar que o rendimento foi baixo em todos os casos, isso pode ser explicado tanto pela baixa disponibilidade de substrato, como pode ser observado na comparação realizada anteriormente, de modo que os estudos que utilizaram concentrações maiores de fontes de carbono obtiveram resultados melhores.

Tabela 3 - Rendimento da produção de ácido láctico para cada um dos meios

Meio de Cultura	Rendimento teórico	Produto gerado (g/L)	Rendimento (%)
MRS	44,26	7,63*	17,24*
Soro Coagulado	47,38	1,64	3,46
Soro filtrado	65,31	1,51	2,32

* - indica diferença estatisticamente significativa (teste tukey, $p = 0,05$)

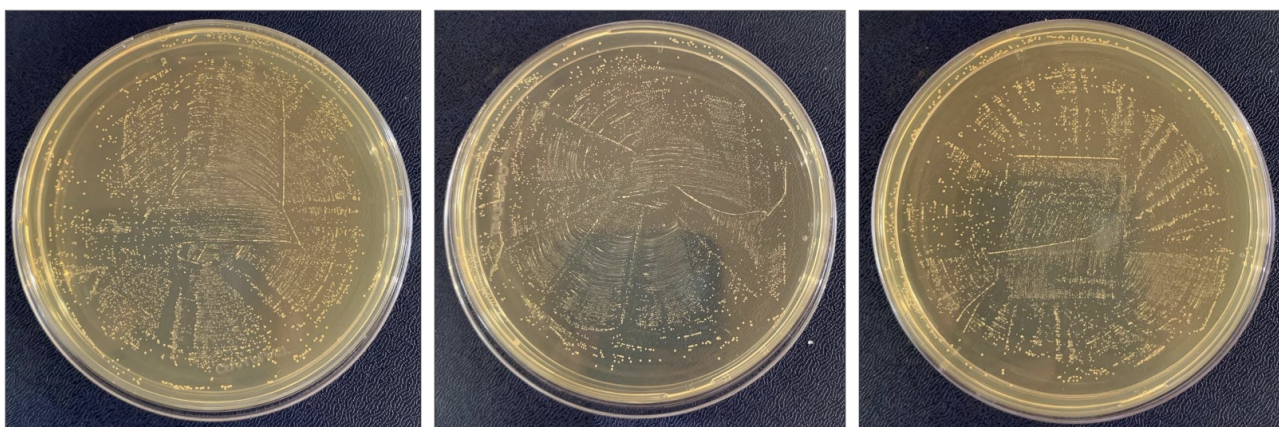
Fonte: Autores, 2024

No estudo realizado por Cock e Stouvenel (2006), as autoras também testaram concentrações maiores de fonte de carbono, que resultam em uma produção maior de ácido láctico. Elas também estudaram a influência do controle do pH e essa relação se torna bem visível no ensaio feito com 60 g/l de glicose, no qual, com o controle de pH foram produzidos 32,3 g/L, mas sem ele foram gerados apenas 10,09 g/L de ácido láctico. Isso se deve à inibição gerada pelo próprio produto ao promover a redução do pH do meio.

No estudo realizado por Rallu, Gruss e Maguin (1996 *apud* Rachwał; Gustaw, 2024) os autores comprovaram para valores de pH inferiores a 4,5 a viabilidade celular do *Lactococcus lactis* decai exponencialmente. Provavelmente, foi isso que ocorreu no presente trabalho, visto que o pH ao final do período de fermentação foi de 4,4 aproximadamente em todas as condições avaliadas, então o mais provável é que a produção tenha sido inibida pelo produto.

Por fim, também foi realizada uma análise do crescimento das células em cada meio de cultura, como foi dito anteriormente, o ponto foi retirado após 24h, uma vez que esse ponto representa a metade do experimento. Nas Figuras 13, 14 e 15, têm-se as fotos das triplicatas das placas de Petri nas quais foram cultivadas as amostras dos meios MRS, Soro Filtrado e Soro Coagulado, respectivamente, com diluição de 1000 vezes para possibilitar uma comparação entre as placas. Cabe ressaltar que essa seria uma análise subjetiva, a única conclusão objetiva que pode ser sustentada é de que em todas as placas existem mais de 300×10^3 células, visto que esse é o número máximo de células que poderiam ser contabilizadas manualmente, uma vez que, de acordo com o método, 300 é o número máximo de colônias que seria possível contar (Alst *et al*, 2023).

Figura 13 - Fotos das Culturas Plaqueadas do meio MRS



Fonte: Autores, 2024

Figura 14 - Fotos das Culturas Plaqueadas do meio Soro de Leite Filtrado



Fonte: Autoral, 2024

Figura 15 - Fotos das Culturas Plaqueadas do meio Soro de Leite Coagulado



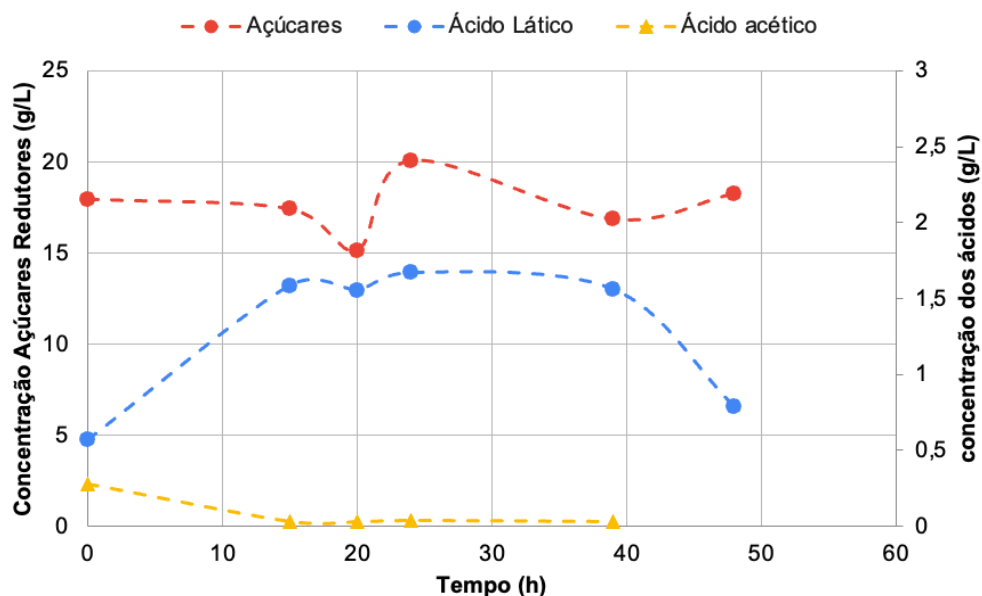
Fonte: Autoral, 2024

A partir da observação do crescimento das colônias nas placas de uma maneira geral, é possível afirmar que o mesmo foi maior nas placas feitas com amostras do soro de leite coagulado, e essa característica é enfatizada pela presença de um menor número de espaços sem colônias. Com isso em mente, também é correto afirmar que as células cresceram menos no meio de soro de leite filtrado.

Portanto, entre as composições de soro de leite, é possível afirmar que o soro coagulado é mais favorável ao crescimento do microrganismo, pois proporcionou uma maior reprodução do mesmo. Em contrapartida, ao realizar o teste de tukey ($p = 0,05$) para averiguar se houve ou não diferenciação significativa em relação à produção de ácido láctico entre esses dois meios, observou-se que ela não existe, então, pode-se afirmar que filtrar ou não o soro após a sua coagulação não afeta a produção de ácido láctico.

5.3. Avaliação da produção em Reator STR operando em batelada

Para a produção de ácido láctico no reator foi utilizado o soro coagulado, já que o mesmo promoveu um maior crescimento das células, além disso, a sua utilização evita a etapa de filtração, podendo assim promover uma redução tanto do custo final do processo quanto do tempo necessário para realizá-lo. A Figura 16 representa um gráfico da produção de produto e o consumo de açúcares ao longo do tempo e nele é possível observar o mesmo comportamento oscilatório dos açúcares redutores que ocorre, como foi dito anteriormente, principalmente devido à quebra da lactose em glicose e galactose.

Figura 16 - Produção de ácido láctico em relação ao tempo no Reator

Fonte: Autores, 2024

Em relação à produção de ácido láctico, foi constatado um pico de geração maior que o observado no ensaio anterior, atingindo 1,86 g/L de ácido láctico, esse aumento pode estar ligado ao menor contato do microrganismo com o oxigênio atmosférico promovido pela configuração do reator. No entanto, também ocorreu a diminuição da concentração do ácido láctico ao longo do tempo, representando uma perda de cerca de 47% em relação ao pico de produção. Uma hipótese para justificar essa perda de ácido láctico pode ser que não houve uma real degradação do mesmo, mas sim a sua ionização em Lactato, que por sua vez não é detectado pela coluna utilizada.

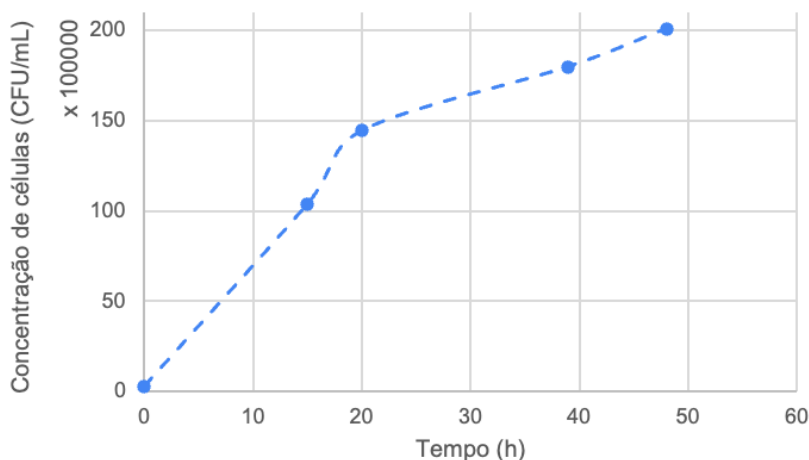
Por outro lado, diferentemente dos ensaios anteriores, neste foi observada a produção de ácido acético, um subproduto da fermentação láctica. Apesar de ter sido uma produção muito pequena, como é possível observar no gráfico, ela pode ter impactado no rendimento da produção do ácido, uma vez que ao invés de o piruvato ser convertido para ácido láctico ele virou ácido acético, diminuindo o rendimento da produção da molécula de interesse. Vale ressaltar que a fermentação láctica também apresenta outros subprodutos como etanol e 2,3-butanodiol (Kleerebezem *et al.*, 2020).

Em relação ao crescimento celular, o mesmo foi analisado em cada ponto por meio da contagem das unidades formadoras de colônia. No entanto, devido ao grande número de colônias presentes em alguns casos não foi possível realizar uma

quantificação precisa, então foi montado um gráfico (Figura 17) de número de unidades formadoras de colônia em relação ao tempo, considerando a aproximação realizada anteriormente para os pontos nos quais não foi possível realizar a contagem.

A partir da análise do mesmo, é possível afirmar que o microrganismo ainda não atingiu o seu pico de crescimento. No trabalho realizado por Abreu (2014), o autor cultivou a bactéria *Lactococcus lactis* em soro de leite e obteve um pico de concentração de 10^{12} UFC/mL, com aproximadamente 48h do início do experimento, no entanto, a concentração inicial do mesmo foi de 10^6 UFC/mL, o que pode indicar que o microrganismo estava próximo a atingir o seu pico, uma vez que Abreu obteve um aumento de 10^6 vezes em um intervalo de 48h, e o presente estudo obteve um aumento de 10^5 . Dessa forma, considerando que a variação do crescimento será parecida, é possível afirmar que o microrganismo estava próximo ao seu ponto máximo de crescimento e que a taxa de crescimento está mais baixa.

Figura 17 - Crescimento de Células em relação ao tempo



Fonte: Autores, 2024

Ademais, o rendimento da produção foi calculado de forma análoga à descrita anteriormente, assim obteve-se um rendimento de cerca de 5,17%, que foi superior aos ensaios iniciais com soro coagulado. Esse aumento no rendimento pode ser resultante de uma melhor homogeneização do meio proporcionada pelo reator. No trabalho realizado por Büyükkileci e Harsa (2004), os autores atingiram uma produção de 45 g/L de ácido láctico utilizando o *Lactobacillus casei*, com uma concentração inicial de 48,7 g/L de Lactose presente no soro de leite, atingindo mais

de 90% de rendimento. Cabe ressaltar que foi utilizado um reator do tipo STR com controle de pH e 200 rpm.

Já no trabalho realizado por Sirisansaneeyakul *et al*; 2024, os autores utilizam o *Lactococcus lactis* imobilizado em um reator de leite empacotado, com isso eles atingiram uma produção de 30 g/L de ácido láctico. Em outro trabalho realizado por Zacharof e Lovit (2013), os autores também utilizaram o *Lactococcus lactis* em um reator CSTR, com controle de pH em 6,5 e utilizando glicose como fonte de carbono conseguiram atingir uma produção de aproximadamente 37 g/L de ácido láctico. Com isso é possível afirmar que a produção de ácido láctico do presente estudo foi muito baixa em comparação à literatura, provavelmente devido à inibição pelo produto como explicado anteriormente, já que o pH final do soro fermentado também foi de 4,4.

Por fim, foi realizada uma análise da quantidade de matéria orgânica presente no soro de leite antes e depois do processo de fermentação. O objetivo dessa análise foi de quantificar se o microrganismo foi capaz de remover a matéria orgânica presente no resíduo e observou-se que o soro bruto apresentou uma DQO de $36,28 \pm 9,47$ g/L e o produto da fermentação de $36,20 \pm 7,47$ g/L. Com base nela, tem-se que não houve uma diminuição significativa da quantidade de DQO, indicando que o microrganismo não foi capaz de removê-la. Esse resultado está ligado diretamente ao baixo rendimento do processo, uma vez que o microrganismo enfrentou dificuldades para converter o açúcar em ácido láctico, um grande representante da matéria orgânica presente no soro.

5.4. Purificação do ácido láctico produzido no reator

Como dito anteriormente, o processo de purificação foi realizado com o caldo fermentado proveniente do reator. Após todo o processo de purificação constatou-se que, na etapa final de clarificação, utilizando o carvão ativado durante o processo foi obtida uma concentração final de 5,33 g/L de ácido láctico, enquanto que, ao utilizar bentonita no final do processo, obteve-se uma concentração de 5,10 g/L. Dessa forma é possível afirmar que ambos os métodos apresentaram resultado satisfatório para a etapa final.

Para o cálculo do grau de pureza das amostras, foi utilizada a relação presente na Equação 7, a partir da qual esse parâmetro foi inferido para as amostras finais, após o processo de purificação, e para o ponto final de análise do reator.

Assim, tem-se os resultados presentes na Tabela 4, que demonstra que o grau de pureza aumentou cerca de seis vezes, mesmo em ambos os casos. Dessa forma, é possível afirmar que apesar de ainda estar muito abaixo do esperado, o método de purificação funcionou.

Tabela 4 - Grau de pureza das amostras

Amostra	Concentração (g/L)	Grau de Pureza (%)
Final com carvão ativado	5,33	0,44
Final com bentonita	5,10	0,42
Ponto final do reator	0,88	0,07

Fonte: Autores, 2024

De acordo com Ahmad, Banat e Taher (2020) o método de purificação por precipitação é um dos que apresenta menor porcentagem final de pureza, em torno de 71,49%, contudo, demonstra uma boa porcentagem de recuperação do produto, podendo chegar até 92%, além de ser de fácil operação, simples, confiável, e não gerar resíduos tóxicos, facilitando a aplicação em grandes escalas. Ainda segundo os autores, outros métodos podem atingir porcentagens maiores de pureza no produto final, porém, com baixas eficiências de rendimento e apresentando desvantagens em relação ao processo, como a geração de resíduos tóxicos ou dificuldade de aplicação em escalas industriais. Em outro trabalho, apresentado por Vijayakumar, Aravindan, e Viruthagiric (2007), os pesquisadores relataram ter atingido uma pureza de 90% com o método de precipitação, demonstrando o potencial da técnica. O grau de pureza final do ácido láctico implica no tipo de aplicação para o qual ele poderá ser direcionado, sendo um fator crucial no momento de escolha do método.

Provavelmente, o baixo grau de pureza obtido no presente trabalho é resultante da grande quantidade de impurezas do soro do leite. De qualquer forma, durante todo o processo foi possível observar a saída das substâncias que não eram de interesse, mas como a retirada efetiva dessas substâncias foi feita apenas na última etapa do processo, após a concentração no rotaevaporador, acabou

ocorrendo uma saturação do carvão ativado, que resultou na necessidade da repetição do processo de retirada desses compostos.

Dessa forma, provavelmente seria mais eficiente realizar uma primeira etapa de retirada das impurezas com carvão ativado ou bentonita antes da etapa de concentração, para facilitar tanto o processo final de separação, quanto às reações intermediárias, o que provavelmente resultaria em um aumento do grau de pureza final. Outra alternativa seria, ao invés de adicionar quantidades específicas de carbonato de cálcio e ácido sulfúrico com base na estequiometria da reação, adicionar carbonato de cálcio até que o pH fique próximo a 10 e, posteriormente, adicionar ácido sulfúrico até que o pH chegue próximo a 1.8, como é proposto por Vijayakumar, Aravindan, e Viruthagiric (2007).

5.5. Análise dos resíduos gerados pela produção

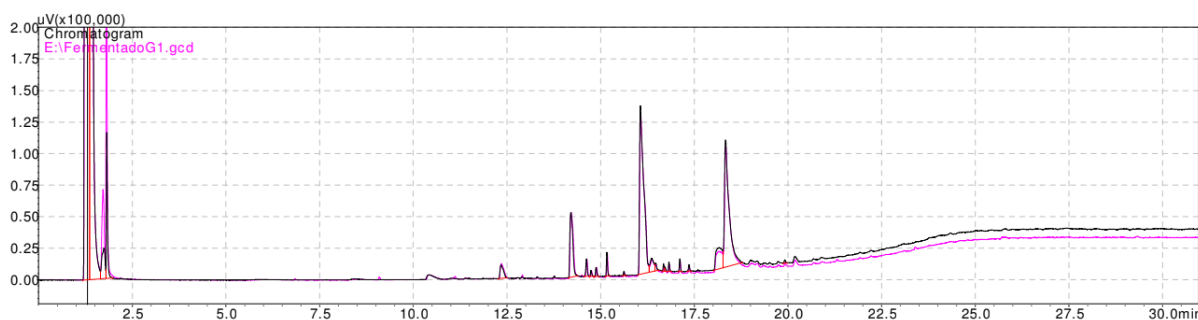
Ao final do processo de purificação, foram obtidos dois resíduos, a biomassa do microrganismo junto aos coágulos, obtida na primeira etapa de centrifugação, e as impurezas retiradas do caldo fermentado juntamente com o carvão ativado no final do processo de purificação. Na etapa de aquecimento e filtração, após a primeira centrifugação, não foi observada a formação de nenhum resíduo precipitado que pudesse ser removido através da filtração. Provavelmente isso se deu por conta da maioria das proteínas já terem sido precipitadas na forma de coágulos quando o soro foi autoclavado dentro do reator e, posteriormente, removidas com a centrifugação. A etapa de rotaevaporação removeu somente água, tendo um rendimento de aproximadamente 90% de remoção do volume total. Objetivando direcionar estes resíduos para um correto descarte ou um possível reaproveitamento, foram realizados uma série de testes para definir suas composições.

5.5.1. Biomassa

Para a análise da biomassa foi realizada a quantificação dos lipídeos e proteínas presentes, para que fosse possível determinar uma aplicação ou fazer a destinação correta da mesma. Assim, após a extração em *Soxhlet*, determinou-se por meio da massa de lipídeos extraídos a concentração que a biomassa apresenta. Foram obtidos cerca de 0,39g de lipídeos em 3g da biomassa seca, representando aproximadamente 13,14% de sua composição. Por meio da cromatografia gasosa, os ácidos graxos foram identificados ao comparar os tempos de retenção dos

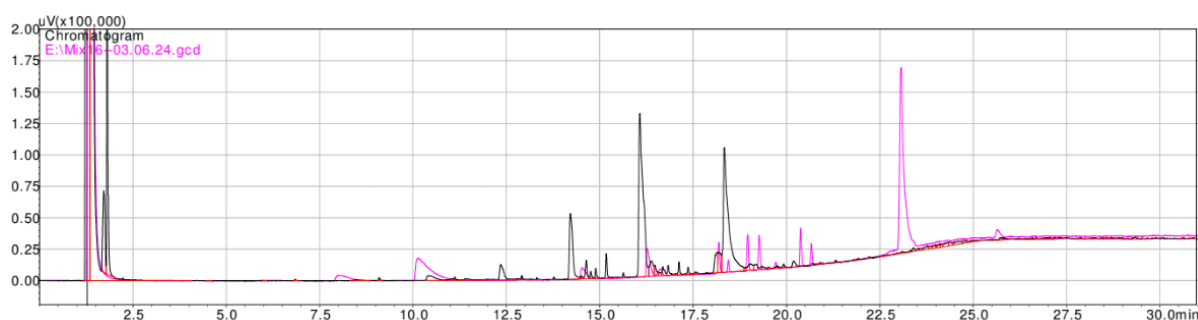
ésteres metílicos das amostras com aqueles dos padrões de ácidos graxos, resultando principalmente nos seguintes ácidos: palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1). Conforme Melo *et al.* (2018) estes são ácidos graxos comuns de serem encontrados no leite de vaca, portanto devem ser oriundos do soro de leite utilizado como meio de cultivo e que ficaram incorporados à biomassa. Ainda segundo o autor, o ácido oleico (C18:1), possui importantes propriedades nutricionais apresentando efeitos anticolesterolêmicos. A Figura 18 apresenta os cromatogramas sobrepostos da análise feita para a biomassa e para o soro fermentado, demonstrando que ambos contém os mesmos picos, já a Figura 19 compara as amostras com o mix de padrões de referência.

Figura 18 - Sobreposição dos cromatogramas da biomassa (preto) a e do soro fermentado (rosa).



Fonte: Autores, 2024.

Figura 19 - Sobreposição dos cromatogramas com a amostra padrão (rosa).



Fonte: Autores, 2024.

Por meio da análise pelo método de Kjeldahl, observou-se que não houve formação de borato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$) para provocar uma alteração na coloração da solução de ácido bórico contendo a mistura indicadora, dessa forma, impossibilitando a determinação da concentração de nitrogênio na amostra através da titulação. A biomassa analisada no método é composta em sua maior parte pelas proteínas do soro de leite que coagularam e foram removidas após a fermentação

na etapa de centrifugação, junto aos microrganismos, portanto, esta deveria apresentar uma alta concentração de nitrogênio, indicando que houve alguma falha no método. O método Kjeldahl é tipicamente dividido em macro, semi-micro e micro, de acordo com a quantidade de amostra necessária para a digestão e análise (MAPA, 2013). Essa variação depende do material a ser analisado: se o material possui um alto teor de nitrogênio, uma pequena quantidade pode ser suficiente, como no método de micro Kjeldahl. No entanto, se o teor de nitrogênio for baixo, uma pequena quantidade pode não ser representativa, sendo necessário utilizar o método macro Kjeldahl (Araújo, 2019).

5.5.2. Impurezas

Para determinar as impurezas presentes no carvão ativado foram utilizados métodos indiretos, uma vez que este é um resíduo semi-sólido, impedindo a realização de alguns testes, e que não poderia ser incinerado para a quantificação de sólidos totais, devido à presença do sulfato de cálcio que forma gases irritantes ao ser queimado (“ICSC 1589 - SULFATO DE CÁLCIO (ANIDRO)”, [s.d.]). Foi realizada uma filtração a vácuo, na tentativa de separar a parte sólida da líquida, porém sem sucesso.

Portanto, para determinar quais as impurezas retiradas juntamente com o carvão ativado, foi analisada uma amostra do soro fermentado antes de passar pelo processo de purificação, dessa forma, sendo possível descobrir quais os compostos passíveis de serem adsorvidos pelo carvão ativado nesse processo. As análises consistiram em quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), concentração de açúcares redutores pelo método de Miller (1959), demanda química de oxigênio (DQO) e quantificação de lipídeos. O perfil dos lipídeos presentes no soro fermentado foi o mesmo observado na análise da biomassa, conforme está representado na Figura 18.

Assim, observou-se que as impurezas consistem basicamente no sulfato de cálcio, formado pela adição do ácido sulfúrico ao lactato de cálcio na etapa de purificação, e as impurezas identificadas na análise do soro fermentado que podem ser adsorvidas no carvão (proteínas $6,20 \pm 0,27$ g/L, lipídeos 0,05% e açúcares $18,26 \pm 0,36$ g/L). Através da análise do soro fermentado retirado do reator, a carga de matéria orgânica ($36,20 \pm 7,47$ g/L) a ser removida ainda é alta, como citado anteriormente. Portanto, para definir o destino final dessa matéria, é preciso

considerar a redução dessa carga de matéria orgânica ou encontrar uma aplicação de reaproveitamento que tolere esses parâmetros.

5.5.3. Destino final dos resíduos

Com base nestes resultados, uma possível aplicação da biomassa resultante do processo de fermentação é destiná-la para a alimentação animal, pois apesar do baixo teor de proteínas, esta possui uma quantidade significativa de óleos com bons valores nutricionais. Este tipo de resíduo geralmente pode ser incorporado à dieta total dos ruminantes como substitutos, consórcios ou aditivos, principalmente devido às vantagens econômicas, como a redução dos custos da dieta, aumento da produção e eficiência alimentar. Além dos benefícios econômicos, a utilização desses resíduos na alimentação animal traz vantagens ambientais significativas, pois muitas indústrias não têm armazenamento adequado para tratar esses produtos, resultando em impactos ambientais e contaminação (Rodrigues, 2021).

O resíduo das etapas de purificação possui algumas limitações de aplicação como, por exemplo, não poder ser queimado para geração de energia, devido à liberação de gases irritantes, conforme citado anteriormente e, não poder ser descartado diretamente no ambiente de acordo com suas altas cargas de matéria orgânica. Porém, ele não apresenta nenhum componente tóxico e, de acordo com o Anexo V da Instrução Normativa MAPA nº 42 de 16/12/2010, tanto a bentonita quanto o sulfato de cálcio enquadram-se como aditivos tecnológicos. A bentonita atua como adsorvente, antiaglutinante e antiumectante, enquanto o sulfato de cálcio funciona como estabilizante e regulador de acidez. Como a bentonita apresentou um rendimento de purificação muito próximo ao do carvão ativado, esta se apresenta como uma boa alternativa para o processo de purificação, facilitando o destino final dos resíduos.

Assim, os resíduos formados no processo surgem como alternativas aos alimentos convencionais, promovendo a redução dos custos de produção e apoiando causas ambientais, desde que se observem as características e finalidades adequadas para a dieta dos animais.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que o processo de produção e purificação do ácido láctico com o *Lactococcus lactis* ainda tem muitos pontos para melhorar. Apesar de todos os processos terem sido realizados de acordo com a metodologia e a produção e purificação do ácido terem sido bem sucedidas, o rendimento do processo como um todo deixou a desejar. Na etapa de testes de meios de cultura foi obtida uma produção de $1,64 \pm 0,05$ g/L e $1,51 \pm 0,13$ g/L, respectivamente para o soro de leite coagulado e o filtrado, porém o esperado seria uma produção de pelo menos 30 g/L, essa grande diferença está ligada principalmente à inibição gerada pelo produto.

Seguindo para os testes em reator, observou-se um crescimento adequado do microrganismo, bem como um aumento na produção, no entanto não foi muito significativa, atingindo apenas 1,86 g/L. Por mais que o rendimento esperado para essa etapa não aumente muito em relação à anterior, estando por volta de 37 g/L, a produção alcançada não está próxima. Já com relação ao processo de purificação, ele resultou em um grau de pureza de 0,44% estando também abaixo do esperado.

Tem-se como resíduos ao final do processo a biomassa do *Lactococcus lactis* e as impurezas retiradas durante o processo de purificação, em ambos os componentes não há substâncias tóxicas, além de sua composição final ser adequada para aplicações na área de ração animal e suplementação de solos, a depender da utilização de bentonita e carvão ativado.

Desta forma, mesmo com um baixo rendimento no processo como um todo, este trabalho demonstrou um grande potencial de aprimoramento, visto que aproveitou um resíduo abundante no Brasil e no mundo, o soro de leite, resultando em um bioproduto em expansão com diversas possibilidades de aplicação, o ácido láctico. Sendo assim, com ajustes nos processos aqui descritos pode-se alcançar um processo econômico e sustentável, com a vantagem de ter uma economia circular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. C. **O Potencial Bioativo do Soro de Queijo Após Fermentação Lática Comparação de Diferentes Tipos de Soro**. Tese (Mestrado) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2014. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/32c6a132c965bc6232592e83a1d4aaef/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y>. Acesso em: 20 jun. 2024.

AHMAD, A.; BANAT, F.; TAHER, H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. **Environmental Technology & Innovation**, v. 20, p. 101138, nov. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186420314383?casa_token=O251X5j--WAAAAAA:GZ3WRoj6gO9hjnEpQNKVzoK7sLaHLmA7n9wJ9n8MIUAXi7cWtOH_ouEPiAxGZS3L82wBEvoav-A. Acesso em: 20 jun. 2024.

ALST, A. J. V. *et al.* **Growth Curves: Generating Growth Curves Using Colony Forming Units and Optical Density Measurements**. 2023. Disponível em <<https://www-jove-com-443.vpn.cdutcm.edu.cn/fr/v/10511/growth-curves-cfu-and-optical-density-measurements/?language=Portuguese>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ANDRADE, R. G. *et al.* Evolução Recente da Produção e da Produtividade Leiteira no Brasil. **Revista Foco**, v. 16, n. 5, p. 1-12, 2023. Disponível em: <https://ojs.focopublicacoes.com.br/foco/article/view/1888>. Acesso em: 19 jun. 2024.

American Oil Chemists' Society. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**, 2004, 5th ed. AOCS Press. Disponível em: <https://library.aocs.org/>. Acesso em: 19 jun. 2024.

AQUINO, S. F. DE; SILVA, S. DE Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 11, n. 4, p. 295–304, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/esa/a/XDQBygYqvJJC5RZdYsVKFbw/>. Acesso em: 19 jun. 2024.

ARAÚJO, M. **Revisão bibliográfica: avaliação do método de Kjeldahl na determinação de nitrogênio e sua aplicação na análise foliar**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso o (Bacharelado em química industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/25454>. Acesso em: 20 jun. 2024.

BARBOSA, A. R. M.; MONTE, A. M.; SILVA, A. K. M.; MURATORI, M. C. S. Resíduo de camarão para produção de proteases de interesse biotecnológico. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, v. 10, n. 1, 2021. Disponível em: <http://publicacoes.unifimes.edu.br/index.php/interacao/article/view/936>. Acesso em: 19 jun. 2024.

BEITEL, S. M.; COELHO, L. F.; CONTIERO, J. Efficient conversion of agroindustrial waste into D(-) lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* using fed-batch fermentation. **BioMed research international**, v. 2020, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2020/4194052>. Acesso em: 19 jun. 2024.

BERG, H. E. **Reactions of lactose during heat treatment of milk: a quantitative study**. Wageningen University and Research, 1993. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/52a299062071c45afb0f733b4034adfd/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>. Acesso em: 19 jun. 2024.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>. Acesso em: 18 jun. 2024.

CASTILLO MARTINEZ, F. A. *et al.* Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in food science & technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224412002683?casa_token=-mFTZ2igbYcAAAAA:KhOtixJs7sRqXHPYfEKJWLvFEfzh5KCn2WDkAUnXkcGTIPppqA8j9WNAvknbgRWj7dTUZCPX3s. Acesso em: 18 jun. 2024.

CHOUDHURY, N. R. **Lactic Acid Market**. 2022. Disponível em: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/lactic-acid-market>. Acesso em: 20 jun. 2024.

COCK, L. S.; DE STOUVENEL, A. R. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis subs lactis* isolated from sugar cane plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 0-0, 2006. Disponível em: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582006000100006&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 20 jun. 2024.

CORRÊA, L. S. M. S. **Extração e caracterização das proteínas, carboidratos, cinzas e lipídeos da biomassa de *scenedesmus sp.*** 2019. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/handle/11422/20141>. Acesso em: 20 jun. 2024.

DEY, B. *et al.* Influence of Heating on the Physico-Biochemical Attributes of Milk. **Current Nutrition & Food Science**, v. 19, n. 1, p. 32-42, 2023. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnf/2023/00000019/00000001/art00007>. Acesso em: 20 jun. 2024.

EMKANI, M.; OLIETE, B.; SAUREL, R. Effect of lactic acid fermentation on legume protein properties, a review. **Fermentation**, v. 8, n. 6, p. 244, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/8/6/244>. Acesso em: 19 jun. 2024.

EŞ, I. *et al.* Recent advancements in lactic acid production - a review. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 107, p. 763–770, 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918300012?casa_token=UYm8oPD20_kAAAAA:b0Tzrzdm1ggAZORMqIn0Lg0qezxySaEddDWgwQFtiFrE3BSqLC7xKWq6igF-0TImWOGk1uF4zDU. Acesso em: 19 jun. 2024.

GRAND VIEW RESEARCH. Market analyses report. *In*: Lactic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Raw Material (Corn, Sugarcane, Cassava, Yeast Extract), By Form (Dry, Liquid), By Application, By Region, & Segment Forecasts, 2024 - 2030. [S. l.], 2024. Disponível em:

<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>. Acesso em: 20 jun. 2024.

HARIS, S.; KAMAL-ELDIN, A.; AYYASH, M. M.; BRUGGEN, B. V.; MOHAMED, M. M.; AL-MARZOUQI, A. H. Production of lactic acid from date fruit pomace using *Lactobacillus casei* and the enzyme Cellic CTec2. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186423001475>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ICSC. **Sulfato De Cálcio (Anidro)**. Disponível em: https://chemicalsafety.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=pt&p_card_id=1589&p_version=2. Acesso em: 20 jun. 2024.

JORGE, L. L. *et al.* Aproveitamento Do Soro De Leite Na Elaboração De Bebida Láctea Não Fermentada Adicionada De Farinha De Banana Verde. **Editora Científica Digital eBooks**, p. 82–93, 1 jan. 2021. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/74878850/210605095-libre.pdf?1637316030=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAproveitamento_Do_Soro_De_Leite_Na_Elabo.pdf&Expires=1724125124&Signature=FwnKK4mYFytXZ7kncFt3F7bfdizAMXa2KWETwv2qxAVb-fXGd-IQo7z-ftLhUgzh5ApXMK45-hl~ihZnA0LYb2qMxv6w2X8oQQhOBwTOAPU6kNSYb~n751AmsEjznTGdrfG9p5jqp-YC~95Sr6SICfsA6~EQAgYU2iE-BeygjeiL2s2CwfUrRMDCQ1tXtRr6sGTM9hJdwmkHyGFazfZxGpWXXDgZRidK2W1gzZpByNW4jMt9WAIYU7775kSXnRr7Qrq2R9gAvD8AvJDZIIAVxVuapAoY5Yv8Nf~puP3msjOA6Pm69Kq9ywzdGH2CjRUCC8ppp5gch4iP1yHFIdm2g__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA. Acesso em: 20 jun. 2024.

KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 232–237, 2003. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166903000338?casa_token=hNXfR0VLL-wAAAAA:D6SGQ0-Jc2w383C8CpN6PzUk-bp2-5b9zObmGoMjl8y3Orv08KPzxHY1mhlK6eOoC2uKCmsyQm8. Acesso em: 20 jun. 2024.

KLEEREBEZEM, M.I. *et al.* Lifestyle, metabolism and environmental adaptation in *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 6, p. 804–820, 2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/44/6/804/5912834>. Acesso em: 19 jun. 2024.

KOMESU, A. *et al.* Lactic acid production to purification: A review. **Bioresources**, v. 12, n. 2, p. 4364–4383, 2017. Disponível em: https://bioresources.cnr.ncsu.edu/wp-content/uploads/2017/04/BioRes_12_2_4364_REVIEW_Komesu_OMF_Lactic-Acid_Production_Purification_10509.pdf. Acesso em: 20 jun. 2024.

KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J. Lactic acid bacteria. Em: **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 3–41. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-60021-5_6. Acesso em: 19 jun. 2024.

LAUFFER, O. L. **Produção biotecnológica de ácido láctico a partir de diferentes fontes de carbono**. Tese (Trabalho de Diplomação)- Departamento de Engenharia

Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/231027>. Acesso em: 19 jun. 2024.

LOPES, Â. R. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meio de cultivo**. Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 2008. Disponível em <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/373cabb5-69a1-40ac-bf69-117b1ea78f06/content>. Acesso em: 15 abr. 2024.

MAGALHÃES, V. C. **Sugestão nº34/2023** - Comissão de legislação participativa. Brasília, 2023. Disponível em https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=2356983#:~:text=Alguns%20dados%20gerais%20podem%20ser,dispon%C3%ADveis%20at%C3%A9%20setembro%20de%202021%3A&text=O%20Brasil%20%C3%A9%20um%20dos,1%2C5%20milh%C3%A3o%20de%20toneladas. Acesso em: 19 jun. 2024.

MAPA. **Instrução normativa nº 42, de 16 de dezembro de 2010**. Estabelece critérios e procedimentos para a fabricação, fracionamento, importação e comercialização dos produtos isentos de registro, e dá outras providências. [S. l.], 17 dez. 2010. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/InstruoNormativaMAPAn42de16122010.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2024

MAPA. **Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método Micro-Kjedahl**. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivosmetodos-da-area-poa-iqa/met-poa-11-02-proteinas.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2024.

MELO, M. T. P. *et al.* Composição de ácidos graxos do queijo e leite de vacas alimentadas com casca de banana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 965–974, jun. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/7rw8zwM4VvF35qM8s3g8JqM/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, U. S, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030?casa_token=vtmVwQckyDYAAAAA:QFxFacV2alnuxfRpeG-CojCIPmtUQKE2fFuTzykzOuflrtWzat57A_iXxO36rYD5x-TpYLQfvBOOFNRF. Acesso em: 20 jun. 2024.

MONTEIRO, M. P. *et al.* Genetically engineered *Lactococcus lactis* strain constitutively expresses GABA-producing genes and produces high levels of GABA. **Letters in applied microbiology**, v. 77, n. 6, 2024. Disponível em: https://academic.oup.com/lambio/article-abstract/77/6/ovae051/7685527?redirectedFrom=fulltext&casa_token=h_NOYqbXXnUAAAAA:9y2_EhHmC8zCULLanm8FxcjN1_HEFB71QX1ctRzdN7Xj69v02m6GKVdRDV1ZrCj4mPnvYPWpa6hSQFs. Acesso em: 20 jun. 2024.

MORA-VILLALOBOS, J. A. *et al.* Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 23, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/1/23>. Acesso em: 19 jun. 2024.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho do mercado de ácido láctico e análise de ações – Tendências e previsões de crescimento (2024 – 2029)**. 2024. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/lactic-acid-market>. Acesso em: 20 jun. 2024.

MUKHERJEE, P.; RAJ, N.; SIVAPRAKASAM, S. Harnessing valorization potential of whey permeate for D-lactic acid production using lactic acid bacteria. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 13, n. 17, p. 15639–15658, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-023-05038-3>. Acesso em: 19 jun. 2024.

OJO, A. O.; DE SMIDT, O. Lactic acid: A comprehensive review of production to purification. **Processes (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 3, p. 688, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/11/3/688>. Acesso em: 19 jun. 2024.

PRASAD, S. *et al.* Homo-fermentative production of d-lactic acid by *Lactobacillus sp.* employing casein whey permeate as a raw feed-stock. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 6, p. 1303–1307, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-014-1482-9>. Acesso em: 20 jun. 2024.

RACHWAŁ, K.; GUSTAW, K. Lactic Acid Bacteria in Sustainable Food Production. **Sustainability**, v. 16, n. 8, p. 3362, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/16/8/3362>. Acesso em: 20 jun. 2024.

RALLU, F.; GRUSS, A.; MAGUIN, E. *Lactococcus lactis* and stress. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 243-251, 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00395935>. Acesso em: 19 jun. 2024.

RAMCHANDRAN, L. *et al.* Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis ssp. cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process. **Journal of membrane science**, v. 403–404, p. 179–187, 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738812001585?casa_token=b_1n-OVhQBYAAAAA:8euETZrqeVPSX61t_23DZdB-gPACp4Lh8oNKaUCQtM40fFNwmURaCOicdMpYc9Du8BLlpm77tl4. Acesso em: 19 jun. 2024.

REVADAM, R. Como o soro de leite passou de um descarte poluente para uma matéria-prima em produtos caros. **Brasil de Fato**. 17 out. 2021. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2021/10/17/como-o-soro-de-leite-passou-de-um-descarte-poluente-para-uma-materia-prima-em-produtos-caros>. Acesso em: 19 jun. 2024.

RODRIGUES, L. Utilização De Resíduos Agroindustriais Na Alimentação De Ruminantes. **Repositorio ifgoiano**, 26 fev. 2021. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/1661>. Acesso em: 19 jun. 2024.

ROJAS, A. M.; MONTAÑO, L. P.; BASTIDAS, M. J. Produção de ácido láctico de soro de leite coalhado usando *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. **Revista Colombiana de Química**, v. 44, n. 3, p. 5-10, 2015. Acesso em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28042015000300001&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 20 jun. 2024.

SANDIM, F. L. S. **Caracterização de soro de queijo produzido na microrregião de Ubá**. Tese (Mestrado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais. Rio Pomba, 2018. Disponível em: <https://ri.ufs.br/handle/riufs/19229>. Acesso em: 20 jun. 2024.

SAQIB, A.; WHITNEY, P. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono-and di-saccharide sugars. **Biomass and bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4748-4750, 2011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411004673?casa_token=YjvFkOz2nk4AAAAA:761IIVY491-v_vxmlQxZtLCS54KEme_nUeroQndc5hGvb5CIVCLSoCpZZ3P8_Jeovfq3A8DnH5k. Acesso em: 19 jun. 2024.

SAYED, W. *et al.* Production of lactic acid from whey permeates using lactic acid bacteria isolated from cheese. **SVU- International Journal of Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2, p. 78–95, 2020. Disponível em: https://svu.journals.ekb.eg/article_113480.html. Acesso em: 19 jun. 2024.

SHI, Z. *et al.* Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors. **Enzyme and microbial technology**, v. 51, n. 5, p. 263–268, 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022912001202?casa_token=BrCm79D1EDkAAAAA:m-Mj3RB6tw_HtUSIXJN3ZUkF5BHGwr1mAbqLOGwsEfFPKvF3v47Y8F-xCghausPpE2QeL-qlxXk. Acesso em: 19 jun. 2024.

SIRISANSANEEYAKUL, S. *et al.* Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 381, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/jimb/article/34/5/381/5993054>. Acesso: 19 jun. 2024.

TAMBURUS, I. E. **Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio de efluentes industriais por sistema de lodos ativados e suas variantes: uma revisão sistemática**. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)- Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, 2020. Disponível em: <https://bdtd.uftrm.edu.br/handle/123456789/1212>. Acesso em: 20 jun. 2024.

TALEGHANI, H. G.; NAJAFPOUR, G. D.; GHOREYSHI, A. A. A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 18, n. 1, p. 58-63, 2016. Disponível em: <https://intapi.sciendo.com/pdf/10.1515/pjct-2016-0010>. Acesso em: 20 jun. 2024.

TASKILA, S.; OJAMO, H. The current status and future expectations in industrial production of lactic acid by lactic acid bacteria. Em: KONGO, M. (Ed.). **Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. Londres, England: InTech, 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/42322>. Acesso em: 19 jun. 2024.

TAVARES, L. M. *et al.* Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: The lactic acid bacterium model. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2020.517166/full>. Acesso em: 19 jun. 2024.

TESFAYE, B.; TEFERA, T. Extraction of essential oil from Neem Seed by using Soxhlet Extraction Methods. **International Journal of Advanced Engineering, Management and Science (IJAEMS)**, v. 3, n. 3, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.24001/ijaems.3.6.5>.

VICENTE, R. A. **Aplicação Da Técnica De Extração Líquido-Líquido Na Remoção De Óleo Da Água Produzida**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/38720>. Acesso em: 19 jun. 2024.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. **Chem. Biochem. Eng. Q.** 22 (2) 245–264, 2008. Disponível em: <https://hrcak.srce.hr/24811>. Acesso em: 19 jun. 2024.

WANG, Y. *et al.* Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2021.612285/full>. Acesso em: 19 jun. 2024.

YANKOV, D. Fermentative Lactic Acid Production From Lignocellulosic Feedstocks: From Source to Purified Product. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.823005/full>. Acesso em: 18 jun. 2024.

ZACHAROF, Myrto-Panagiota; LOVITT, R. W. Modelling and simulation of cell growth dynamics, substrate consumption, and lactic acid production kinetics of *Lactococcus lactis*. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 18, p. 52-64, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-012-0477-4>. Acesso em: 18 jun. 2024.

Anexo 1

