



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos  
MESTRADO PROFISSIONAL**

**EDSON MALUF DA COSTA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira**

**COORIENTADORA: Prof. Dra. Érika Durão Vieira**

**Produção de ácido láctico a partir de melaço de soja: prospecção  
tecnológica, seleção de microrganismos, fermentação e  
modelagem matemática**

**Araraquara, SP**

**2023**

**EDSON MALUF DA COSTA**

**Produção de ácido láctico a partir de melaço de soja: prospecção  
tecnológica, seleção de microrganismos, fermentação e  
modelagem matemática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

Área de Concentração: Engenharia de Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira

Coorientadora: Prof. Dra. Érika Durão Vieira

**Araraquara,SP**

**2023**

---

**C939p** Costa, Edson Maluf da.  
Produção de ácido láctico a partir de melaço de soja: prospecção tecnológica, seleção de microrganismos, fermentação e modelagem matemática / Edson Maluf da Costa. – Araraquara: [S.n.], 2023.  
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Samuel Conceição de Oliveira.  
Coorientadora: Érika Durão Vieira.

1. Ácido láctico. 2. *Lactobacillus*. 3. Melaço de soja. 4. Fermentação. 5. Modelagem. I. Oliveira, Samuel Conceição de, orient. II. Vieira, Érika Durão, coorient. III. Título.

---

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

**CAPES: 33004030170P0**

**Esta ficha não pode ser modificada**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE MELAÇO DE SOJA:  
PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA, SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS,  
FERMENTAÇÃO E MODELAGEM MATEMÁTICA

**AUTOR:** EDSON MALUF DA COSTA

**ORIENTADOR:** SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

**COORIENTADORA:** ERIKA DURÃO VIEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ARNALDO SARTI (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 30 de março de 2023

## **Agradecimentos**

A Deus por toda força e sabedoria transmitidas nas horas de incerteza e indefinição ao longo do trabalho.

Aos meus pais Edson e Carmen Lúcia pelo apoio na realização deste trabalho.

À minha esposa Fabiane Ayumi por todo carinho e atenção durante a realização do mestrado.

Aos meus filhos Guilherme, Maria Antonia e Murilo Davi por toda a paciência pelas horas de estudo.

Aos meus sogros Hiroshi e Virgínia pelo incentivo dado durante a realização do mestrado.

Ao meu irmão Emerson pelas palavras de incentivo ao longo do trabalho.

Aos meus sobrinhos Esther, Lorenzo, Sofia e Yasmin pela paciência pelas horas de estudo.

Aos meus cunhados Alessander, Flávia, Fernanda, Denilson, Patrícia e Tiago por todo o incentivo despendido durante o mestrado.

Ao meu professor orientador Dr. Samuel Conceição de Oliveira por todas as horas de dedicação, orientação e incentivo durante a realização do mestrado.

À minha professora coorientadora Dra. Érika Durão Vieira por todo incentivo e orientação durante o trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Arnaldo Sarti e Prof. Dr. Fernando Masarin, pelas correções e contribuição com esse trabalho.

A CJSelecta, representada pelos colaboradores Hugo Santos e Leandro Vieira, por todo apoio dado para a realização deste trabalho.

Ao SENAI Cimatec pela disponibilidade do laboratório de biotecnologia para a realização dos experimentos.

## Resumo

A produção do ácido láctico vem recentemente aumentando devido à sua importância como precursor na fabricação de plásticos biodegradáveis tais como o polilactato (PLA). Visando à redução do custo da matéria-prima, o uso de subprodutos como fonte de carbono de baixo custo para a produção de ácido láctico é bastante atraente. O melaço de soja, disponível no Brasil, possui grande potencial como matéria-prima para fermentação, por ser fonte renovável de carbono para obtenção de blocos construtores de interesse industrial, tais como o ácido láctico (AL). Neste contexto, o presente trabalho visa estudar a produção de ácido láctico a partir dos açúcares presentes no melaço de soja. O estudo explorou o uso de duas preparações distintas de meios à base de melaço de soja antes de seu uso no processo fermentativo: melaço de soja in natura (MS) e do melaço de soja hidrolisado (MSH). Para a bioconversão de interesse, foram testadas 12 cepas de *Enterococcus* e *Lactobacillus* capazes de converter os açúcares, identificadas por meio de um teste screening para acidificação em placas de ágar sólido e ensaios de fermentação em incubador rotativo. O *Lactobacillus* sp RE 07 foi a cepa que apresentou maior adaptabilidade, sendo selecionada para estudos posteriores de fermentação. As fermentações de meios à base de MS e MSH mostraram que o microrganismo selecionado consome os açúcares redutores disponíveis no meio segundo uma cinética de 1ª ordem com produção de ácido láctico evidenciada pela redução de pH durante o bioprocessamento. Após este estudo laboratorial foi feita uma modelagem matemática do sistema fermentativo levando-se em conta a quebra dos açúcares complexos visando uma maior produtividade, além da realização de um estudo preliminar de viabilidade econômica do processo. Assim, o melaço de soja pode ser considerado como uma matéria-prima promissora para processos de bioconversão, como a produção de ácido láctico, representando uma fonte de menor custo, renovável e rica em açúcares fermentescíveis.

Palavras-chave: Ácido láctico. *Lactobacillus*. Melaço de soja. Fermentação. Modelagem.

## Abstract

Lactic acid production has recently increased due to its importance as a precursor in the manufacture of biodegradable plastics such as polylactate (PLA). In order to reduce the cost of raw materials, the use of by-products as a low-cost carbon source for the production of lactic acid is quite attractive. Soybean molasses, available in Brazil, has great potential as a raw material for fermentation, as it is a renewable source of carbon for obtaining building blocks of industrial interest, such as lactic acid (LA). In this context, the present work aims to study the production of lactic acid from the sugars present in soybean molasses. The study explored the use of two different media preparations based on soy molasses before its use in the fermentation process: in natura soybean molasses (MS) and hydrolyzed soy molasses (MSH). For the bioconversion of interest, 12 strains of *Enterococcus* and *Lactobacillus* capable of converting sugars were tested, identified by means of a screening test for acidification on solid agar plates and fermentation assays in a rotary incubator. *Lactobacillus sp RE 07* was the strain that showed the highest adaptability, being selected for further fermentation studies. The fermentations of MS and MSH based media showed that the selected microorganism consumes the available reducing sugars in the media according to a first-order kinetics with lactic acid production evidenced by the pH reduction during the bioprocess. After this laboratory study, a mathematical modeling of the fermentative system was carried out, taking into account the breakdown of complex sugars, aiming at a greater output, in addition to a preliminary economic viability study of the project. Thus, soybean molasses can be considered as a promising raw material for bioconversion processes, such as the production of lactic acid, representing a lower cost, renewable and rich source of fermentable sugars.

Keywords: Lactic acid. *Lactobacillus*. Soybean molasses. Fermentation. Modeling.

## Lista de figuras

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Safras de soja.. .....                                                                    | 14 |
| Figura 2 – Importação e exportção de produtos químicos.. .....                                       | 25 |
| Figura 3 – Importação e exportação de ácido láctico .....                                            | 26 |
| Figura 4 – Exportação de ácido láctico por país.....                                                 | 16 |
| Figura 5 - Família dos oligossacarídeos da rafinose.. .....                                          | 22 |
| Figura 6 - Fluxograma do processo de obtenção do óleo degomado e do farelo de soja.....              | 25 |
| Figura 7 - Fluxograma de produção do farelo de soja concentrado .....                                | 26 |
| Figura 8 - Fluxograma do balanço de massa para o processamento de soja.....                          | 28 |
| Figura 9 - Fluxograma de obtenção do melaço de soja.....                                             | 29 |
| Figura 10 - Balanço de massa do melaço de soja para a vinhaça de soja.....                           | 30 |
| Figura 11 - Fórmula estrutural da molécula de ácido láctico .....                                    | 31 |
| Figura 12 - Aplicações do ácido láctico.....                                                         | 32 |
| Figura 13 - Rotas de obtenção de ácido láctico.....                                                  | 33 |
| Figura 14 - Vias metabólicas das bactérias homo e heterofermentativas. ....                          | 35 |
| Figura 15 - Representação esquemática do mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas..... | 38 |
| Figura 16- Hidrólise enzimática da estaquiose e rafinose via $\alpha$ -galactosidade .....           | 40 |
| Figura 17 - Melaço de soja.. .....                                                                   | 47 |
| Figura 18 - Equipamentos de fermentação. ....                                                        | 49 |
| Figura 19 - Fluxogramas de criopreservação e preparo MRS.....                                        | 52 |
| Figura 20 - Fluxograma de preparação do inóculo.....                                                 | 52 |
| Figura 21 - Centrífuga e estufa.....                                                                 | 55 |
| Figura 22 - Diluições para leitura DNS.. .....                                                       | 55 |
| Figura 23 - Espectrofotômetro .....                                                                  | 56 |
| Figura 24 - pHmetro. ....                                                                            | 56 |



|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 25 - Refratômetro. ....                                                                                                                                                                         | 57 |
| Figura 26 - <i>Screening</i> de microrganismos potencialmente fermentadores de melaço de soja.....                                                                                                     | 61 |
| Figura 27 - <i>Lactobacillus sp</i> RE 07.....                                                                                                                                                         | 62 |
| Figura 28 - ART x Diluição.....                                                                                                                                                                        | 63 |
| Figura 29 - Consumo de ART por <i>Lactobacillus sp. RE 07</i> nas fermentações com MRS e MS.....                                                                                                       | 66 |
| Figura 30 - Fermentado MRS (A) e MS (B).....                                                                                                                                                           | 67 |
| Figura 31 - BRIX x tempo.....                                                                                                                                                                          | 68 |
| Figura 32 – Perfil simulado de concentração de glicose durante o processo SSF de produção de ácido láctico por <i>L. delbrueckii</i> em meio à base de amido com $S_0=10$ g/L, $T=45$ °C e pH 5,5..... | 70 |
| Figura 33 – Perfil simulado de concentração de produto durante o processo SSF de produção de ácido láctico por <i>L. delbrueckii</i> em meio à base de amido com $S_0=10$ g/L, $T=45$ °C e pH 5,5..... | 71 |
| Figura A.1 - Curva de biomassa – MRS.....                                                                                                                                                              | 88 |
| Figura A.2 - Curva de biomassa – MS <i>in natura</i> .....                                                                                                                                             | 89 |
| Figura A.3 - Curva de biomassa – MS hidrolisado. ....                                                                                                                                                  | 89 |
| Figura B.1 - Concentração de glicose – Padrão glicose.....                                                                                                                                             | 91 |
| Figura B.2 - Açúcares redutores totais – MS <i>in natura</i> .....                                                                                                                                     | 91 |
| Figura B.3 - Açúcares redutores totais – MS hidrolisado. ....                                                                                                                                          | 91 |
| Figura B.4 - Curva de concentração x absorbância – Solução padrão de glicose. ...                                                                                                                      | 92 |
| Figura C.1 - Área de pesquisa relacionado ao número de registros. ....                                                                                                                                 | 94 |
| Figura C.2 - Número de registros x Anos de publicação. ....                                                                                                                                            | 94 |
| Figura C.3 - Quantidade de publicações por país. ....                                                                                                                                                  | 95 |

## Lista de tabelas

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Valor nutricional em 100 g da soja cozida sem sal .....                                                                                                                        | 20 |
| Tabela 2 - Composição típica do melaço de soja.....                                                                                                                                       | 27 |
| Tabela 3 - Produção de ácido láctico por diferentes cepas em melaço de soja (MS) e<br>vinhaça de soja (VS) em BRIX 15°.....                                                               | 36 |
| Tabela 4 - Rendimento por ácido testado. ....                                                                                                                                             | 39 |
| Tabela 5 - Cinética de hidrólise enzimática do mosto de melaço de soja. ....                                                                                                              | 42 |
| Tabela 6 - Matriz do PCC (Planejamento composto central).....                                                                                                                             | 43 |
| Tabela 7 - Linhagens de cepas avaliadas neste trabalho. ....                                                                                                                              | 48 |
| Tabela 8 - Temperatura ótima de crescimento dos microrganismos.....                                                                                                                       | 53 |
| Tabela 9 - Artigos e patentes selecionados das buscas #8, #9, #10 na base <i>Principal<br/>Collection</i> e <i>Derwent Innovation Index™</i> da plataforma <i>Web of Science™</i> .. .... | 58 |
| Tabela 10 - Diâmetro médio dos halos (mm).. ....                                                                                                                                          | 61 |
| Tabela 11 - ART em MS in natura e hidrolisado.....                                                                                                                                        | 62 |
| Tabela 12 - Dados de pH, BRIX, Absorbância e ART (Açúcares redutores Totais)<br>das amostras de meio fermentado de MRS pelo <i>Lactobacillus sp.</i> RE 07.....                           | 64 |
| Tabela 13 - Dados de pH, BRIX, Absorbância e ART (Açúcares redutores Totais)<br>das amostras de caldo fermentado de MS <i>in natura</i> pelo <i>Lactobacillus sp.</i> RE<br>07.....       | 65 |
| Tabela 14 - Variação de pH durante a fermentação com MRS e MS.....                                                                                                                        | 66 |
| Tabela 15 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação<br>(em gramas).....                                                                                          | 67 |
| Tabela 16 - Estudo preliminar de viabilidade econômica (em milhões de reais).....                                                                                                         | 73 |
| Tabela 17 - Tempo de retorno de investimento (em milhões de reais). ....                                                                                                                  | 74 |
| Tabela A.1 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação<br>com MRS.....                                                                                             | 87 |
| Tabela A.2 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação<br>com MS <i>in natura</i> . ....                                                                           | 87 |
| Tabela A.3 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação<br>com MS hidrolisado.....                                                                                  | 88 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela B.1 - ART em MS <i>in natura</i> e hidrolisado. ....                                                                            | 90 |
| Tabela B.2 - Solução padrão de glicose.....                                                                                            | 90 |
| Tabela B.3 - Concentração versus absorbância para uma solução padrão de glicose.<br>.....                                              | 92 |
| Tabela C.1 - Resultado da busca sobre ácido láctico na base <i>Principal Collection</i> da<br>plataforma <i>Web of Science™</i> . .... | 93 |

## Lista de abreviaturas

MS Melaço de soja

HCl Ácido clorídrico

NaOH Hidróxido de sódio

MRS De Man, Rogosa e Sharp

MRSA De Man, Rogosa e Sharp com Ágar

*sp* *specie*

DNS Dinitrosalicílico

ART Açúcares redutores totais

PLA Polímero de ácido láctico

SHF *Separate Hydrolysis and Fermentation*

SSF *Simultaneous Saccharification and Fermentation*

SSCF *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*

M molar

## Sumário

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| Agradecimentos.....                                                         | 3  |
| Resumo.....                                                                 | 4  |
| Abstract.....                                                               | 5  |
| Lista de figuras.....                                                       | 6  |
| Lista de tabelas.....                                                       | 8  |
| Lista de abreviaturas.....                                                  | 10 |
| Sumário.....                                                                | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                           | 14 |
| 2 OBJETIVOS.....                                                            | 18 |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                     | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                              | 18 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA.....                                                | 19 |
| 3.1 Soja.....                                                               | 19 |
| 3.2 Composição da soja.....                                                 | 19 |
| 3.3 Produtos da soja.....                                                   | 22 |
| 3.4 Processamento da soja.....                                              | 23 |
| 3.5 Melaço de soja.....                                                     | 26 |
| 3.6 Vinhaça de soja.....                                                    | 29 |
| 3.7 Ácido láctico.....                                                      | 30 |
| 3.8 Aspectos ligados à obtenção de ácido láctico por rota fermentativa..... | 34 |
| 3.8.1 Matérias-primas.....                                                  | 34 |

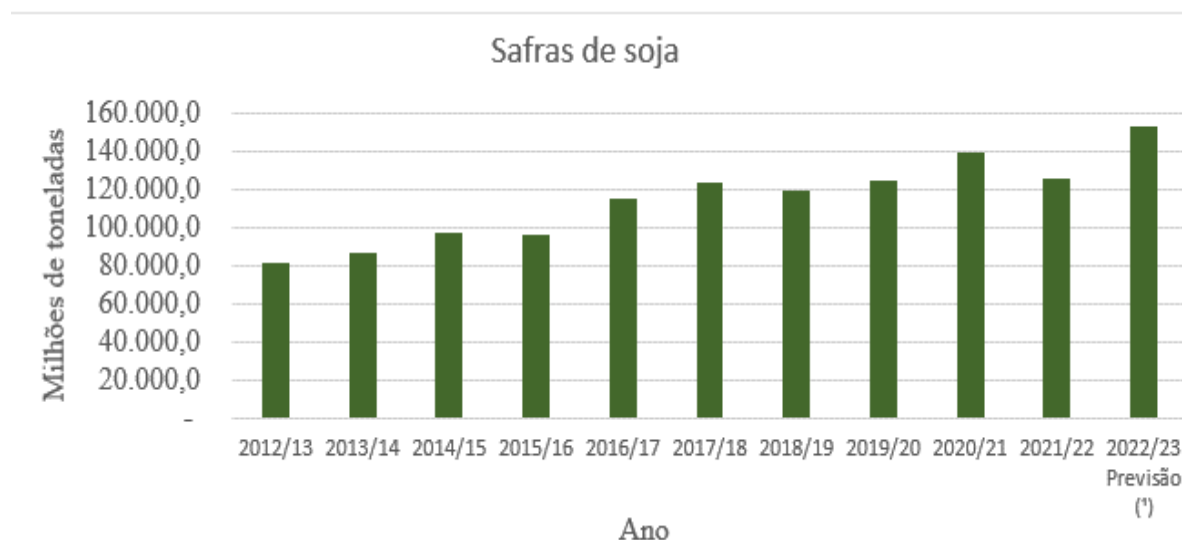
|         |                                                               |    |
|---------|---------------------------------------------------------------|----|
| 3.8.2   | Agentes fermentativos.....                                    | 34 |
| 3.8.3   | Condições operacionais.....                                   | 36 |
| 3.8.4   | Hidrólise.....                                                | 37 |
| 3.8.4.1 | Hidrólise com ácido concentrado.....                          | 38 |
| 3.8.4.2 | Hidrólise com ácido diluído.....                              | 38 |
| 3.8.4.3 | Hidrólise enzimática.....                                     | 40 |
| 3.8.5   | Tecnologias de fermentação para produção de ácido lático..... | 44 |
| 3.9     | Modelagem matemática.....                                     | 45 |
| 4       | MATERIAL E MÉTODOS.....                                       | 47 |
| 4.1     | Materiais.....                                                | 47 |
| 4.1.1   | Melaço de soja.....                                           | 47 |
| 4.1.2   | Linhagem de cepas.....                                        | 47 |
| 4.1.3   | Equipamentos de fermentação.....                              | 48 |
| 4.1.4   | Reagentes.....                                                | 49 |
| 4.2     | Métodos.....                                                  | 50 |
| 4.2.1   | Reativação e preparo do inóculo.....                          | 50 |
| 4.2.2   | Screening de linhagem de cepa.....                            | 53 |
| 4.2.3   | Fermentação.....                                              | 54 |
| 4.2.4   | Hidrólise ácida.....                                          | 54 |
| 4.3     | Metodologia analítica.....                                    | 54 |
| 4.3.1   | Determinação de biomassa seca.....                            | 54 |
| 4.3.2   | Determinação de açúcares redutores totais.....                | 55 |

|       |                                                                                                                                              |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.3 | Determinação de pH.....                                                                                                                      | 56 |
| 4.3.4 | Grau BRIX.....                                                                                                                               | 57 |
| 4.4   | Prospecção tecnológica sobre a produção de ácido láctico a partir da fermentação de melaço de soja e potenciais aplicações concorrentes..... | 57 |
| 5     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                  | 58 |
| 5.1   | Prospecção tecnológica sobre a produção de ácido láctico a partir da fermentação de melaço de soja e potenciais aplicações concorrentes..... | 58 |
| 5.2   | <i>Screening</i> de microrganismos fermentadores de melaço de soja.....                                                                      | 60 |
| 5.3   | Determinação da concentração de ART das soluções do MS in natura e hidrolisada, pré-fermentação.....                                         | 62 |
| 5.4   | Fermentações.....                                                                                                                            | 63 |
| 5.5   | Biomassa seca.....                                                                                                                           | 67 |
| 5.6   | Modelagem matemática.....                                                                                                                    | 68 |
| 5.7   | Análise preliminar de viabilidade econômica.....                                                                                             | 72 |
| 6     | CONCLUSÕES.....                                                                                                                              | 75 |
| 7     | PRÓXIMAS ETAPAS.....                                                                                                                         | 77 |
| 8     | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                             | 78 |
|       | Anexo A.....                                                                                                                                 | 87 |
|       | Anexo B.....                                                                                                                                 | 90 |
|       | Anexo C.....                                                                                                                                 | 93 |

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de soja, com uma produção de mais de 125 milhões de toneladas na safra 2021/2022 e com uma projeção de safra 2022/2023 de quase 153 milhões de toneladas (CONAB,2023). Devido à grande importância econômica deste produto, toda a sua cadeia produtiva se torna um grande gerador de divisas para o país. A Figura 1 mostra a evolução das safras de soja em toneladas produzidas.

Figura 1 – Safras de soja.



Fonte: CONAB,2023.

Atualmente há uma preocupação muito grande em relação à utilização de resíduos para a obtenção de produtos com maior valor agregado tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico. O Brasil é reconhecido mundialmente pelo grande potencial de geração e aproveitamento de biomassa, tanto para a geração de energia, quanto para a geração de produtos químicos.

O aproveitamento eficiente de resíduos agroindustriais é muito vantajoso, pois, elimina o problema ambiental de descarte inadequado de grande quantidade de biomassa, e, possibilita o aproveitamento desses resíduos para a geração de produtos químicos de valor comercial. Um dos subprodutos gerados na indústria de soja é o melaço, hoje utilizado como suplemento na indústria de ração animal e na formulação de fertilizantes.

Nas regiões sudeste, nordeste e centro-oeste há grande interesse no aproveitamento de resíduos, que não possuem valor comercial e são descartados, e subprodutos, que possuem um valor comercial baixo, da produção de soja, sobretudo o melaço de soja originário nas indústrias que produzem proteína concentrada, como substrato para a produção de biomoléculas de alto valor agregado.



O melaço de soja, devido a sua composição rica em diversos constituintes, é bastante atrativo para diversas aplicações em bioprocessos tendo como resultado diversos produtos, entre os mais importantes têm-se o etanol, butano, biogás, ácidos orgânicos, biopolímeros, e biosurfactantes (PINATTI, 2022).

Os processos de conversão de biomassa podem ser realizados por rotas químicas e biológicas. Nos últimos anos a rota biológica tem sido amplamente utilizada para a obtenção de vários produtos de alto valor agregado, podendo ser realizada via fermentativa, pela ação de microrganismos, ou via enzimática, pela ação de enzimas, consistindo ambas as vias na conversão de um substrato fermentescível em um produto químico. Dentre os bioprodutos que podem ser obtidos biotecnologicamente, o ácido láctico é um ácido orgânico com larga aplicação em indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos, de polímeros, agroquímica, entre outros tanto como produto final quanto “*building block*” para a produção de ácido polilático (BENEVENUTI, 2016).

A partir de dados observados (MIDC, 2023) foi realizado um levantamento de importação e exportação de produtos químicos orgânicos e inorgânicos no período de 2015 a 2022. A Figura 2 mostra que a balança comercial brasileira se mostra deficitária durante todo o período abordado.

Figura 2 – Importação e exportação de produtos químicos.



Fonte: MIDC, 2023.

Este mesmo levantamento foi realizado para as importações e exportações referente ao ácido láctico em que se pode notar um superávit em todos os anos, porém é interessante perceber que em 2022 houve um aumento significativo na importação. A Figura 3 mostra o balanço comercial do ácido láctico de 2015 a 2022.

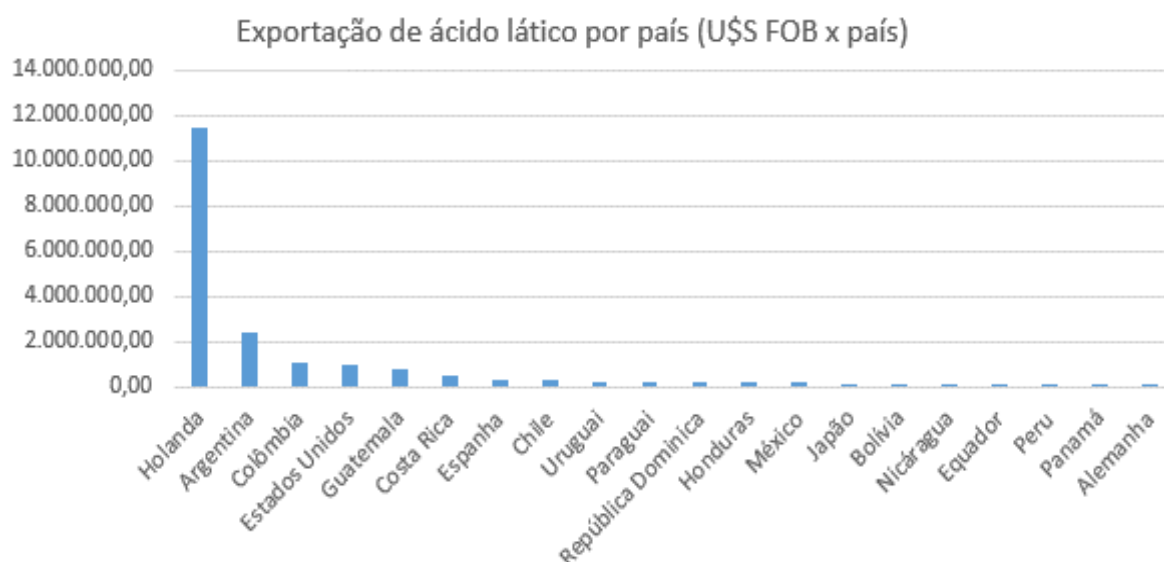
Figura 3 – Importação e exportação de ácido láctico.



Fonte: MIDC, 2023.

Os países que importaram ácido láctico do Brasil em 2022 estão representados na Figura 4 onde é interessante notar que a Holanda é de longe a maior compradora, utilizando este ácido láctico como matéria prima para a produção do ácido polilático, porém o Brasil exporta ácido láctico para praticamente toda a América Latina devido à proximidade e acordos como o MERCOSUL.

Figura 4 – Exportação de ácido láctico por país.



Fonte: MIDC, 2023.

A cadeia plástica do ácido láctico (MARKETS & MARKETS, 2023) tem uma pegada de carbono 75% menor em relação a cadeia plástica de combustíveis fósseis. Tradicionalmente o obtenção de ácido láctico é feito tendo como substrato utilizado o açúcar comercial, o que faz o custo de produção mais elevado, tendo como base substratos como o melaço de soja ou até mesmo a vinhaça de soja.

A expectativa de crescimento do mercado de ácido láctico é de 12,8% ao ano no período de 2020 a 2023 alcançado a cifra de U\$S 42,6 bilhões no último ano. O mercado do ácido polilático é igualmente promissor com um crescimento anual em 17,4 % no mesmo período (MARKETS & MARKETS, 2023) .

Diante de todos os fatores apresentados o Brasil tem potencial para se tornar um dos grandes *players* mundiais no mercado de ácido láctico, devido à grande oferta de resíduo agroindustrial, em especial na cadeia da soja.

Novas tecnologias de produção de ácido láctico estão sendo desenvolvidas para aumentar a produtividade e, conseqüentemente, diminuir o custo. Engenharias genética e metabólica são grandes ferramentas para superar problemas associados à inibição da produção, formação de produtos indesejados, efeito negativo de condições extremas de cultura e o mais importante, o uso de substratos caros e ineficientes (ES *et al*,2018). A produção de ácido láctico usando-se melaço de soja, considerado um subproduto na indústria de processamento de soja que possui em sua composição uma grande quantidade de oligossacarídeos, vem despontando como uma nova alternativa para a produção biotecnológica de ácido láctico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento do microrganismo selecionado quanto a conversão de açúcares na fermentação tendo como objetivo a produção de ácido láctico, por meio da realização de experimentos e modelagem matemática, e posterior estudo preliminar de viabilidade.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma prospecção tecnológica sobre a produção de ácido láctico tendo o melaço de soja como fonte de substrato e potenciais aplicações concorrentes;
- Selecionar cepas ou espécies diferentes de microrganismos produtores de ácido láctico, focando os estudos nos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus*;
- Avaliar as condições de fermentação do melaço de soja *in natura*;
- Modelar matematicamente o processo de hidrólise dos açúcares mais complexos constituintes do melaço de soja e verificar, por meio de simulação, se a hidrólise destes açúcares é a etapa limitante da fermentação;
- Realizar uma análise preliminar da viabilidade econômica do bioprocessamento proposto, considerando os principais componentes de custos e receitas.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Soja**

A soja, uma leguminosa rica em açúcares, proteínas e lipídeos, é considerada um dos principais produtos agrícolas do mundo devido a sua alta produtividade, capacidade adaptativa e qualidade nutricional. É amplamente consumida pela população, na forma de óleo e seus derivados, como margarina e gordura hidrogenada (KHARE & KRISHNA, 1994).

O Brasil é responsável por cerca de 22% do volume total de soja exportado mundialmente, sendo o segundo maior exportador. Em média, 68% do total produzido no país é exportado, principalmente para a União Europeia, EUA e Japão.

Nos últimos anos, uma grande atenção vem sendo dada à soja e um dos fatores é o fato desta leguminosa ser rica em substâncias que podem prevenir a ocorrência de uma série de doenças, o que a enquadra nos alimentos funcionais, os quais são aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos por meio da atuação de um nutriente ou não no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano (KHARE & KRISHNA, 1994).

#### **3.2 Composição da soja**

A principal parte constituinte da soja é a sua semente, sendo que a composição química é bastante complexa e dependente de fatores como variedade, condições de cultivo, condições climáticas, época de cultivo e condições de armazenagem (HOU & CHANG, 1998).

O grão é uma semente oleaginosa tendo como constituintes lipídios, proteínas, carboidratos, minerais e água. De forma geral pode-se considerar a soja com 20% de lipídeos, 40% em compostos nitrogenados, 25% em carboidratos, 5% em fibras e 6% de constituintes inorgânicos. A umidade é muito variável e é reduzida para 12% para fins de estocagem e processamento.

A soja é um alimento rico em minerais como magnésio, fósforo, ferro, cobre, zinco e potássio, porém, o aproveitamento desses minerais pode ser prejudicados devido a fatores antinutricionais como os taninos e fitatos (MONTEIRO, 2000). Na Tabela 1 estão apresentados os valores nutricionais da soja cozida.

Tabela 1 - Valor nutricional em 100g da soja cozida sem sal

| Componentes       | Valor |
|-------------------|-------|
| Energia (Kcal)    | 141   |
| Água (g)          | 67    |
| Proteína (g)      | 12,5  |
| Lipídios (g)      | 7,5   |
| Saturada (g)      | 1     |
| Monosaturada (g)  | 1,7   |
| Polinsaturada (g) | 4,5   |
| Carboidratos (g)  | 5,6   |
| Vitamina E (g)    | 1     |
| Cálcio (mg)       | 82    |
| Ferro (mg)        | 2,6   |
| Magnésio (mg)     | 84    |
| Potássio (mg)     | 513   |

Fonte: ROMÃO,2011

Os grãos de soja, como a maioria das espécies de leguminosas, por conterem proteínas tóxicas e de ação antinutricional, recebem tratamento térmico adequado antes de serem usados na alimentação (SGARBIERI, 1996).

A soja possui quantidade considerável de carboidratos, porém apenas 2% deste valor se encontram sob a forma de amido absorvível pelo organismo humano, razão pela qual o grão é indicado na dieta de pessoas diabéticas e obesas para a manutenção e perda de peso.

Os carboidratos da soja são usados principalmente em rações animais (predominantemente em rações para ruminantes) com a finalidade de somar calorias às dietas animais. Apesar da complexidade dos carboidratos da soja, estes não passam por nenhum processamento por não haver ganho de valor nutricional pela quebra de açúcares nestas rações animais (IRISH,1998).

Os carboidratos na soja se apresentam na forma de açúcares, amido, celulose e seus derivados (SMITH & CIRCLE, 1975; MARKLEY, 1974). Os açúcares são os principais carboidratos da soja, sendo representados pela sacarose, estaquiose, rafinose, glicose, frutose, melibiose, galactose, ramnose e maltopentose, sendo a sacarose, rafinose e estaquiose os açúcares majoritários constituintes da soja.

Os carboidratos insolúveis são celulose e hemicelulose encontrados na casca do grão, os quais constituem as fibras que auxiliam na digestão dos alimentos.

Outros polímeros semelhantes à celulose como as pentosanas, galactanas, hemicelulose e dextrinas também podem ser encontradas na soja e o amido está presente na soja, porém em quantidades muito pequenas (STRÖHER, 2010).

Na Figura 5 está apresentada a família dos oligossacarídeos da rafinose, na qual a sacarose é um dissacarídeo não redutor, facilmente hidrolisado por soluções diluídas de ácidos minerais ou por enzimas (invertases) com a formação de glicose e frutose.

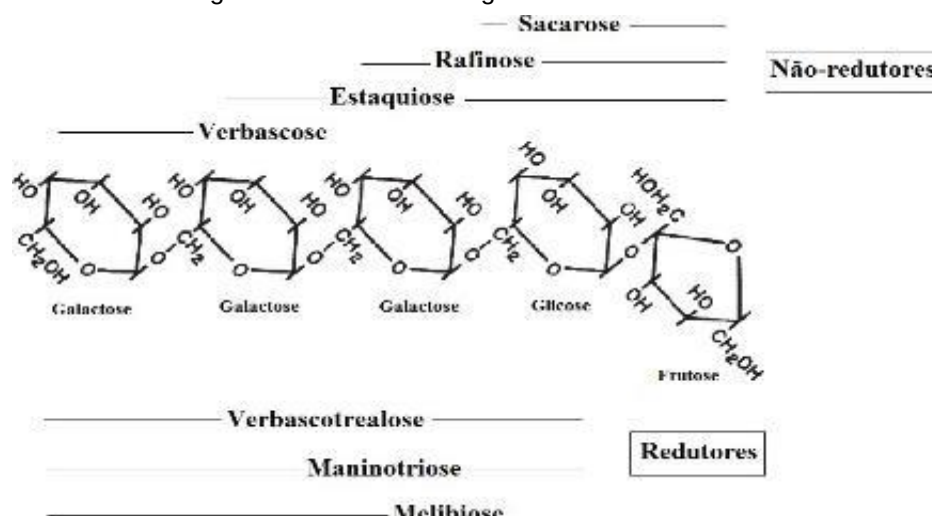
A rafinose é o oligossacarídeo mais frequente em vegetais, também conhecida como galactosilsacarose, sendo um trissacarídeo não redutor, encontrado em grande quantidade no melão. Por hidrólise total da rafinose, são obtidas galactose, frutose e glicose. Pela ação de invertases, este açúcar pode ser hidrolisado à frutose e melibiose, não sendo absorvido pelo corpo humano e, por esse motivo, se consumido, pode causar desconforto intestinal com produção de gases.

A rafinose é hidrolisada por algumas cepas de fungos como o *Aspergillus fumigatus* (REZENDE & FELIX, 1997) e a *Mortierella vinacea dixo* (THANANUNKUL et al., 1976). A estaquiose é um tetrassacarídeo não redutor pertencente à família da rafinose, encontrado principalmente em leguminosas como a soja.

Devido à complexidade das moléculas esses oligossacarídeos são de difícil digestão e causam sintomas de flatulência. A germinação, no caso da produção de brotos de soja, e a fermentação são processos que mobilizam esses açúcares, reduzindo os problemas de flatulência (STRÖHER, 2010).

Por causa das suas propriedades, este açúcar vem sendo explorado para a formação de ácidos graxos esterificados, a fim de produzir óleos vegetais com menos calorias. A forma conjugada de ácidos graxos com rafinose tem uma menor absorção no trato intestinal humano (AKOH & SWANSON, 1987).

Figura 5 - Família dos oligossacarídeos da rafinose.



Fonte: PALLARDY, 1997.

A seguir os principais produtos gerados na cadeia de soja serão apresentados.

### 3.3 Produtos da soja

Aproximadamente 83% da soja produzida no mundo sofre o processo de extração que origina o óleo, que é destinado, ao consumo humano e produção de biocombustíveis, e o farelo utilizado na composição de ração animal (LIMA & ANGNES, 1999).

A soja está presente diariamente em nossas vidas sob a forma dos mais diversos alimentos tais como: margarinas, óleos vegetais, proteínas (texturizada, concentrada, isolada, leite), lectinas, farinhas, farelos, entre outros.

A fração protéica da soja é utilizada principalmente para alimentação animal seja na forma de farelo, resultante da extração do óleo, ou pela fabricação industrial de ração (LIMA & ANGNES, 1999).

Outros produtos protéicos de soja são enquadrados em três categorias básicas: farinha com cerca de 50% de proteínas, concentrados protéicos (70%) e isolados protéicos de soja (90- 97%).

Eles podem ser processados em produtos texturizados de soja, sendo utilizados em panificadoras como clarificadores de farinhas e agentes de melhoria das características de panificação e conservação (MOREIRA, 1999).

A farinha integral apresenta composição muito semelhante à soja integral. O valor nutritivo da proteína das farinhas integrais é de 80-90% do valor da caseína.



A farinha de soja desengordurada e “grits” de soja têm sido as principais formas de utilização das proteínas de soja na indústria de alimentos. Já o melaço de soja é obtido submetendo-se a farinha desengordurada de soja a vários processos de extração hidroalcóolica 70%, os quais removem componentes solúveis como a sacarose, rafinose, estaquiose, minerais e outros, elevando o conteúdo de proteína até 70% ou mais. A eficiência nutritiva da proteína é a mesma que a da farinha, enquanto a solubilidade da proteína reduz devido à desnaturação pela ação do álcool ou calor. O isolado protéico de soja deve conter acima de 95% de proteínas e apresentar um valor protéico superior ao da farinha ou do concentrado protéico de soja (SGAEBIERI, 1996).

O leite de soja ou extrato hidrossolúvel é um produto protéico de soja que pode ser comparável ao leite de vaca em conteúdo de proteínas e gorduras, tendo obtido alta aceitabilidade em programas de nutrição infantil (MOREIRA, 1999). O leite de soja é rico em proteínas de alta qualidade e não contém colesterol e lactose, apenas pequenas quantidades de ácidos graxos saturados (DESJARDINS *et al.*, 1990).

O leite de soja é uma alternativa para as pessoas portadoras de certas intolerâncias ao leite de origem animal e de algumas deficiências genéticas, como a ineficiência em metabolizar a lactose (DE LUMEN, 1992).

No Brasil, o óleo de soja representa acima de 50% de todos os óleos e gorduras dos produtos alimentícios (MOREIRA, 1999). A fração de óleos é utilizada também na indústria alimentícia para produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes e vários outros produtos.

A lectina é largamente utilizada em produtos alimentícios, principalmente em instantâneos como emulsificante e também é usada em pães, massas, biscoitos e tintas. Suas principais funções são: emulsificante, aglomerante, desmoldante, estabilizante, anti-espumante, antioxidante e dispersante (MACHADO, 1999).

### **3.4 Processamento da soja**

O tipo de processamento é de extrema importância quando a soja é usada para alimentação animal. O subprocessamento deixa inibidores de tripsina residuais e outros componentes antinutricionais que afetam a capacidade do humano ou animal para digerir ou absorver alimentos (CAMPOS, 2006). Um processamento adequado é essencial para desnaturar fatores antinutricionais (que interferem na digestão de proteína e na absorção de nutrientes) e, também, para ampliar a disponibilidade de óleo (CAMPOS, 2006).

A soja recebida nas indústrias processadoras é classificada de acordo com sua umidade e impurezas. Após a classificação, a soja passa por uma limpeza para a retirada de materiais grosseiros e uma vez realizada a limpeza, os grãos são secados para reduzir a umidade ao até 12%, sendo em seguida armazenados em silos para manter a umidade adequada dos grãos (BARTOLOMAI, 1987).

Em seguida ocorre a etapa de preparação das sementes, consistindo em um conjunto de operações apropriadas, incluindo quebra do grão, separação da casca, trituração, laminação e em alguns casos, extrusão. Todas estas operações são efetuadas a fim de aumentar a superfície de contato dos grãos para a etapa seguinte de extração.

A extração é a etapa na qual se obtém o óleo de soja, o que industrialmente é feito usando-se solvente ou prensagem. A extração por solvente, desde seu surgimento, mostrou-se o modo mais eficaz na obtenção de óleos vegetais de suas matrizes. O sucesso do processo a solvente está em sua capacidade de reduzir a níveis bastante reduzidos o resíduo de óleo presente em materiais oleaginosos.

Os solventes mais usados são os derivados de petróleo e, erroneamente, diz-se que o solvente mais adequado para a extração é o hexano. Embora possa se extrair óleo de soja com hexano, o que é usado na realidade é a hexana, uma mistura de solventes orgânicos composta de n-hexano, ciclohexano, metil-ciclopentano, 2-metilpentano e outros (RECH et al., 1998).

A extração consiste em colocar a matéria-prima (massa preparada) em contato com um solvente que possui afinidade com o óleo. A mistura de solvente e óleo, chamada de micela, é separada por evaporação do farelo desengordurado, que será utilizado posteriormente na extração de proteína. O óleo bruto pode ser refinado e vendido como óleo vegetal, ou hidrogenado para a produção de margarina. O farelo resultante da extração é seco para remoção do solvente residual, sendo obtido depois de algum processamento produtos como farinha integral pré-cozida, farinha desengordurada, proteína concentrada, proteína isolada, proteína texturizada, extrato hidrossolúvel em pó e hidrolisados (PARAISO, 2001).

Uma etapa intermediária é executada com a adição de água ao óleo para a remoção de fosfatídeos (lectinas), ocorrendo a formação de uma goma, insolúvel na fase oleosa, que é separada com o uso de centrífugas (processo de degomagem). Embora se use no processo de extração hidrocarbonetos, é importante ressaltar que a extração pode ser executada com outros solventes como o etanol (SILVA & TURATTI, 1991).

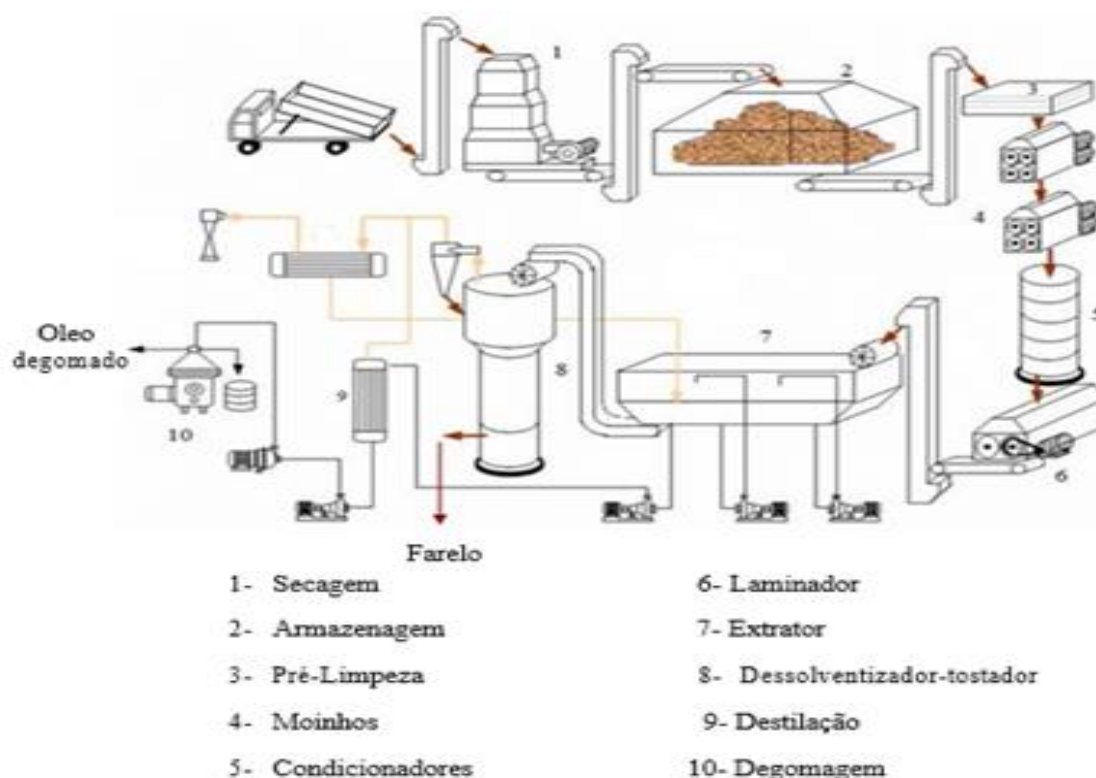
A farinha desengordurada de soja é usada para a obtenção de proteínas de soja, incluindo a texturizada, concentrada e a isolada. A proteína texturizada é obtida fazendo-se a extrusão da farinha desengordurada, sendo que esta ainda pode ser modificada para atender os mais diversos fins.

A proteína concentrada é obtida pela lavagem da farinha desengordurada com ácidos fracos em pH 4,5, contendo até 70% de proteína. A fase insolúvel (proteínas e fibras) é separada do soro ácido por filtração ou centrifugação e secada e o soro ácido é tratado como efluente industrial. Para a obtenção da proteína isolada de soja, a farinha desengordurada é dissolvida em pH básico, filtrada ou centrifugada (retirando-se as fibras) e re-acidificada até pH 4,5, ocorrendo a precipitação da proteína.

Este coalho protéico pode ser seco por atomização em *spray-dryer* ou sofrer texturização (POTTER & HOTCHKISS, 1997). O soro ácido com açúcares da soja muito diluídos é tratado como efluente industrial. A principal diferença entre isolados e concentrados é que a proteína concentrada apresenta fibras, uma vez que a farinha desengordurada é diretamente dissolvida em água e precipitada.

Outra opção é a transformação das proteína pela ação de enzimas como a pancreatina (HETTIARACHCHIT & KALAPATHY, 1997). Na Figura 6 está esquematizado o processamento da soja descrito anteriormente.

Figura 6 - Fluxograma do processo de obtenção do óleo degomado e do farelo de soja.



Fonte: Adaptado de FERNANDES JÚNIOR, 2009.

Um dos subprodutos derivados do farelo de soja, o melaço de soja, será apresentado a seguir.

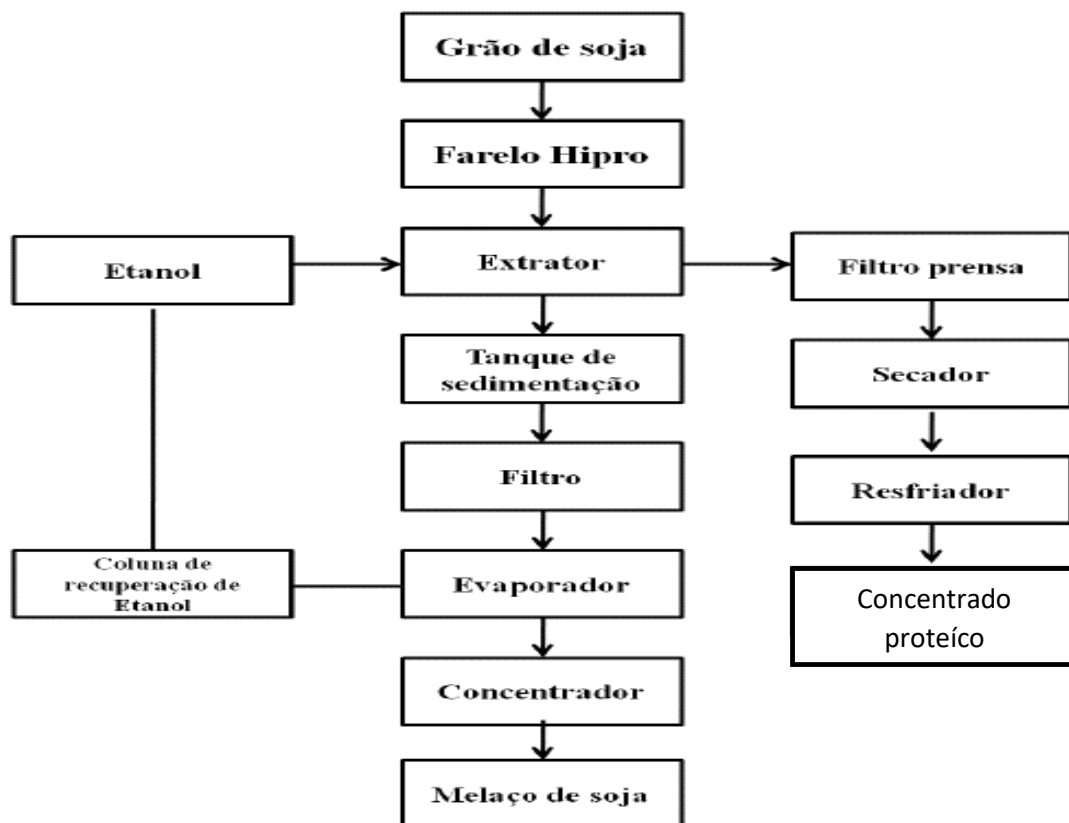
### 3.5 Melaço de soja

Vários produtos derivam da soja sendo os principais o óleo vegetal e o farelo de soja. Especificamente no processamento do farelo de soja, é gerado, como subproduto, o melaço que pode ser usado como matéria-prima para a produção de ácido láctico.

O melaço de soja é gerado durante a produção de farelo de soja a partir do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada, conforme esquematizado na Figura 7 (MACHADO, 1999).

De acordo com a Figura 7, no processo de obtenção do farelo de soja a partir de farelo Hipro (48% de proteína) realiza-se uma extração com etanol. Da corrente sólida úmida, após filtração, secagem e resfriamento, obtém-se o farelo concentrado rico em proteína. A outra corrente líquida, rica em açúcares, passa por um processo de separação de sólidos e é encaminhada a um evaporador para recuperação do etanol, sendo o líquido remanescente concentrado denominado de melaço de soja (SILVA, 2011).

Figura 7 - Fluxograma de produção do farelo de soja concentrado (72% de proteína)



Fonte: SILVA, 2011; Adaptado de SIQUEIRA, 2006.

O melaço de soja possui em sua composição uma grande quantidade de açúcares destacando-se a sacarose, rafinose e estaquiose, os quais são também chamados de oligossacarídeos, que são compostos por duas ou mais moléculas de monossacarídeos, (BOBBIO, 1992), os quais podem ser convertidos biologicamente a ácido láctico.

A Tabela 2 mostra a composição do melaço de soja, é interessante notar a alta oferta de carboidratos que podem ser utilizados na obtenção de produtos via rota fermentativa. Há uma disponibilidade de 32 kg/ton de açúcares simples (glicose e frutose) e 368 Kg/ton de açúcares complexos (sacarose, rafinose e estaquiose).

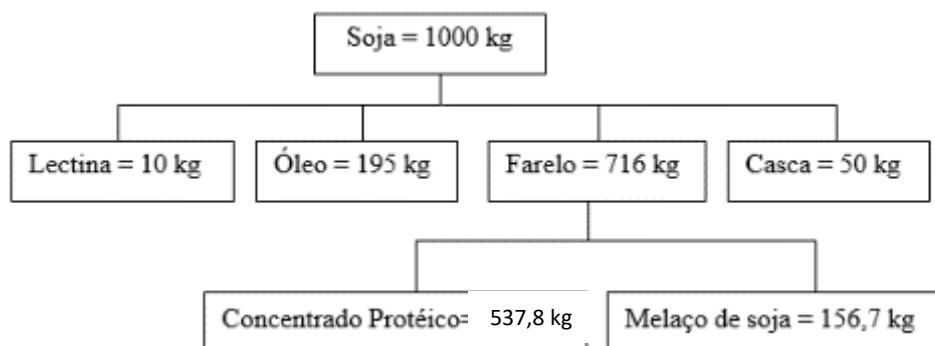
Tabela 2 – Composição típica do melaço de soja.

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| Proteína bruta (mínimo)       | 50g/Kg     |
| Umidade (máximo)              | 250g/Kg    |
| Gordura (máximo)              | 5g/Kg      |
| Fibra bruta (máximo)          | 3g/Kg      |
| Cinzas (máximo)               | 150g/Kg    |
| FDN (fibra detergente neutra) | 48%        |
| FDA (fibra detergente ácida)  | 39,8%      |
| <b>AÇÚCARES</b>               |            |
| Frutose                       | 26g/Kg     |
| Sacarose                      | 199g/Kg    |
| Rafinose                      | 50g/Kg     |
| Estaquiose                    | 119g/Kg    |
| Glicose                       | 6g/Kg      |
| <b>MINERAIS</b>               |            |
| Cálcio                        | 100mg/Kg   |
| Fósforo                       | 4150mg/Kg  |
| Sódio                         | 400mg/Kg   |
| Magnésio                      | 1300mg/Kg  |
| Potássio                      | 25400mg/Kg |
| Enxofre                       | 500mg/Kg   |

Fonte: CJSelecta,2023

Para cada tonelada de soja processada obtém-se 716 kg de farelo, sendo este utilizado para a obtenção de concentrados proteicos; 156,7 kg de melaço de soja são gerados (SIQUEIRA, 2006). A Figura 8 mostra o balanço de massa para o processamento da soja.

Figura 8 - Fluxograma do balanço de massa para o processamento de soja



Fonte: Adaptado de SIQUEIRA, 2006

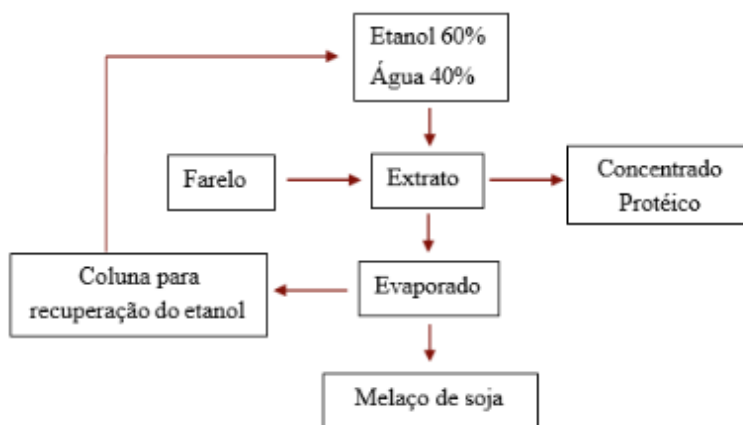
No beneficiamento da soja há uma perda mássica em torno de 3% referente ao processamento decorrente principalmente de compostos voláteis. Para o farelo de soja processado há geração de subprodutos na ordem de 75% para o concentrado proteico e 25% para o melaço de soja, na proporção massa: massa.

A obtenção do extrato proteico é tradicionalmente feita com base no ponto isoelétrico das proteínas da soja que se situa na faixa de pH 4,0 – 5,0 e pode ser alcançado com o uso de ácidos ou bases. Outra maneira de extrair as proteínas da soja é com o uso de uma mistura de etanol e água. Esta mistura insolubiliza as proteínas e fibras da soja que são retiradas após secagem obtendo um produto conhecido como proteína concentrada de soja. A fração líquida da mistura etanol e água contém na sua maior parte os açúcares da soja, que após a recuperação do etanol por evaporação gera o melaço de soja (MACHADO, 1999).

A eletroacidificação também é usada para a obtenção de isolados. Esta técnica consiste em atingir o ponto isoelétrico da proteína da soja por meio dos íons H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> provenientes da dissociação da água. Este método traz consigo a vantagem de não gerar resíduos de ácido e base (BAZINET et al., 1997). Além disso, não há desnaturação de proteínas como no método tradicional.

O processo de extração com etanol pode ser usado para obtenção de concentrados proteicos. O processo consiste na diluição do farelo desengordurado em uma solução 60% etanol mais 40% água. Por extração são separadas duas frações, uma composta por um concentrado alcoólico insolúvel contendo 66-70 % de proteína e outra líquida contendo principalmente açúcares. A fração líquida é destilada para a recuperação do solvente restando o chamado melaço de soja, que é o único resíduo do processo de extração de proteína com etanol. O concentrado alcoólico é comercializado seco, obtendo-se assim proteína concentrada em pó. A Figura 9 ilustra o processo de obtenção do melaço de soja.

Figura 9 - Fluxograma de obtenção do melaço de soja.



Fonte: Adaptado de SIQUEIRA, 2006.

### 3.6 Vinhaça de soja

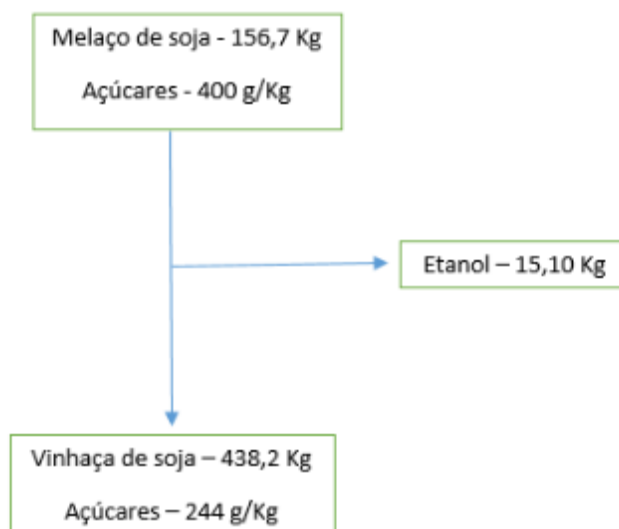
Um subproduto gerado no processamento do melaço de soja para obtenção do etanol, que vem sendo implantado no Brasil em empresas como Caramuru e CJ Selecta, é a vinhaça que por seu volume gerado e a quantidade de açúcares presente é interessante discorrer, por se aplicar o conceito de *building block* em biorefinaria.

A vinhaça de soja é o principal subproduto gerado pelo fermentação alcoólica do melaço de soja. É o resíduo do processo de destilação para recuperação do etanol. O resíduo possui alta concentração de compostos orgânicos, essencialmente açúcares não redutores. Por causa da alta demanda de oxigênio química e bioquímica, a vinhaça não pode ser tratada como um efluente comum (KARP,2007).

A fermentação alcoólica do melaço de soja por *Saccharomyces cerevisiae* converte apenas 50% da quantidade total de açúcares em etanol. Entre estes são sacarose, glicose e frutose.

Os açúcares residuais são oligômeros ligados por uma ligação  $\alpha$ -1,6, que são hidrolisados pela enzima  $\alpha$ -galactosidase (SIQUEIRA, 2006). Algumas bactérias lácticas são capaz de converter esses oligômeros em ácido lático, demonstrando a possibilidade de explorando a vinhaça de soja como substrato para produção de ácido lático. A Figura 10 mostra o balanço de massa, do melaço de soja para a vinhaça da soja.

Figura 10 – Balanço de massa do melaço de soja para vinhaça de soja



Fonte: Adaptado SIQUEIRA, 2006

Um dos produtos que pode ser gerado a partir do melaço de soja ou ainda da vinhaça de soja é o ácido láctico apresentado a seguir.

### 3.7 Ácido láctico

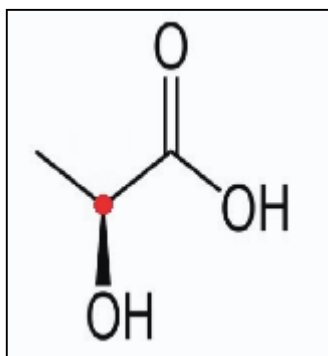
O ácido láctico é um importante ácido orgânico, denominado quimicamente por ácido 2-hidroxipropiônico ou ácido  $\alpha$ -hidroxipropiônico, sendo utilizado em indústrias químicas e alimentícias, servindo como matéria-prima para a produção de polímeros (HOFVENDAHL & HAGERDAL, 2000).

Devido à presença de um carbono assimétrico há a formação dos isômeros ópticos desta molécula. Os isômeros levógiro (L) e dextrógiro (D) do ácido láctico diferem entre si apenas pela disposição dos seus ligantes no espaço. Porém, apenas o isômero L é metabolizado pelo organismo dos mamíferos, sendo largamente utilizado na indústria alimentícia e para fins medicinais (VISHNU *et al.*, 2002).

Na Figura 11 está representada a fórmula estrutural da molécula de ácido láctico, com o carbono assimétrico desta molécula destacado em vermelho.



Figura 11 - Fórmula estrutural da molécula de ácido láctico.



Fonte: BENEVENUTI, 2016

É um ácido inodoro, com sabor levemente salino, cor cristalina e altamente corrosivo. Este ácido orgânico é representado por uma molécula orgânica de função mista, contendo uma função ácido carboxílico e uma função álcool, o que o torna adequado na realização de diversas reações de síntese orgânica.

Algumas propriedades físico-químicas do ácido láctico tais como leve acidez ( $pK_a=3,85$ ), presença de grupos funcionais ácido carboxílico e álcool, biodegradabilidade, não toxicidade, alta capacidade de retenção de água e estabilidade química/térmica, o tornam aplicável nas indústrias de alimentos, cosméticos, polímeros e farmacêutica (DATTA et al, 1995).

Na indústria alimentícia, que consome aproximadamente 85% do ácido láctico produzido no mundo (DATTA et al, 1995), este importante ácido orgânico pode ser utilizado para as seguintes finalidades: aumentar o tempo de vida dos alimentos pelo controle microbiológico, fortificação mineral, redução da quantidade de sódio sem prejuízo do sabor, preservação natural e prevenção quanto à descoloração que os alimentos podem sofrer ao passar do tempo (CORBION, 2022).

Na indústria de cosméticos, o ácido láctico pode ser utilizado em diversos processos atuando no controle de pH e no processo de descalcificação. Pode ser utilizado também na produção de hidratantes, como agente de clareamento, rejuvenescimento, como agente anti-acne e anti-tártaro, como solvente verde, além de ser monômero para produção do polímero de ácido láctico (PLA). Na indústria farmacêutica, o ácido láctico pode ser utilizado para nutrição parenteral, em solução de diálise e para preparações minerais. Para fins medicinais, o PLA pode ser utilizado na produção de próteses, suturas bioabsorvíveis e cápsulas de liberação lenta de medicamentos (CORBION, 2022).

Devido à presença dos grupos funcionais ácido carboxílico e álcool, o ácido láctico é principalmente utilizado para produção de commodities como o ácido acrílico, o acetaldeído, o propanodiol, o etil lactato, o propilenoglicol, o polilactato, a 2,3- pentanodiona e o ácido propiônico. A partir destas moléculas derivadas do ácido láctico é possível obter resinas, colas, solventes, adesivos, perfumes, hidratantes, tintas, espumas, lubrificantes, pesticidas, fraldas e plásticos, conforme mostrado na Figura 12.

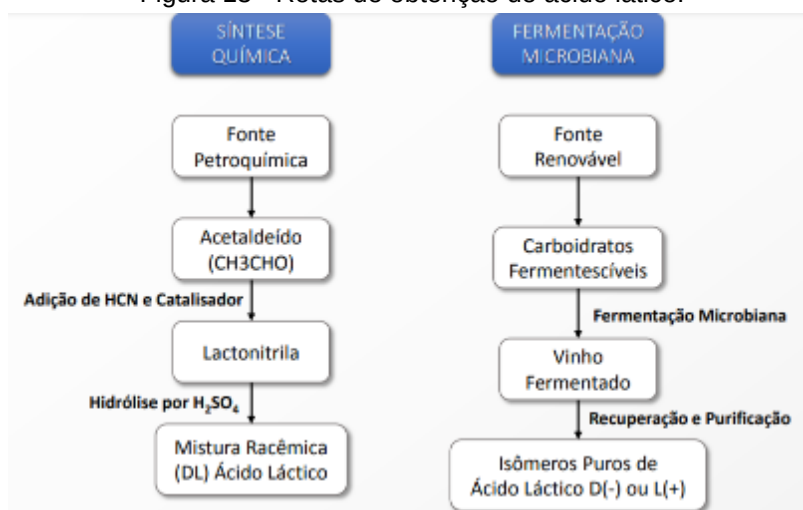
Figura 12 - Aplicações do ácido láctico.



Fonte: LUNELLI,2015.

A obtenção de ácido láctico pode ser feita por síntese química, resultando em um produto com alto grau de pureza, ou por via biotecnológica, por meio de fermentação envolvendo o cultivo anaeróbico de *Lactobacillus* (LUZ, 2014). Devido ao ácido láctico possuir em sua molécula dois grupos funcionais reativos -COOH (grupo carboxila) e -OH (grupo hidroxila), este pode ser potencialmente utilizado como intermediário químico fundamental para a síntese de diversos outros produtos químicos industriais, incluindo lactato de etila, propileno glicol, 2,3-pentanodiona, ácido propanóico, ácido acrílico, acetaldeído e dilactídeo. (VARADARAJAN & MILLER, 1999). Na Figura 13 estão esquematizadas as rotas de obtenção de ácido láctico.

Figura 13 - Rotas de obtenção de ácido láctico.



Fonte: LUNELLI,2015

Para utilização do melaço de soja como fonte de substrato para a produção de ácido láctico via fermentativa, é necessário que as moléculas de oligossacarídeos contidos nele, especificamente os açúcares sacarose, estaquiose e rafinose, sejam quebradas, o que pode ser realizado por meio de hidrólise química ou enzimática. Resultados obtidos mostram que a hidrólise química efetuada com ácido clorídrico ou sulfúrico não gera melaço hidrolisado com boa produtividade, o que foi atribuído a uma provável formação de sais (MACHADO,1999).

As matérias-primas necessárias à produção de ácido láctico industrial devem atender diversos requisitos, entre eles, baixo custo, baixos níveis de contaminantes, rápida taxa de fermentação, alta seletividade em ácido láctico e disponibilidade suficiente para a indústria (WEE; KIM; RYU, 2006; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

O mercado consumidor de ácido láctico tem apresentado significativo crescimento no mundo desde 2008 devido à utilização deste ácido orgânico como monômero para produção de PLA e à crescente demanda da indústria alimentícia e de bebidas.

A América do Norte é o principal mercado consumidor de ácido láctico no mundo, sendo os EUA responsáveis por aproximadamente 30% deste consumo. A China, por sua vez, apresenta-se como segundo maior mercado consumidor de ácido láctico, superando a quantidade consumida pela Europa em 2013 (RESEARCH IN CHINA, 2014).

A seguir serão abordados importantes aspectos ligados à obtenção de ácido láctico por rota fermentativa.

### 3.8 Aspectos ligados à obtenção de ácido láctico por rota fermentativa

#### 3.8.1 Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas para a fermentação láctica podem ser baseadas em biomassas de primeira geração, oriundas de culturas alimentícias tais como milho, trigo, arroz e melaço; biomassas de segunda geração, constituídas de resíduos agroindustriais como palha/bagaço de cana, polpa de papel e celulose e soro de queijo ou biomassas de terceira geração, oriundas de micro e macroalgas (BENEVENUTI, 2016).

A necessidade de pré-tratamento da matéria-prima dependerá do tipo de substrato presente na biomassa. Desta forma, substratos solúveis tais como glicose, frutose, sacarose e lactose são prontamente convertidos a produtos.

Já os polissacarídeos insolúveis, como o amido, necessitam de um tratamento moderado para solubilização e hidrólise antes da conversão a produtos.

E os polissacarídeos insolúveis altamente resistentes, como a celulose e a hemicelulose, necessitam de pré-tratamento físico e hidrólise ácida ou enzimática para viabilizar o acesso dos microrganismos ao substrato.

Os polissacarídeos inermenctíveis como os açúcares complexos, sacarose, rafinose e estaquiose, necessitam de um tratamento de hidrólise que pode ser de forma ácida ou enzimática.

#### 3.8.2 Agentes fermentativos

A rota bioquímica para produção de ácido láctico utiliza como principais agentes fermentativos as bactérias, microrganismos que apresentam exigências nutricionais em aminoácidos e vitaminas para seu adequado crescimento e atividade fermentativa microaeróbia (HUGENHOLTZ & KLEEREBEGEM, 1999).

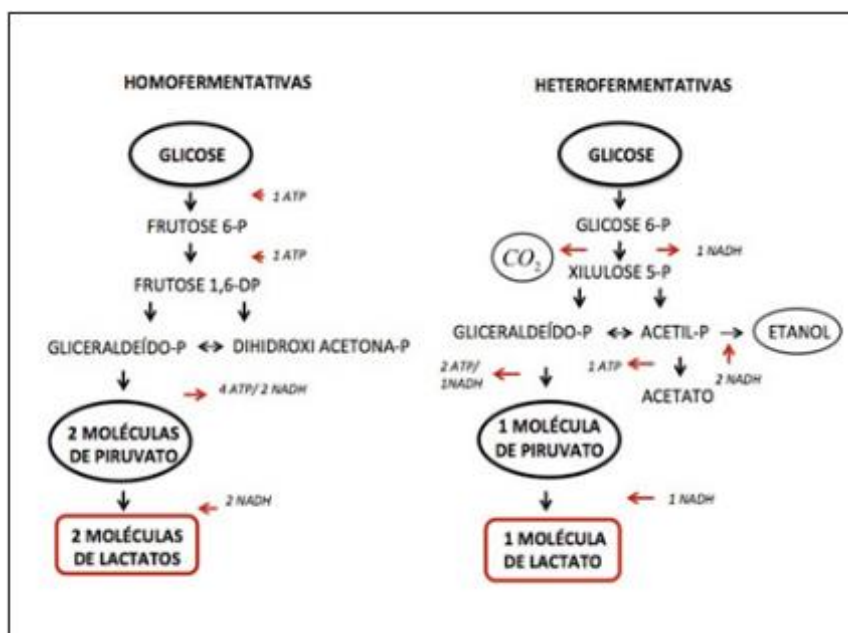
As bactérias produtoras de ácido láctico podem ser classificadas em homofermentativas ou heterofermentativas, de acordo com os principais produtos obtidos e as respectivas vias metabólicas.

As bactérias homofermentativas, representadas pelos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e alguns *Lactobacillus*, geram como produto apenas o ácido láctico. A via metabólica deste grupo de bactérias inicia-se pela via glicolítica, na qual ocorre a oxidação da glicose com geração de duas moléculas de piruvato.

O rendimento da fermentação homolática é maior que 85% e ocorre geração de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose consumida.

As bactérias heterofermentativas, como as do gênero *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus*, geram como produto da fermentação ácido láctico, ácido fórmico, etanol e  $\text{CO}_2$ . A via metabólica das bactérias heterofermentativas inicia pela via oxidativa das pentoses fosfato, gerando uma molécula de piruvato e uma molécula de acetato. O rendimento deste processo é em torno de 50% em mol e é gerada uma molécula de ATP por molécula de glicose consumida. As vias metabólicas das bactérias homofermentativas e heterofermentativas estão esquematizadas na Figura 14.

Figura 14 - Vias metabólicas das bactérias homo e heterofermentativas.



Fonte: Adaptado de FUGELSANG & EDWARDS, 2007.

A escolha do microrganismo está intimamente relacionada à escolha da matéria-prima, uma vez que cada microrganismo tem preferência por um ou mais substratos (LIMA, 2002).

Esta escolha também passa pelo estudo de viabilidade econômica, sendo que algumas bactérias têm a capacidade de quebrar as ligações de açúcares não redutores como sacarose, rafinose e estaquiose. Este ponto é de extrema importância do ponto de vista financeiro já que isenta a aquisição de enzimas como invertase ou  $\alpha$ -galactosidase que são cotados em dólar e com um custo significativo. E também do ponto de vista ambiental quando realizada hidrólise química, onde é necessária a recuperação do ácido utilizado que é um produto ambientalmente agressivo.

Como exemplos de microrganismos que podem processar os açúcares não redutores têm-se o *Lactobacillus salivarius* que produz  $\alpha$ -galactosidase na fração solúvel da célula hidrolisando melibiose, rafinose e estaquiose (MITAL *et al*, 1973), além da sacarose.

Vários organismos foram selecionados para uma seleção quanto ao meio, melaço de soja e vinhaça de soja, para verificar a capacidade de síntese de açúcares complexos (KARP, 2007) conforme apresentado a seguir na Tabela 3. O meio do mosto foi ajustado a um BRIX de 15° que é uma medida que corresponde a quantidade de açúcar presente em uma solução, em que cada grau BRIX corresponde a 1 grama de açúcar por 100 grams de solução.

Tabela 3 – Produção de ácido láctico por diferentes cepas em melaço de soja (MS) e vinhaça de soja (VS) em BRIX 15°.

| Cepa                                  | Meio | Ácido láctico (g/L) |              |              |
|---------------------------------------|------|---------------------|--------------|--------------|
|                                       |      | 24 horas            | 48 horas     | 72 horas     |
| <i>Lactobacillus pentosus</i>         | MS   | <b>29,38</b>        | <b>31,25</b> | <b>31,55</b> |
|                                       | VS   | 10,44               | 9,76         | 8,66         |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 0846 | MS   | 20,42               | 22,95        | 11,51        |
|                                       | VS   | 0                   | 0            | 0            |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 1344 | MS   | 2,98                | 0            | 0            |
|                                       | VS   | 0,59                | 0            | 1,06         |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 1377 | MS   | 5,61                | 1,06         | 3,35         |
|                                       | VS   | 1,07                | 0,45         | 1,28         |
| LPB 2                                 | MS   | 4,88                | 3,81         | 3,58         |
|                                       | VS   | 0,63                | 0            | 0            |
| LPB 7                                 | MS   | 16,19               | 26,52        | 31,44        |
|                                       | VS   | 5,64                | 8,27         | 8,88         |
| <i>Lactobacillus ruminis</i>          | MS   | 0                   | 0            | 0            |
|                                       | VS   | 0                   | 0            | 0            |
| <i>Lactobacillus salivarius</i>       | MS   | 2,27                | 7,53         | 22,27        |
|                                       | VS   | 2,72                | 2,91         | 3,07         |
| <i>Lactobacillus agilis</i> LPB 56    | MS   | 15,99               | 22,07        | 25,73        |
|                                       | VS   | <b>9,64</b>         | <b>22,29</b> | <b>27,76</b> |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>        | MS   | 17,52               | 18,35        | 21,63        |
|                                       | VS   | 0,27                | 10,99        | 13,83        |

Fonte: Adaptado KARP, 2007.

A seguir são apresentados os parâmetros operacionais que podem interferir nas condições otimizadas do processo.

### 3.8.3 Condições operacionais

O controle das condições operacionais é extremamente importante para a otimização do processo fermentativo.

O controle de variáveis como pH, temperatura e agitação é fundamental para garantir boa produtividade e bom rendimento do processo.

Para a produção de ácido lático pela rota bioquímica, tendo bactérias como agentes fermentativos, é importante manter o pH do meio entre 6.0 e 6.8, o que auxilia no controle do crescimento de contaminantes. A temperatura de operação ideal dependerá do microrganismo utilizado, sendo definida dentro da faixa ótima de crescimento do agente escolhido, variando, aproximadamente, entre 25 e 35°C (ANURADHA *et al.*, 1999; LIMA, 2002).

É imprescindível a adição de agente tamponante a cada 6 horas de operação do processo fermentativo, de forma a garantir o controle de pH do meio.

O agente tamponante utilizado na maioria das vezes é o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) que, além de atuar no controle de pH, fornece átomos de cálcio para formação do lactato (ANURADHA *et al.*, 1999; LIMA, 2002).

A agitação é outra variável importante para o processo fermentativo, pois garante o íntimo contato entre o ácido lático produzido e o  $\text{CaCO}_3$ , levando à formação do lactato de cálcio que será posteriormente separado e purificado (ANURADHA *et al.*, 1999; LIMA, 2002).

As principais vantagens da rota bioquímica para a produção de ácido lático são a possibilidade de utilização de matéria-prima de baixo custo e a possibilidade de produção de apenas um dos isômeros deste ácido orgânico. A proporção entre os isômeros no produto irá variar de acordo com o microrganismo escolhido e as condições operacionais adotadas (VISHNU *et al.*, 2002).

#### **3.8.4 Hidrólise**

A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura (T) ( $1 < \text{pH} < 2$ ;  $100 < T < 150^\circ\text{C}$ ).

Devido às suas características, a hidrólise ácida tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e na cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, produção de subprodutos indesejáveis e desnaturação de proteínas (SANTIAGO, 2002).

As enzimas quando comparadas com catalisadores químicos têm a característica de serem específicas para um dado substrato, sendo capazes de promover somente uma reação bioquímica com aquele substrato, em condições brandas de reação e menores problemas ambientais e toxicológicos.

### 3.8.4 .1 Hidrólise com ácido concentrado

A hidrólise ácida concentrada é realizada em baixas temperaturas, por exemplo, 40°C, e fornece rendimentos elevados de açúcar, por exemplo, 90% da produção de glicose teórica.

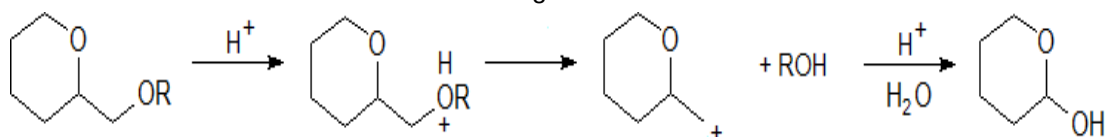
No entanto, o consumo de ácido é alto, muita energia é consumida para a recuperação e reciclagem do ácido, o equipamento pode sofrer corrosão, e o tempo de reação necessário é de 2 a 6 horas (TAHERZADEH e KARIMI, 2007; RODRIGUES, 2007).

### 3.8.4 .2 Hidrólise com ácido diluído

A hidrólise ácida diluída é caracterizada por um baixo consumo de ácido, tempos curtos de reação a elevadas temperaturas de processo. A hidrólise ácida diluída é interessante, pois a corrosão das partes metálicas durante o processo deve ser menor que na hidrólise ácida concentrada, sendo adequada para operações em larga escala (HON, 1991).

A hidrólise de açúcares em meio ácido segue o mecanismo mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Representação esquemática do mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas.



Fonte: RIBEIRO e SERAVALLI, 2007.

Amostras de melaço de soja foram hidrolisadas com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, reduzindo o pH até 3 e levando as amostras a autoclave a 121°C por 15 minutos (MACHADO,1999).

A concentração de açúcares redutores aumentou de 1,97 a 47,22 g/L. A fermentação do melaço hidrolisado não apresentou boa produtividade, provavelmente pela formação de sais durante o processo de acidificação e correção do pH para a fermentação.



Romão (2011) realizou a hidrólise química do melaço de soja testando nos experimentos o ácido sulfúrico, clorídrico e nítrico (Tabela 12). As condições mais favoráveis de hidrólise se deram com a diluição do melaço de soja em 1:4 (m:m) com BRIX de 20°, em que a hidrólise alcançou sua eficácia máxima em 20 minutos para todos os ácidos, em que após este tempo não houve acréscimo de açúcares redutores ao meio.

Na Tabela 4 pode-se verificar o rendimento em etanol para cada um dos ácidos testados, sendo  $C_E$  a concentração de etanol,  $AR$  a concentração de açúcares residuais,  $Y_{P/S}$  o rendimento em produto baseado na quantidade de substrato consumida e  $Y'_{P/S0}$  o rendimento em etanol baseado na quantidade de substrato inicialmente disponibilizada.

Tabela 4 – Rendimento por ácido testado.

| Ácido                          | P (atm) | $C_E$ (g/L) | AR (g/L) | $Y_{P/S}$ | $Y'_{P/S0}$ |
|--------------------------------|---------|-------------|----------|-----------|-------------|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,5     | 36,9        | 49,1     | 74,3      | 50,6        |
| HCl                            | 1,5     | 40,9        | 50,8     | 75,1      | 50,9        |
| HNO <sub>3</sub>               | 1,5     | 45,5        | 39,6     | 76,4      | 57,0        |

Fonte: Adaptado ROMAO,2011.

O rendimento em etanol em meio contendo melaço de soja hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pode ter sido prejudicado devido à formação de sulfito no meio em concentração inibitória à formação do álcool (AMARAL,2009). Fermentação em meio contendo melaço de soja hidrolisado com HNO<sub>3</sub> apresentou rendimento um pouco superior aos demais, podendo este resultado ser atribuído à maior capacidade oxidante desse ácido e à menor liberação de inibidores no meio fermentativo.

O melaço de soja apresentou melhores condições de produtividade com um BRIX de 20° (LETTI,2007). A produção de etanol diminui com uma BRIX de 30°. Esta redução pode estar diretamente ligada a inibição do metabolismo de substrato e redução de atividade de água em um melaço mais concentrado.

Apesar do objeto de investigação em tais trabalhos ter sido a produção de etanol a partir de melaço de soja, o estudo da hidrólise química pode ser aplicado também para a fermentação láctica.

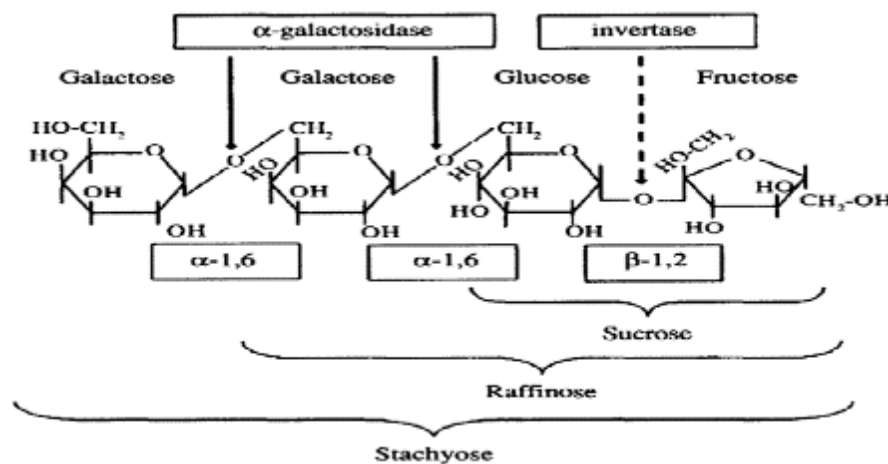
### 3.8.4.3 Hidrólise enzimática

A degradação enzimática da sacarose se faz por hidrólise de suas ligações glicosídicas sob a ação de glicosidases. Entre as glicosidases podemos citar as  $\beta$ -frutofuranosidases, em especial as invertases (ETTALIBI & BARATTI, 1987).

As invertases hidrolisam sacarose e polissacarídeos contendo uma ligação  $\beta$ -D-frutofuranosil em frutofuranosídeos e, no caso da sacarose, obtém-se uma mistura equimolar de glicose e frutose, conforme Figura 16. A invertase, uma enzima intracelular, é produzida pelo metabolismo de numerosos microrganismos, sendo sua principal fonte comercial a *Saccharomyces cerevisiae*.

As enzimas galactosidases pertencem à classe das hidrolases, são glicosidases que catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -(1,6)-galactosídicas, liberando a  $\alpha$ -D-galactose. As  $\alpha$ -galactosidases e  $\beta$ -galactosidases constituem um grupo de exoglicosidases que catalisam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-galactose em ligação  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente (GÓES e RIBEIRO, 2002), existentes na rafinose e estaquiose, conforme esquema apresentado na Figura 16.

Figura 16- Hidrólise enzimática da estaquiose e rafinose via  $\alpha$ -galactosidase



Fonte: SANADA *et al.*, 2009

Após a hidrólise da rafinose e estaquiose contidas no melaço de soja, este pode ser fermentado utilizando-se cepas selecionadas como produtoras de ácido láctico. A escolha do microrganismo está fortemente ligada à matéria-prima que será utilizada na produção, uma vez que cada microrganismo tem preferência por um ou mais substratos (LIMA, 2002).

Uma vez definido o agente biológico da biotransformação, o controle de variáveis como pH, temperatura e agitação são fundamentais para garantir boa produtividade e bom rendimento do bioprocessamento (BENEVENUTI, 2016).

Estaquiase e rafinose são conhecidos como oligossacarídeos flatulentos (OF), o que desperta o interesse da indústria de alimentos na hidrólise destes açúcares visando diminuir os teores destes oligossacarídeos e, assim, proporcionar aos consumidores melhores propriedades nutricionais e redução de problemas digestivos, o que contribui para ampliação do mercado consumidor de soja e derivados. A indústria de ração animal também usa a enzima  $\alpha$ -galactosidase em dietas animais para aumentar a digestibilidade de açúcares não digeríveis.

As enzimas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam, incluindo as oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

Processos industriais biocatalisados por enzimas apresentam menores impactos ambientais por estas serem biodegradáveis, específicas, o que minimiza a geração de co-produtos indesejáveis, e por oferecem um caminho de reação menos demandante de energia (SANTOS, 2007).

A hidrólise de oligossacarídeos gera açúcares redutores. A degradação dos oligossacarídeos requer a ação de  $\alpha$ -galactosidases e de invertases (CALLEGARI, 2003).

As  $\alpha$ -galactosidases são encontradas em plantas e animais e catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,6 de uma grande variedade de substratos atuando no reconhecimento celular, no transporte de açúcares e como glicoproteína na organização de sistemas multi-enzimáticos. Além disso, podem agir como antibiótico contra bactérias do solo, protegendo a planta contra substâncias  $\alpha$ -galactosídicas fitotóxicas produzidas por microrganismos invasores (PORTER *et al.*, 1992 apud ADEMARK *et al.*, 2001).

A  $\alpha$ -galactosidase pode ser obtida a partir de bactérias, fungos ou vegetais. Buscando otimizar a produção e obtenção desta enzima, estas diferentes microrganismos produtores têm sido estudadas por vários autores. Apesar de a enzima de origem bacteriana ser produzida em maior quantidade que a enzima de origem fúngica, as  $\alpha$ -galactosidases de fungos são obtidas mais facilmente devido à sua localização extracelular e seu amplo perfil de estabilidade (GÓES e RIBEIRO, 2002).

As reações enzimáticas de forma geral sofrem efeito do pH e da temperatura. Os efeitos do pH devem-se à ionização do substrato e resíduos de aminoácidos das enzimas e são manifestados como mudanças na atividade catalítica das enzimas, estabilidade, interações com ligantes, ou mudança no equilíbrio da reação.

Um aumento na temperatura implica maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões efetivas por unidade de tempo.

As reações enzimáticas se comportam, até certo ponto, de forma semelhante às outras reações, contribuindo consequentemente para a formação do complexo enzimático.

Mas com o aumento contínuo da temperatura, poderá haver uma inativação gradativa da enzima até a inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor. Assim, existe uma temperatura máxima de trabalho. Como exemplo destes efeitos, em um estudo realizado por, a enzima  $\alpha$ -galactosidase imobilizada, derivada de *Debaryomyces hansenii* UFV-1, apresentou uma atividade hidrolítica (quebra de moléculas na presença de água) de 40 U por g de sílica com recuperação de 50% (VIANA *et al*, 2006). O pH ótimo para a enzima livre e a imobilizada foi na faixa de 5,5 a 6,5 e temperatura ótima de 60 e 80° C, respectivamente. O tratamento de melão de soja com a enzima livre por 6 horas promoveu redução da concentração de estaquiose e rafinose em 100% e 50%, respectivamente.

Um estudo realizado por Siqueira (2006) com a enzima Prozin AEO 301, concluiu que as condições consideradas ideais para a hidrólise eram BRIX de 20, pH de 5 e temperatura de 55°C, com uma concentração enzimática de 500g para cada tonelada de mosto de melão de soja. Na Tabela 5 estão apresentados dados cinéticos da reação de hidrólise em função do tempo, a partir dos quais, pode-se constatar que a enzima possui uma característica interessante que é conseguir quebrar todos os açúcares não redutores em um período de 30 horas, gerando açúcares monoméricos fermentescíveis glicose e frutose.

Tabela 5 – Cinética de hidrólise enzimática do mosto de melão de soja.

| Açúcar (g/L)        | 0h   | 3h   | 6h   | 9h   | 18h  | 24h  | 27h  | 30h  |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Estaquiose          | 5,5  | 0    | 0    | 8,2  | 6,8  | 0    | 0    | 0    |
| Rafinose            | 6,1  | 26,9 | 21,5 | 15,4 | 5,6  | 0    | 0    | 0    |
| Sacarose            | 19,7 | 10,8 | 10,3 | 10,4 | 1    | 4    | 3,8  | 0    |
| Glicose             | 0    | 5,7  | 9,5  | 14,9 | 22   | 20,9 | 21,9 | 21,9 |
| Frutose + Galactose | 4,6  | 17,5 | 17,2 | 30,2 | 38,1 | 47,4 | 42,6 | 47,1 |
| Eficiência (%)      | -    | 41,6 | 47,5 | 51,9 | 63,8 | 75,9 | 76,5 | 75,7 |

Fonte: Adaptado SIQUEIRA,2006.

Outra enzima estudada, que apresentou resultados interessantes, foi a StarMax AGSL (SILVA,2011), para a qual foi possível realizar a sacarificação e fermentação simultaneamente (SSF) conforme Tabela 6.

O estudo foi realizado para avaliar a influência da porcentagem de enzima e da temperatura em um processo de hidrólise e fermentação simultâneas para produção de etanol a partir de meios à base de melaço de soja, onde  $AT_0$  é a concentração inicial de açúcares totais,  $AT_F$  é a concentração final de açúcares totais,  $Y_1$  é o rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos e  $Y_2$  é o rendimento de etanol formado em relação aos açúcares iniciais.

Tabela 6 – Matriz do PCC (Planejamento Composto Central)

| Ensaio | Enzima (%) | T (°C) | $AT_0$ (g/L) | $AT_f$ (g/L) | Etanol (g/L) | $Y_1$ (%) | $Y_2$ (%) |
|--------|------------|--------|--------------|--------------|--------------|-----------|-----------|
| 1      | 0,020      | 28     | 155,4        | 53,4         | 39,1         | 75,0      | 49,2      |
| 2      | 0,020      | 42     | 155,3        | 62,9         | 34,6         | 73,2      | 43,6      |
| 3      | 0,020      | 28     | 156,9        | 50,9         | 42,8         | 79,0      | 53,4      |
| 4      | 0,020      | 42     | 154,3        | 56,6         | 38,3         | 76,7      | 48,6      |
| 5      | 0,080      | 28     | 158,6        | 63,3         | 36,8         | 75,6      | 45,4      |
| 6      | 0,080      | 42     | 157,4        | 67,8         | 33,9         | 74,0      | 42,1      |
| 7      | 0,080      | 28     | 156,7        | 55,7         | 40,3         | 78,1      | 50,3      |
| 8      | 0,080      | 42     | 155,9        | 60,9         | 36,4         | 75,0      | 45,7      |
| 9      | 0,009      | 35     | 157,5        | 45,8         | 42,7         | 78,4      | 53,1      |
| 10     | 0,091      | 35     | 157,7        | 50,9         | 43,2         | 79,2      | 53,6      |
| 11     | 0,050      | 35     | 157,2        | 53,9         | 40,9         | 77,5      | 50,9      |
| 12     | 0,050      | 35     | 158,1        | 42,7         | 47,4         | 80,4      | 58,7      |
| 13     | 0,050      | 25,5   | 156,8        | 63,8         | 36,3         | 76,4      | 45,3      |
| 14     | 0,050      | 44,5   | 155,9        | 71,7         | 31,2         | 72,5      | 39,2      |
| 15     | 0,050      | 35     | 157,6        | 37,3         | 49,9         | 81,1      | 62,0      |
| 16     | 0,050      | 35     | 155,8        | 37,1         | 49,2         | 81,1      | 61,8      |

Fonte: Adaptado SILVA,2011.

O melhor rendimento em termos de hidrólise e geração de etanol ocorreu no ensaio 12, o qual foi realizado com uma concentração enzimática de 0,05%, temperatura de operação de 35°C, em um período de tempo de 12 horas.

Diante dos estudos apresentados pode-se definir que o melhor modelo de processo tecnicamente observando seria um mosto de BRIX 20° tratado com a enzima StarMax AGSL. A hidrólise enzimática possibilita um processo sem a geração de subprodutos e de forma simultânea a sacarificação e fermentação, além de ter uma produtividade maior que a hidrólise ácida.

Entretanto, a enzima usada por Silva não possui a capacidade de quebrar a sacarose, sendo necessária a adição de invertase em concentração de 2% (v/v), durante 20 minutos a 37°C para um melhor aproveitamento dos açúcares. (ROCHA *et al*, 2005).

A hidrólise enzimática possibilita um processo sem geração de subprodutos, com os processos de sacarificação e fermentação ocorrendo simultaneamente, além de ter uma produtividade maior quando comparada a hidrólise ácida, pois esta última é menos seletiva.

### **3.8.5 Tecnologias de fermentação para produção de ácido láctico**

A tecnologia de fermentação a ser utilizada para a produção de ácido varia de acordo com o substrato escolhido e a necessidade de pré-tratamento moderado ou severo para cada caso. As tecnologias denominadas SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*), SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) e SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*) são as utilizadas para a produção de ácido láctico por rota bioquímica.

#### **SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SEPARADAS (SHF)**

O processo de Sacarificação (Hidrólise) e Fermentação Separadas (SHF), consiste na realização da etapa de pré-tratamento hidrolítico da matéria-prima de composição lignocelulósica seguida de etapa de transformação fermentativa do material tratado (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008).

Para a realização da fermentação por esta tecnologia são necessários dois biorreatores, um para a etapa de hidrólise e outro para a fermentação, sendo possível controlar eficientemente as condições ideais para realização de cada etapa.

O principal fator limitante da tecnologia SHF é a inibição enzimática na etapa de hidrólise, causada pela alta concentração de açúcares atingida no biorreator conforme a matéria-prima sofre a ação das enzimas hidrolíticas. O uso de maior carga enzimática ou de maior tempo de operação são formas de minimizar os efeitos desta limitação do processo.

## SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF)

O processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) consiste na realização simultânea das etapas de hidrólise e fermentação em um mesmo reator.

O uso de enzimas celulasas para a etapa de hidrólise possibilita a junção das duas etapas, uma vez que a ação destas enzimas se dá simultaneamente à ação dos microrganismos fermentadores (SCHLITTLER, 2012). Como as etapas de sacarificação e hidrólise da matéria-prima de composição lignocelulósica ocorrem simultaneamente no mesmo biorreator, não há inibição das enzimas hidrolíticas, pois o açúcar gerado na hidrólise é prontamente consumido pelos microrganismos fermentadores. Por outro lado, cada etapa do processo tem condições de temperatura e pH ideais distintas, o que torna o controle destas variáveis a principal limitação desta tecnologia.

## SACARIFICAÇÃO E CO-FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSCF)

O processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas surge a partir da utilização de alguns microrganismos que apresentam a capacidade de fermentar pentoses (C5) e hexoses (C6), processo denominado co-fermentação (SCHLITTLER, 2012). O método SSCF permite maior aproveitamento da biomassa lignocelulósica pois tanto o açúcar proveniente da corrente de celulose quanto o hidrolisado hemicelulósico são utilizados como substrato para o processo fermentativo. Porém, os rendimentos de conversão destes microrganismos é baixo, o que ainda inviabiliza o uso industrial deste método (SCHLITTLER, 2012).

### **3.9 Modelagem matemática**

O termo modelo, nas Engenharias, pode ser entendido como a réplica - física ou matemática - de um sistema, possuindo todas as propriedades e funções deste (SINGH, 2009). Os modelos matemáticos, desenvolvidos de maneira adequada, são capazes de prever os efeitos (alterações) possíveis de ocorrerem no processo e têm a função de explicar fenômenos físicos na Engenharia. A modelagem matemática, por sua vez, pode ser definida como a representação física do problema por meio de um conjunto de equações consistentes.

Um dos objetivos da modelagem matemática e simulação no desenvolvimento tecnológico de processos fermentativos é antecipar o comportamento dinâmico e estacionário de tais processos (BUENO,2006) em condições não testadas empiricamente, visando determinar as condições operacionalmente ótimas para o processo, bem como a sua controlabilidade.

No contexto da presente dissertação, vários modelos cinéticos têm sido utilizados para descrever o crescimento microbiano, o consumo de substratos e a formação de produto durante fermentações lácticas, tendo em vista que no estudo teórico-experimental de um determinado processo fermentativo, o desenvolvimento de um modelo matemático é uma das etapas mais importantes, pois tal modelo poderá, dentre outras aplicações, ser usado para auxiliar no controle dos processos, bem como para reduzir custos e aumentar a qualidade do produto (DODIC *et al*, 2012).

A combinação do modelo hidrodinâmico do reator com os balanços de massa e as equações cinéticas das taxas de reação constituem uma descrição matemática completa do processo fermentativo, podendo tal modelo ser utilizado para simular como as variáveis de entrada interferem nas variáveis de saída do processo (MENDESA *et al*, 2011).

A cinética de processos fermentativos consiste no acompanhamento da concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação, propondo-se em seguida modelos matemáticos que descrevam adequadamente estes dados experimentais (ALVES, 2010). Os modelos usados em tais descrições podem ser classificados, quanto ao número de componentes usados na representação celular, em estruturados e não estruturados, e quanto à heterogeneidade da população microbiana, em segregados e não segregados, sendo os modelos não segregados-não estruturados os mais utilizados devido à generalidade, simplicidade, menor número de variáveis e parâmetros e menor esforço experimental e computacional para a identificação.

Um modelo matemático não segregado e não estruturado bastante interessante foi proposto por Anuradha et al.(1999) para descrever o processo em batelada de sacarificação e fermentação simultânea de amido a ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii*. O mesmo modelo foi aplicado posteriormente por Roy et al.(2001) para definir estratégias ótimas de controle de adições de amido durante o processo em batelada alimentada.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Melaço de soja

O melaço de soja foi fornecido pela empresa processadora de soja Selecta, localizada em Araguari - MG. As amostras foram estocadas em recipientes de plástico em um freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$  visando uma melhor conservação, em relação a contaminações microbiológicas decorrentes do processo industrial de obtenção. Antes da utilização do melaço de soja, as amostras foram descongeladas naturalmente até temperatura ambiente. Na Figura 17 está apresentada uma amostra do melaço de soja sendo manipulada por um técnico.

Figura 17 - Melaço de soja.



Fonte: CJ Selecta, 2022.

#### 4.1.2 Linhagem de cepas

As cepas foram adquiridas junto ao banco de culturas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Feira de Santana/BA. As cepas foram conservadas em glicerol 20% e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante um período de 3 meses. No total, foram adquiridas 12 cepas conforme listado na Tabela 7.

Tabela 7 - Linhagens de cepas avaliadas neste trabalho.

| Cultura | Morfologia | Espécie              |
|---------|------------|----------------------|
| LA 05   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| LA 08   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| LF 03   | cocos      | <i>Enterococcus</i>  |
| LF 07   | cocos      | <i>Enterococcus</i>  |
| LF 12   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| QC 05   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| QC 07   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| RE 02   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| RE 04   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| RE 07   | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| RE 11A  | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |
| RE 11B  | bacilos    | <i>Lactobacillus</i> |

Fonte: Autoria própria, 2022

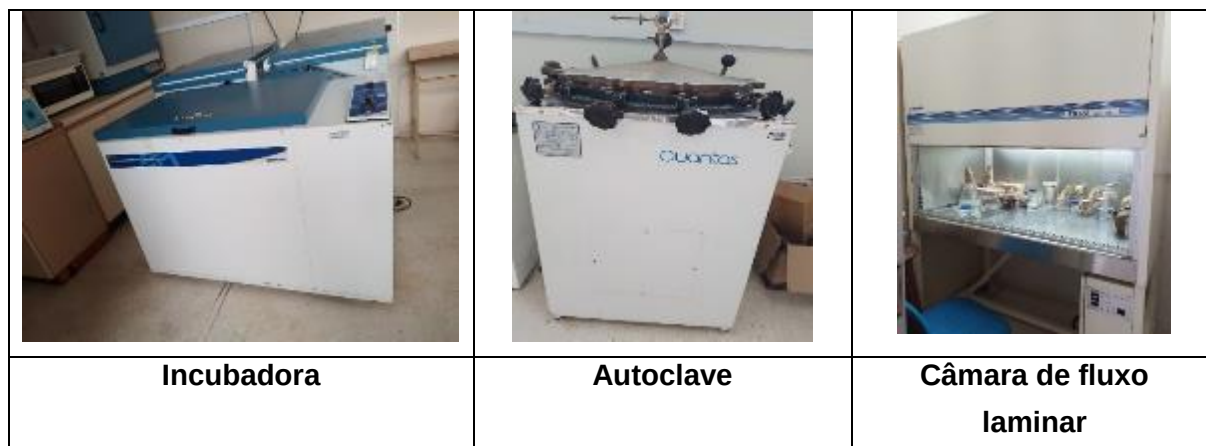
#### 4.1.3 Equipamentos de fermentação

Os ensaios de fermentação foram realizados em uma incubadora Tecnal modelo TE-421, com escala de temperatura entre 0°C e 60°C, e agitação orbital entre 30 RPM e 250 RPM, controle de temperatura digital e controle de agitação analógico, com motor de indução de 1/6 HP e compressor hermético de 1/3 HP, e capacidade de até 41 erlenmeyers de 125 mL ou 250 mL, ou 20 erlenmeyers de 500 mL ou 12 erlenmeyers de 1L.

O laboratório de biotecnologia industrial do SENAI CIMATEC localizado em Salvador/BA, conta com uma autoclave Prismatec modelo CS, vertical simples fabricada em aço inoxidável AISI 304, com capacidade de 300 L, seguindo as normas ASME/ABNT e NR 13, equipada com manômetro analógico com duas escalas, sendo a primeira de pressão de 0 a 3 kgf/cm<sup>2</sup> e a segunda de temperatura de 100°C a 143°C, com pressão máxima de trabalho de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup> correspondente a 127°C, em que todas as vidrarias, insumos e acessórios foram previamente esterilizados e a 121°C por 15 minutos.

Todo o manuseio do material após a realização da fermentação foi executado na câmara de fluxo laminar Trox modelo Technik com insufladores de ar estéril, com controle de estanqueidade conforme NSF 49, lâmpada ultra violeta e vídeo protetor. Na Figura 18 estão apresentadas fotografias destes equipamentos.

Figura 18 - Equipamentos de fermentação.



Fonte: Autoria própria, 2022.

#### 4.1.4 Reagentes

Os reagentes foram utilizados na seguinte ordem.

Para a reativação e preparo do inóculo foi preparada uma solução de MRS que contém água destilada, extrato de levedura, extrato de carne, peptona de soja, citrato de sódio, fosfato de potássio, acetato de sódio, cloreto de amônio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e dextrose. Para a preparação dos criotubos foi acrescentado glicerol 30%. O congelamento foi realizado com gelo seco ( $N_2$  solidificado) e etanol anidro P.A.

Para o método de *screening* foi utilizada uma solução MRSA que além dos reagentes da solução MRS é acrescentada ágar 3%, e também indicadores de pH sendo o verde de bromocresol e o púrpura de bromocresol. A solução de MS contém água destilada e hidróxido de sódio (NaOH) 4M.

Para a hidrólise ácida foi utilizado ácido clorídrico (HCl) 0,6M.

O método DNS engloba os seguintes reagentes, ácido 3,5 dinitrosalicílico 3,3% (m/v), NaOH 1M, tartarato de sódio e potássio tetrahidratado. Para o mosto hidrolisado é feito um pré-tratamento com HCl 1M e NaOH 1M. Solução de glicose padrão 10g/L.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Reativação e preparo do inóculo

A reativação das cepas foi realizada por inoculação de 1 mL de cultura congelada em 10 mL de meio de cultura MRS, previamente esterilizado a 121°C, em tubo de ensaio.

Etapa anterior a incubação por 24h em estufa na temperatura ótima de crescimento de cada cepa em particular (30° a 37°C).

O inóculo para utilização nos ensaios de fermentação foi preparado repicando-se a cepa reativada em outro tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo MRS, o qual foi formulado de acordo com o manual HiMedia (THE HIMEDIA PUBLISHER, 1998).

O MRS (De Man Rogosa & Sharpe) é um meio desenvolvido para favorecer o crescimento, isolamento e contagem de vários lactobacilos, particularmente os do leite. Permite também o crescimento de *Leuconostoc* e *Pediococcus* (RICHTER & VEDAMUTHU, 2001).

O MRS Ágar contém peptona e dextrose. Estes ingredientes fornecem nitrogênio, carbono e outros elementos necessários para o crescimento. Polissorbato 80, acetato, magnésio e manganês fornecem fatores de crescimento de uma variedade de lactobacilos.

Durante as duas primeiras semanas foram preparados 40 criotubos por cepa sendo que a cada semana foram preparadas 6 cepas.

No primeiro dia foi feito o planejamento e separação de todos os materiais que iriam ser utilizados na semana, sendo que os seguintes materiais tiveram que ser separados e autoclavados: 20 alças de repique, 4 alças de inoculação, pipetador automático de 1 a 10 mL e 8 respectivas ponteiros na caixa de ponteira, pipetador automático de 100 a 1000 µL e 84 respectivas ponteiros na caixa de ponteira, 900 mL de MRS separado em 4 erlenmeyers de 250 mL, 1000 mL de ágar separado em 2 erlenmeyers de 500 mL, 100 mL de água destilada com glicose separados em 10 tubos de ensaio, 40 tubos de ensaio com 9,2 mL de água destilada, 160 criotubos e glicerol 24% em 4 frascos do tipo reagente graduado com tampa azul cada um com 110 mL. A autoclavagem destes materiais foi então feita em 120°C por 20 minutos e após isso, todos os materiais foram colocados na câmara de fluxo laminar por 10 minutos.

No segundo dia foi feita a inoculação das 6 cepas em câmara de fluxo laminar colocando-se, a cada inoculação, primeiramente os 10 mL de solução com glicose no erlenmeyer com MRS e em seguida, utilizando a alça de inoculação colocou-se no criotubo uma determinada cepa, transferindo-se logo em seguida para um erlenmeyer contendo 100 mL de MRS e aguardou-se um tempo de crescimento de no mínimo 24 horas na incubadora, na temperatura ideal, sob agitação de 150 rpm. Outra etapa, foi a preparação das placas com ágar em que o ágar é aquecido e separado em 20 placas, voltando à forma gelatinosa após 20 minutos.

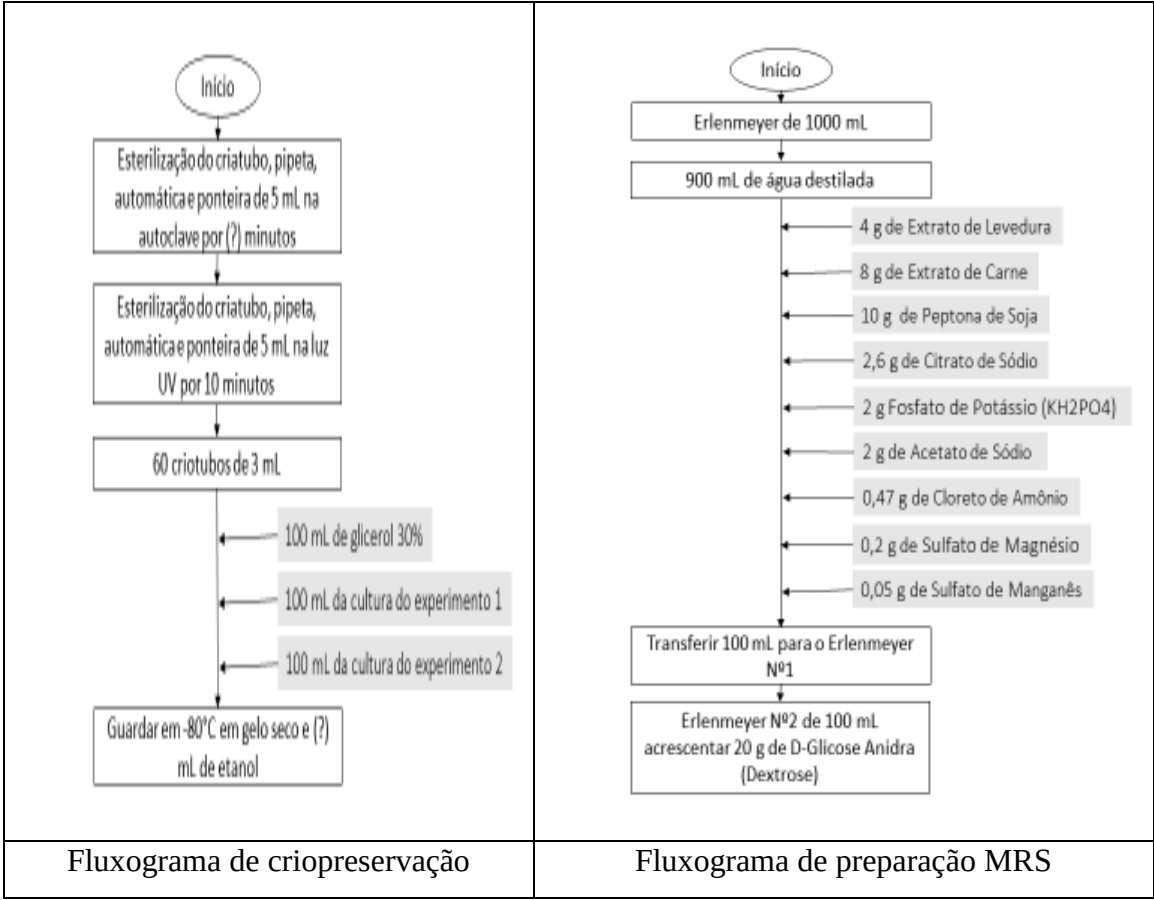
No terceiro dia foi necessário observar quais culturas tiveram um crescimento considerável para poder ser feito o repique.

Para isso, na câmara de fluxo laminar, por cepa, foi feito o seguinte procedimento: colocou-se 10 mL de glicose no erlenmeyer com MRS, transferindo-se 10 mL de cultura do segundo dia para esse mesmo erlenmeyer e colocando-o na incubadora nas mesmas condições usadas no segundo dia. Logo após o procedimento de incubação, foi feito o plaqueamento para analisar o crescimento das cepas da seguinte forma: transferiu-se 1 mL da cultura anterior para um tubo de ensaio com 9,2 mL de água destilada, denominado de nº1, agitando-se manualmente para dissolução e transferindo-se 1 mL do nº1 para o nº2, repetindo-se esse procedimento de dissolução até o tubo de ensaio nº10. Em seguida, colocou-se em cada placa com ágar, 200 µL dos tubos de ensaio nº6 ao nº10, informando-se que é uma diluição de  $10^{-6}$  a  $10^{-10}$ . Dessa maneira, foram manipuladas 5 placas por cepa, totalizando 20 placas que foram colocadas em uma estufa a uma temperatura correspondente à média das temperaturas ótimas de cada cepa.

No quarto dia foi feito o congelamento de forma que em cada cultura do terceiro dia foi adicionado os 110 mL de glicerol 30% por cepa, colocando-se 1,5 mL nos 40 criotubos e efetuando-se contato com gelo seco para o congelamento rápido (aproximadamente 90 segundos). Em seguida foi feita a identificação e o armazenamento em congelador para posterior utilização.

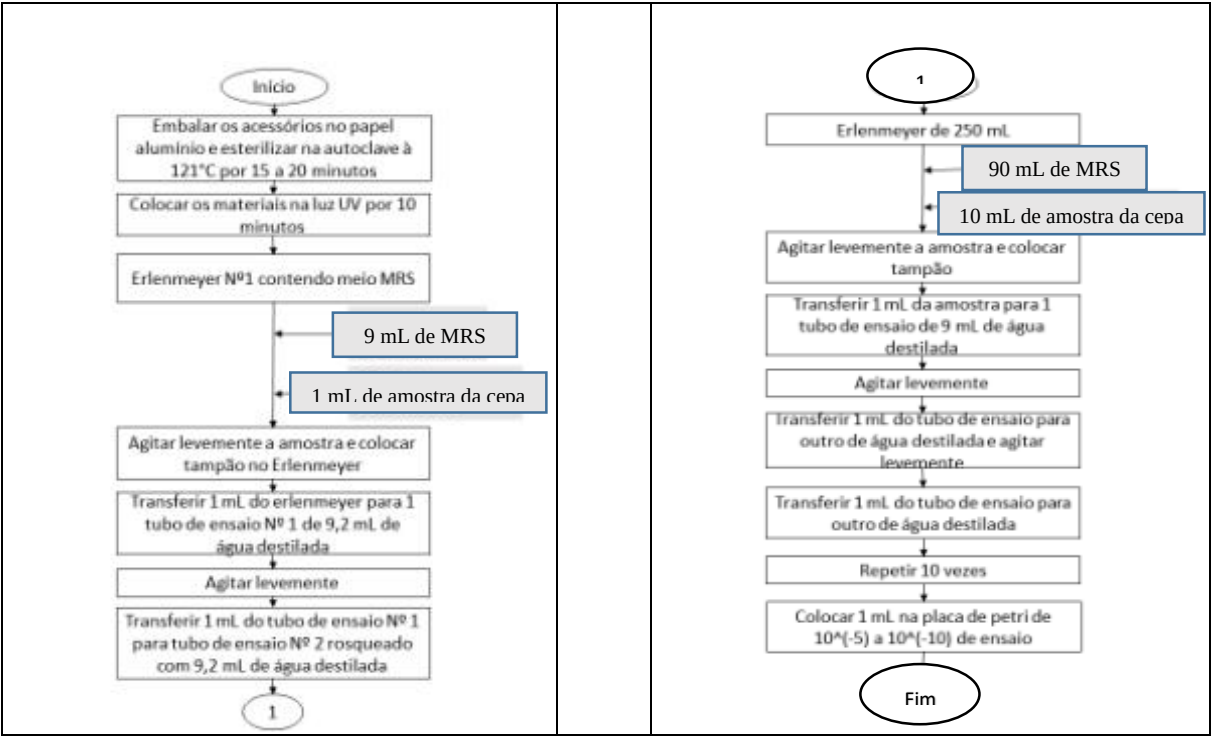
A seguir são apresentadas as Figuras 19 e 20 incorporando os fluxogramas dos métodos.

Figura 19 - Fluxogramas de criopreservação e preparo MRS.



Fonte: Autoria própria,2022

Figura 20 - Fluxograma de preparação do inóculo.



Fonte: Autoria própria,2022

#### 4.2.2 Screening de linhagem de cepa

As culturas de *Lactobacillus* e *Enterococcus* foram testadas quanto à sua capacidade de produzir ácido láctico em meio sólido (3% ágar) MRSA e melaço de soja diluído na proporção 1:3 m/m. Microrganismos foram selecionados mediante o teste de acidificação em meio sólido MRSA e melaço de soja diluído contendo os indicadores de pH verde de bromocresol e púrpura de bromocresol. Foram adicionados ao meio 5 mL/L de cada solução aquosa contendo 10 g/L de cada indicador. Os indicadores de pH utilizados foram escolhidos levando-se em consideração a faixa de viragem de ambos. O púrpura de bromocresol se mantém roxo/azul em pH 6,2 e amarelo em pH 5,2 e o verde de bromocresol torna-se azul em pH 5,4 e amarelo em pH 3,8 (CAVIN et al., 1989; DAESCHEL et al., 1984).

Uma mistura de partes iguais de 0,5% de solução aquosa de púrpura de bromocresol e 0,5% de solução aquosa de verde de bromocresol pode ser utilizada como indicador conferindo uma faixa de viragem mais ampla: a cor do meio permanece violeta em pH 6,2 e amarela em pH 4,0 (VENUS et al. 1992). O meio de cultivo teve seu pH ajustado em 6,5 utilizando NaOH 4M e foi esterilizado à temperatura de 121°C durante 15 min. Este meio foi distribuído em placas de Petri para a obtenção de uma camada de 4 a 5 mm de espessura e resfriado à temperatura ambiente até a sua solidificação. A cultura foi transferida assepticamente e as placas incubadas à temperatura ótima de crescimento de acordo com cada espécie de microrganismo (Tabela 8) foram examinadas após 24h. Os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 8 - Temperatura ótima de crescimento dos microrganismos.

| <b>Microrganismos</b>           | <b>T(°C)</b> |
|---------------------------------|--------------|
| <i>Lactobacillus</i> sp. LA 05  | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. LA 08  | 37           |
| <i>Enterococcus</i> sp. LF 03   | 35           |
| <i>Enterococcus</i> sp. LF 07   | 35           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. LF 12  | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. QC 05  | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. QC 07  | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 02  | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 04  | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 07  | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 11A | 37           |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 11B | 37           |

Fonte: Aatoria própria, 2022

### 4.2.3 Fermentação

As fermentações foram realizadas em incubadora com agitação orbital (*shaker*). Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação (90 mL de meio composto de melaço de soja diluído 1:4 (m/m) + 10 mL de inóculo). A fermentação foi realizada na temperatura ótima de cada cepa e o pH inicial ajustado entre 6,2-6,5 com NaOH 5% p/v. As concentrações de biomassa, substrato e produto foram determinadas por consultas bibliográficas de trabalhos na área. Com base nestes dados, foram quantificados o consumo de açúcares redutores totais e a produção de ácido láctico. As fermentações foram realizadas para o meio MRS e o melaço *in natura*.

### 4.2.4 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi feita partindo-se de solução de HCl 0,6 M, em que 2,5 mL de HCl 37% foi diluído em água destilada até o volume de 50 mL. A solução diluída de melaço de soja (MS) foi constituída por 100 gramas de melaço de soja e 400 gramas de água destilada, conforme consulta de metodologia de experimentos em trabalhos acadêmicos da área.

A solução de MS foi homogeneizada por 10 minutos em agitador magnético a 6 rpm. Durante a homogeneização, por meio de um conta gotas, introduziu-se a solução de HCl 0,6M na solução de MS diluído até atingir um pH de 3. A solução foi posteriormente autoclavada a 121°C por 15 minutos. Após a acidificação, o pH foi corrigido com solução de NaOH para 6,5.

## 4.3 Metodologia analítica

### 4.3.1 Determinação de biomassa seca

A análise de biomassa seca foi efetuada em amostras de 10 ml após estas serem filtradas. Este meio filtrado foi centrifugado a 8.000 RPM por 15 minutos na centrífuga marca Sigma modelo Sigma 2 - 16KHL com sotores basculantes e rotores de ângulos e capacidade de 400 mL, 14.000 minutos de programação e máxima força centrífuga rotativa de 16.123 por grama. A torta de biomassa úmida obtida na filtração foi secada em estufa, da marca Solab modelo SL101 com controlador de temperatura micro processado digital conforme Figura 21, a 65°C até peso constante. Maiores detalhes sobre a determinação de biomassa seca podem ser encontrados no Anexo A.



Figura 21 – Centrífuga e Estufa.



Fonte: Autoria própria,2022

#### 4.3.2 Determinação de açúcares redutores totais

A dosagem de açúcares redutores totais do caldo *in natura* e fermentado foi realizada usando-se o método DNS (ácido dinitrossalissílico), o qual consiste em quantificar os açúcares redutores totais por meio colorimétrico (Adaptado de MILLER,1959). A solução é disposta em tubos de Falcon e centrifugada a 8.000 rpm durante 10 minutos a 22°C.

A solução clarificada resultante é então diluída com água destilada na razão água destilada: solução clarificada fermentada de 1:9 até 9:1.

O método consiste em reagir a amostra contendo os açúcares redutores com o reagente DNS em banho-maria, a uma temperatura de 100°C, por 5 minutos. A proporção utilizada foi 1 mL de DNS para 1 mL de amostra adicionado em tubos de ensaio. Após a reação, os tubos foram colocados em banho de gelo para resfriamento e diluídos com 10 mL de água destilada para a realização da leitura em espectrofotômetro. A Figura 22 apresenta uma fotografia dos frascos de amostras de caldo fermentado diluído.

Figura 22 - Diluições para leitura DNS.



Fonte: Autoria própria,2022.

Elaborou-se uma curva analítica de glicose com faixa de concentração de 0,2 a 1,6 g/L com a finalidade de obter uma relação matemática entre a concentração de açúcares redutores versus absorbância, utilizando-se glicose como padrão. De uma solução padrão de glicose 10 g/l foram feitas diluições para obtenção de oito soluções de concentração 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 1,2 - 1,4 - 1,6 g/L. Alíquotas de 1 mL de cada solução diluída foi colocada para reagir com o reagente DNS.

As leituras de absorbância foram feitas em um espectrofotômetro da marca Femto modelo Cirrus 80MB, UV-VIS com escala de 190 nm a 1.100 nm com dois feixes de luz independentes conforme Figura 23. Maiores detalhes sobre a determinação de açúcares redutores totais podem ser encontrados no Anexo B.

Figura 23 - Espectrofotômetro.



Fonte: Autoria própria, 2022.

#### 4.3.3 Determinação de pH

O pH das amostras foi medido utilizando-se um potenciômetro digital marca Simpla modelo PH140 com escala de pH de 0 a 14 e exatidão de  $\pm 0,5$ , com compensação de temperatura na faixa de 5°C a 100°C, conforme Figura 24.

Figura 24 - pHmetro



Fonte: Autoria própria, 2022.

#### 4.3.4 Grau BRIX

O BRIX, índice refratométrico utilizado para determinar a quantidade de açúcares presentes em uma solução, das amostras foi medido utilizando-se um refratômetro portátil marca Instrutherm modelo RTC 100 com compensação automática de temperatura, escala de 0 a 32°, resolução 0,2°, conforme Figura 25.

Figura 25 - Refratômetro.



Fonte: Autoria própria, 2022.

#### 4.4 Prospecção tecnológica sobre a produção de ácido láctico a partir da fermentação de melaço de soja e potenciais aplicações concorrentes

A prospecção tecnológica sobre a produção de ácido láctico via fermentativa usando melaço de soja como substrato teve por finalidade identificar se essa rota é considerada inovadora. Para isso, foram utilizados os bancos de dados *Principal Collection*, para seleção de artigos, e da *Derwent Innovation Index<sup>TM</sup>*, para seleção de patentes, ambos disponíveis na plataforma *Web of Science<sup>TM</sup>* do Portal CAPES.

Maiores detalhes sobre a sistemática da prospecção podem ser encontrados no Anexo C.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Prospecção tecnológica sobre a produção de ácido láctico a partir da fermentação de melaço de soja e potenciais aplicações concorrentes

Os resultados principais desta prospecção estão descritos a seguir conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Artigos e patentes selecionados das buscas #8, #9, #10 na base *Principal Collection* e *Derwent Innovation Index™* da plataforma *Web of Science™*.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Registro 1 de 9</b><br><b>Título:</b> Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale<br><b>Autor(es):</b> Karp, SG <i>et al.</i>                                                                                                                                                                       |
| <b>Registro 2 de 9</b><br><b>Título:</b> Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass<br><b>Autor(es):</b> Gao, C <i>et al.</i>                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Registro 3 de 9</b><br><b>Título:</b> Lactic acid production by <i>Lactobacillus plantarum</i> LMISM6 grown in molasses: optimization of medium<br><b>Autor(es):</b> Coelho, LF <i>et al.</i>                                                                                                                                                                                  |
| <b>Registro 4 de 9</b><br><b>Título:</b> Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses<br><b>Autor(es):</b> da Silva, FB <i>et al.</i>                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Registro 5 de 9</b><br><b>Título:</b> Recent advancements in lactic acid production - a review<br><b>Autor(es):</b> Es, I <i>et al.</i>                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Registro 6 de 9</b><br><b>Título:</b> Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals<br><b>Autor(es):</b> Al Loman, A <i>et al.</i>                                                                                                                                                                                       |
| <b>Registro 7 de 9</b><br><b>Título:</b> <i>Lactobacillus salivarius</i> for conversion of soy molasses into lactic acid<br><b>Autor(es):</b> Montelongo, JL <i>et al.</i>                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Registro 8 de 9</b><br><b>Título:</b> Producing lactic acid by fermenting soybean molasses, involves preparing culture mediums, inoculating <i>Lactobacillus acidophilus</i> into culture mediums, sequentially and subjecting obtained culture to fermentation to obtain lactic acid<br><b>Autor(es):</b> YI, Y <i>et al.</i><br><b>Patente:</b> CN102181491-A; CN102181491-B |
| <b>Registro 9 de 9</b><br><b>Título:</b> Fermentation broth used for obtaining lactic acid, is provided for utilizing granulated sugar or molasses as substrate<br><b>Autor(es):</b> UONO, T.<br><b>Patente:</b> BR201016238-A2                                                                                                                                                   |

Fonte: Autoria própria, 2022

A utilização do melaço de soja com agente enriquecedor do meio, para produção via biotecnológica de ácido lático utilizando vinhaça de soja como substrato principal, foi testada no meio de cultivo (KARP *et al*, 2011), sendo o *Lactobacillus agilis* LPB 56 selecionado para a fermentação devido à sua habilidade de metabolizar oligossacarídeos complexos.

A utilização de processos biotecnológicos para a produção de ácido lático e seus derivados deverá substituir a rota química atual no futuro de forma cada vez mais consolidada (GAO *et al*, 2011), ressaltando-se os vários produtos que podem ser obtidos a partir do ácido lático bem como os tipos de substratos utilizados para a produção deste ácido.

O delineamento de Plackett-Burman foi utilizado para avaliar a adição de componentes ao melaço de cana a fim de aumentar a produtividade em ácido lático (COELHO *et al*, 2011).

Uma pesquisa interessante foi a produção de etanol via fermentação de melaço de soja por *Saccharomyces cerevisiae* (DA SILVA *et al*, 2012). Foi realizada a hidrólise dos açúcares do melaço de soja usando-se  $\alpha$ -galactosidase, o que se traduziu em uma aumento de produtividade em comparação com aquela obtida com melaço de soja não hidrolisado.

O trabalho trata especificamente da produção de etanol via melaço de soja comparando-se três situações distintas: sem hidrólise, com hidrólise anterior à fermentação e com hidrólise simultaneamente à fermentação. Uma alternativa para obtenção de ácido lático via melaço de soja pode ser a aplicação de hidrólise do melaço para aumento de produtividade.

A indústria produz comercialmente óleo de soja, farelo de soja, concentrado proteico e leite. Os subprodutos ou resíduos destes processos são o objeto de estudo para desenvolvimento de produção de biocombustíveis e produtos químicos agregados (AL LOMAN *et al*, 2016). O trabalho é interessante, pois reforça o potencial de produção de ácido lático via melaço de soja como substrato ou ainda como fonte de oligossacarídeos para outro substrato a ser utilizado.

Dos registros selecionados, somente um reporta a obtenção de ácido lático por *Lactobacillus salivarius* usando melaço de soja como fonte de substrato (MONTELONGO *et al*, 1993). O trabalho objetiva a otimização das condições de operação tais como temperatura, tempo de fermentação e pH visando ao aumento de produtividade. As condições citadas no trabalho podem servir como referência para o desenvolvimento do projeto ora proposto de produção de ácido lático a partir de melaço de soja por meio do uso de microrganismos do mesmo gênero do citado ou outros a serem selecionados.

Um método de obtenção de ácido lático utilizando melaço de soja como substrato foi patenteado pela Universidade de Guangxi, o qual utiliza *Lactobacillus acidophilus* como agente biológico e tem como vantagens o custo e a sustentabilidade (YI *et al*, 2018). A patente atualmente se encontra expirada.

Um pedido de patente da empresa ECOPLASTICO LTDA (UONO, 2018) para um processo de produção de ácido láctico tem como diferencial a utilização de granulado de açúcar ou melaço para a obtenção de ácido láctico utilizando o *Bacillus coagulans* ATCC7050. O método destaca o uso de farelo de soja como enriquecedor do melaço, citando como vantagem a obtenção de um produto oticamente puro e estável.

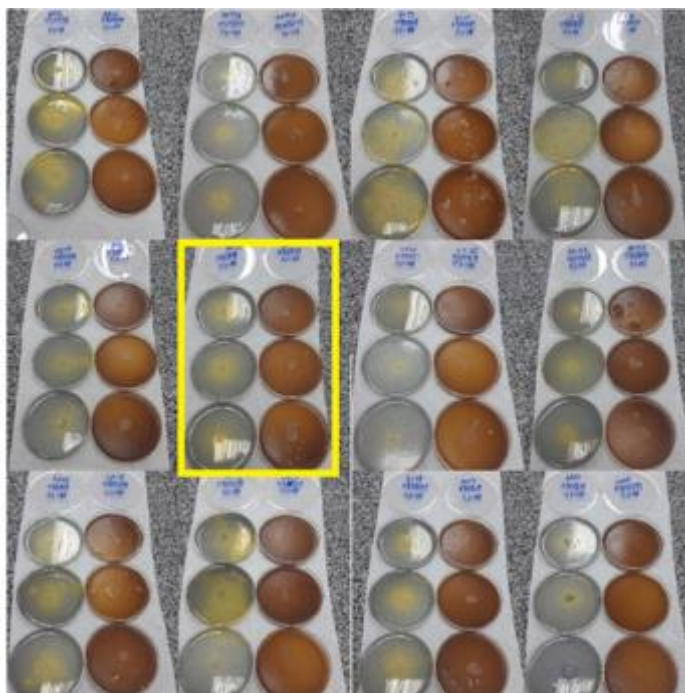
Sintetizando, esta prospecção tecnológica ratificou que o desenvolvimento de uma nova rota de produção de ácido láctico via biotecnologia, usando melaço de soja como fonte de substrato, é promissora, uma vez que não há muitos trabalhos disponíveis na literatura. Convém frisar que somente um artigo possui relação direta com o projeto de produção de ácido láctico utilizando melaço de soja. Em relação às patentes, também foi encontrada apenas uma referente à produção de ácido láctico utilizando melaço de soja como matéria-prima.

## **5.2 Screening de microrganismos fermentadores de melaço de soja**

Quase todas as cepas testadas apresentaram halos amarelos, indicando redução do pH devido à produção de ácido láctico, variando de 5 mm a 30 mm de diâmetro ao redor da biomassa microbiana inoculada, contrastando com a coloração azul esverdeada do MRSA e marrom do melaço. A Figura 26 apresenta as fotografias das placas, destacando o microrganismo que melhor se adaptou ao meio de melaço de soja (MS).

O critério de seleção baseou-se tanto na variação do pH de acordo com os indicadores utilizados quanto no tamanho/simetria do halo obtido. O microrganismo mais indicado foi o *Lactobacillus sp RE 07*, que foi selecionado para posteriores estudos cinéticos de consumo de açúcares e variação de pH durante as fermentações utilizando meios MRS e MS.

Figura 26 - Screening de microrganismos potencialmente fermentadores de melaço de soja.



Fonte: Autoria própria, 2022

Na Tabela 10 estão apresentados os valores do diâmetro médio dos halos amarelos que cada cepa apresentou, indicando a adaptação ao meio MS.

Tabela 10 - Diâmetro médio dos halos (mm).

| <b>Microrganismo</b>            | <b>MRS</b> | <b>MS</b> |
|---------------------------------|------------|-----------|
| <i>Lactobacillus</i> sp. LA 05  | 5          | 5         |
| <i>Lactobacillus</i> sp. LA 08  | 5          | 20        |
| <i>Enterococcus</i> sp. LF 03   | 5          | 10        |
| <i>Enterococcus</i> sp. LF 07   | 5          | 10        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. LF 12  | 13         | 10        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. QC 05  | 30         | 10        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. QC 07  | 10         | 10        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 02  | 10         | 20        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 04  | 15         | 15        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 07  | 5          | 30        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 11A | 13         | 10        |
| <i>Lactobacillus</i> sp. RE 11B | 5          | 15        |

Fonte: Autoria própria, 2022

O microrganismo selecionado (*Lactobacillus* sp. RE 07) é mostrado na Figura 27 através de uma fotografia obtida em um microscópio ótico com aumento de 1000 vezes.

Figura 27 – *Lactobacillus* sp RE 07.

Fonte: Autoria própria, 2022

### 5.3 Determinação da concentração de ART das soluções do MS in natura e hidrolisada, pré-fermentação

Na Tabela 11 estão apresentados os valores da concentração de açúcares redutores totais (ART) em função das medidas de absorbância a 540 nm para o melaço de soja (MS) *in natura* e hidrolisado. Esta correlação foi estabelecida tendo como base uma solução padrão de glicose.

Tabela 11 - ART em MS in natura e hidrolisado.

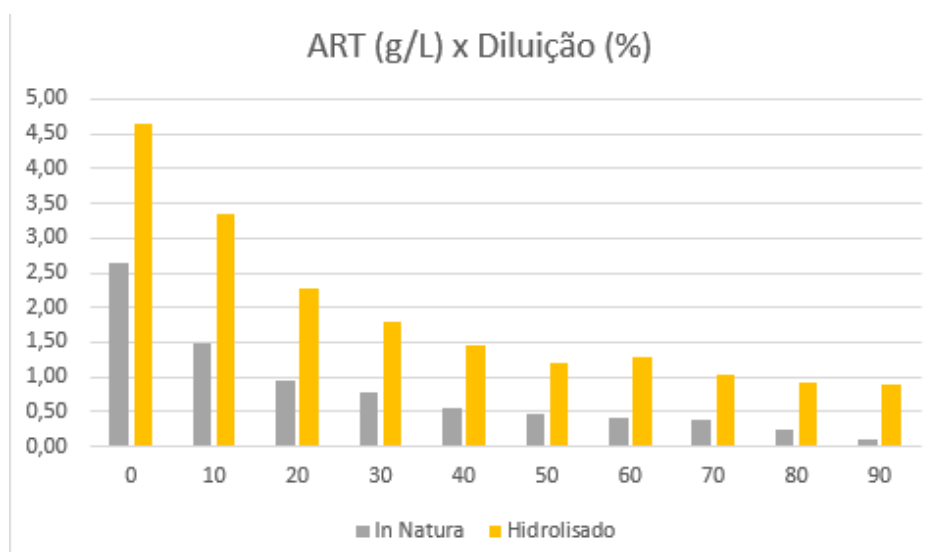
| Melaço (diluição em água) - %<br>(m/m) | ART (g/L)            |             |
|----------------------------------------|----------------------|-------------|
|                                        | <i>In<br/>Natura</i> | Hidrolisado |
| 0                                      | 2,65                 | 4,64        |
| 10                                     | 1,48                 | 3,35        |
| 20                                     | 0,94                 | 2,28        |
| 30                                     | 0,77                 | 1,78        |
| 40                                     | 0,54                 | 1,46        |
| 50                                     | 0,46                 | 1,20        |
| 60                                     | 0,40                 | 1,28        |
| 70                                     | 0,37                 | 1,03        |
| 80                                     | 0,23                 | 0,93        |
| 90                                     | 0,10                 | 0,90        |

Fonte: Autoria própria, 2022.

A quantidade de açúcares hidrolisados foi em torno de 10% do atingido na literatura (ROMÃO, 2011), esta discrepância pode ter sido ocasionada pelo tempo de hidrólise e concentração do ácido, a qual foi submetido o melaço. Para uma melhor visualização dos dados apresentados na Tabela 8 será apresentado o gráfico ART x Diluição na Figura 28.



Figura 28 – ART x Diluição.



Fonte: Autoria própria, 2022

Os dados mostram uma maior disponibilidade de açúcares redutores do MS hidrolisado em relação ao *in natura*, em que a disponibilidade maior proporcional ocorreu na diluição em 90% com uma oferta de açúcares na ordem de 800% a mais no meio hidrolisado, porém do ponto de vista econômico esta diluição se torna inviável no processo industrial devido ao tempo de reação (ROMÃO, 2011), logo a diluição em 80% reverte-se em uma oferta de glicose 304% superior no meio hidrolisado.

As diluições menores de 0 a 70%, apesar de possuírem um valor maior de açúcares redutores em termos absolutos, em termos industriais não são interessantes devido a sua alta concentração de sólidos solúveis (BRIX) que agem como limitador na fermentação (ROMÃO, 2011).

A diluição utilizada para os experimentos de fermentação foi fixado em 80%, ou seja, 1:4 m/m.

#### 5.4 Fermentações

As amostras do caldo fermentado de MRS e de MS *in natura* foram coletadas a cada duas horas a partir do momento da inoculação (0h) e analisadas quanto aos valores de pH, BRIX e açúcares redutores totais (ART), obtendo-se os perfis temporais das variáveis do bioprocessamento apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Dados de pH, BRIX, Absorbância e ART (Açúcares redutores Totais) das amostras de meio fermentado de MRS pelo *Lactobacillus* sp. RE 07.

| <b>Tempo (horas)</b> | <b>pH</b> | <b>BRIX</b> | <b>ABS (540 nm)</b> | <b>ART (g/L)</b> |
|----------------------|-----------|-------------|---------------------|------------------|
| 0                    | 6,5       | 6           | 0,079               | 1,440            |
| 2                    | 4,78      | 5           | 0,155               | 1,260            |
| 4                    | 4,3       | 5           | 0,270               | 1,135            |
| 6                    | 4,08      | 5           | 0,241               | 0,858            |
| 8                    | 3,97      | 5           | 0,230               | 0,589            |
| 10                   | 3,86      | 5           | 0,220               | 0,482            |
| 12                   | 3,83      | 5           | 0,214               | 0,344            |
| 14                   | 3,8       | 5           | 0,433               | 0,245            |
| 16                   | 3,74      | 5           | 0,505               | 0,135            |
| 18                   | 3,62      | 5           | 0,508               | 0,080            |
| 20                   | 3,62      | 5           | 0,518               | 0,077            |
| 22                   | 3,62      | 5           | 0,605               | 0,075            |

Fonte: Autoria própria, 2022.

A escolha do meio MRS como padrão de comparação em relação ao meio MS se deu devido ao conhecimento prévio dos substratos utilizados, e pelo meio ser considerado referência de crescimento para os microrganismos do gênero *Lactobacillus*. É interessante ressaltar que os açúcares constituintes em maior parcela no meio MS são estaquiose, rafinose e sacarose enquanto que no meio MS é a dextrose.

Tabela 13 - Dados de pH, BRIX, Absorbância e ART (Açúcares redutores Totais) das amostras de caldo fermentado de MS *in natura* pelo *Lactobacillus sp.* RE 07.

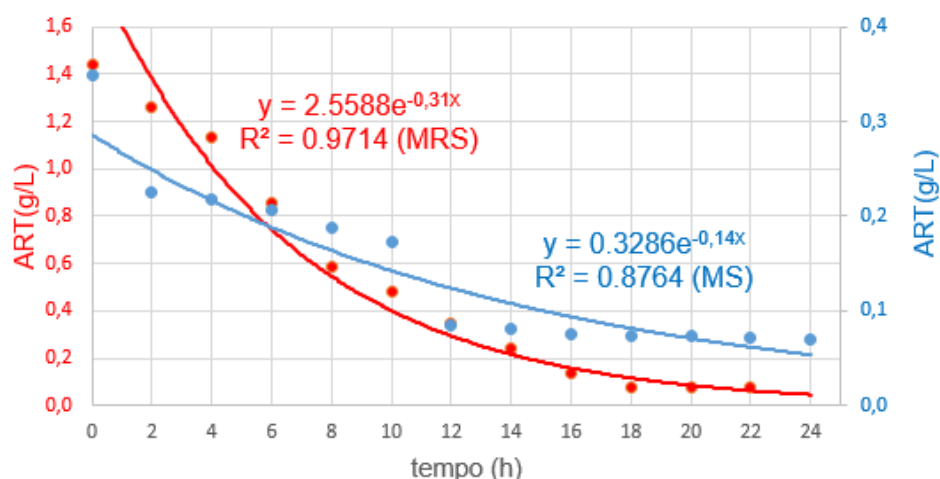
| Tempo (horas) | pH   | BRIX | ABS (540 nm) | ART (g/L) |
|---------------|------|------|--------------|-----------|
| 0             | 6,5  | 29   | 1,500        | 0,348     |
| 2             | 5,56 | 20   | 0,807        | 0,225     |
| 4             | 5,44 | 20   | 0,791        | 0,218     |
| 6             | 5,26 | 20   | 0,745        | 0,207     |
| 8             | 5,16 | 20   | 0,696        | 0,188     |
| 10            | 4,93 | 20   | 0,629        | 0,173     |
| 12            | 4,89 | 20   | 0,626        | 0,085     |
| 14            | 4,53 | 19   | 0,480        | 0,080     |
| 16            | 4,44 | 19   | 0,440        | 0,075     |
| 18            | 4,25 | 19   | 0,432        | 0,074     |
| 20            | 4,25 | 19   | 0,427        | 0,073     |
| 22            | 4,21 | 19   | 0,425        | 0,072     |
| 24            | 4,15 | 19   | 0,410        | 0,070     |
| 26            | 4,15 | 19   | 0,410        | 0,070     |

Fonte: Autoria própria, 2022

Um aspecto a ser ressaltado nas Tabelas 12 e 13 é que o BRIX da solução fermentada utilizando-se MS *in natura* teve uma redução em 10 unidades, decrescendo de 29° para 19°, mas, não atingindo BRIX de 5° como ocorreu com a solução fermentada utilizando MRS. Esta diferença no declínio do BRIX nos dois meios é devido a quantidade de açúcares redutores em termos absolutos, sendo eu o processo de fermentação cessou ao final da disponibilidade destes açúcares, podendo esta hipótese ser observada, por meio da modelagem matemática dos processos combinados de hidrólise e fermentação, a falta da enzima invertase e  $\alpha$ -galactosidase.

Na Figura 29 estão apresentadas as curvas de consumo de açúcares por *Lactobacillus sp.* RE 07 nas fermentações com MRS e MS.

Figura 29 - Consumo de ART por *Lactobacillus sp. RE 07* nas fermentações com MRS e MS.



Fonte: Autoria própria, 2022

Conforme se observa na Figura 29, o consumo de açúcares é razoavelmente descrito por uma cinética de primeira ordem (decaimento exponencial), terminando em 18 e 24 h, para os meios MRS e MS, respectivamente. A fermentação mais rápida no meio MRS provavelmente se deve ao fato de este meio conter maior quantidade absoluta de açúcares redutores e componentes não inibitórios do que o meio MS. Simultaneamente ao consumo de açúcares, o pH diminuiu, indicando a formação de ácido lático no meio de fermentação, conforme os dados apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Variação de pH durante a fermentação com MRS e MS.

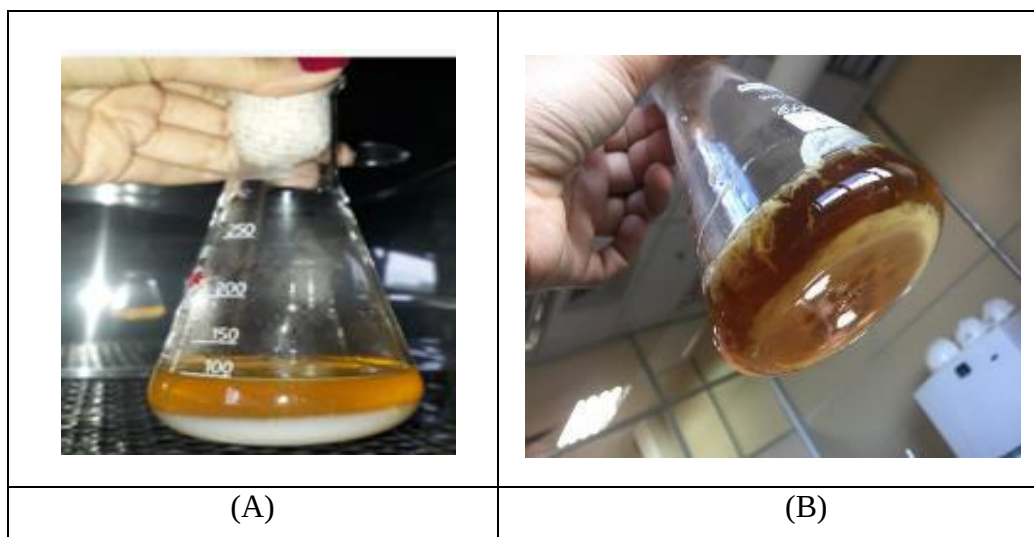
| Tempo (h) | pH – MRS | pH – SM |
|-----------|----------|---------|
| 0         | 6.5      | 6.5     |
| 18        | 3.6      | 4.3     |
| 24        | -        | 4.2     |

Fonte: Autoria própria, 2022

### 5.5 Biomassa seca

Na Figura 30 estão apresentadas fotos dos meios fermentados após encerramento das fermentações.

Figura 30 – Fermentado MRS (A) e MS (B).



Fonte: Autoria própria, 2022.

Os resultados obtidos para biomassa seca estão apresentados na Tabela 15.

Na Tabela 15 estão apresentadas as pesagens relativas à biomassa para os meios MRS, o qual é considerado padrão, MS *in natura* e MS hidrolisado. A concentração de biomassa em meio MRS determinada foi de 3,3529 g/L.

Tabela 15 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação (em gramas).

| Tubo | MRS    | MS<br><i>in natura</i> | MS<br>hidrolisado |
|------|--------|------------------------|-------------------|
| A    | 0,1386 | 1,3855                 | 1,6366            |
| B    | 0,1309 | 1,5433                 | 1,7033            |
| C    | 0,1344 | 1,5379                 | 1,659             |
| D    | 0,1354 | 1,4744                 | 1,6459            |
| E    | 0,1315 | 1,5117                 | 1,6388            |
| F    | 0,1339 | 1,5579                 | 1,6299            |

Fonte: Autoria própria, 2022

A concentração de biomassa em meio MS *in natura* determinada foi de 3,7544 g/L, e para o meio MS hidrolisado a concentração de biomassa determinada foi de 4,1306 g/L.

O meio de melaço de soja apresentou um maior crescimento de biomassa em relação ao meio padrão MRS. Tal fato pode ser explicado pela maior presença de açúcares disponíveis para fermentação no melaço de soja.

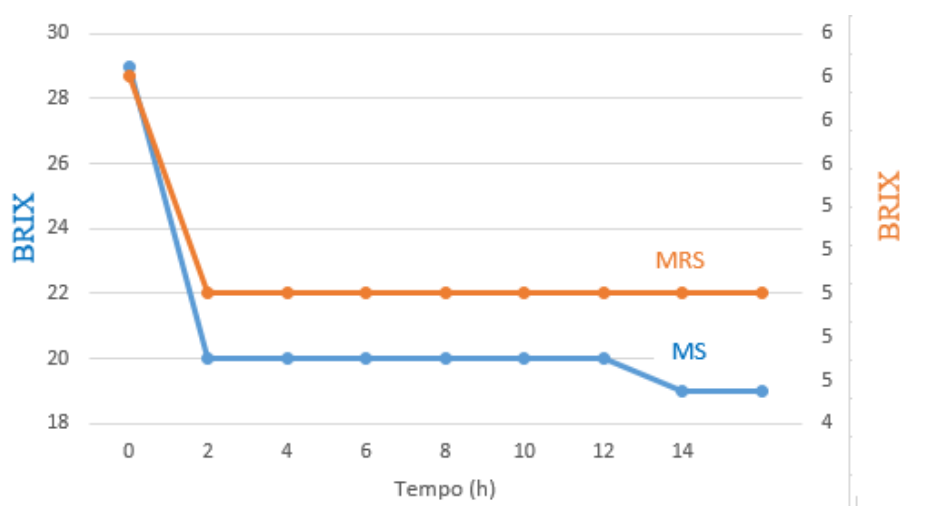
## 5.6 Modelagem matemática

Diante dos resultados apresentados torna-se necessária a realização de hidrólise química ou enzimática para disponibilizar maior quantidade de açúcares redutores no meio reacional e consequentemente obter maior produção de ácido láctico usando o microrganismo selecionado. Do ponto de vista operacional, a hidrólise ácida é impraticável simultaneamente à fermentação devido as condições operacionais, pois a temperatura e pH inviabilizariam um meio propício aos microrganismos, além do que traria complicações na etapa de *downstream* do produto. A hidrólise ácida, se escolhida, teria que ser realizada numa etapa preliminar à fermentação.

Entretanto, dependendo da severidade do processo de hidrólise, a qual é função do tempo e da temperatura de reação empregados, os açúcares monoméricos, tais como glicose e frutose, gerados a partir da quebra dos açúcares mais complexos presentes no melaço de soja (rafinose, estaquiose e sacarose), podem sofrer decomposição, diminuindo assim o rendimento nestes açúcares. Já a hidrólise enzimática elimina todos esses problemas, sendo altamente seletiva e ambientalmente amigável por requerer condições de processo muito menos severas que as da hidrólise química. Como antecipado anteriormente, a única desvantagem da hidrólise enzimática é o custo do catalisador, o qual pode encarecer o preço final do produto.

Na Figura 31 observa-se que para o meio à base de melaço de soja *in natura*, após decorrido um tempo de 14 horas, atinge-se uma fase estacionária na qual praticamente não ocorre consumo de açúcares, sendo isso atribuído ao fato de nesta fase somente estarem presentes no meio os açúcares complexos provenientes do melaço de soja (rafinose, estaquiose e sacarose).

Figura 31 – BRIX x tempo.



Fonte: Autoria própria, 2022

Se no início do processo tivessem sido adicionadas enzimas específicas para a hidrólise destes açúcares utilizando uma temperatura ideal de 35 °C, seria possível inferir o que ocorreria com o consumo de açúcares caso fosse utilizado um modelo matemático que descrevesse o processo simultâneo de sacarificação e fermentação láctica a partir de substrato complexo, tal como aquele proposto por Anuradha *et al* (1999) para descrever a produção em batelada de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* utilizando meio à base de amido, o qual é representado pelas equações de balanço de massa de microrganismos, substrato complexo (amido), glicose e produto (ácido láctico), dadas a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s = -\left(\frac{r_h}{1,11}\right) = -\left(\frac{1}{1,11}\right)\left(r_m \frac{S}{K_m(1 + G/K_G) + S}\right)$$

$$\frac{dG}{dt} = r_h - r_f = \left(r_m \frac{S}{K_m(1 + G/K_G) + S}\right) - \left(a \frac{dX}{dt} + bX\right)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

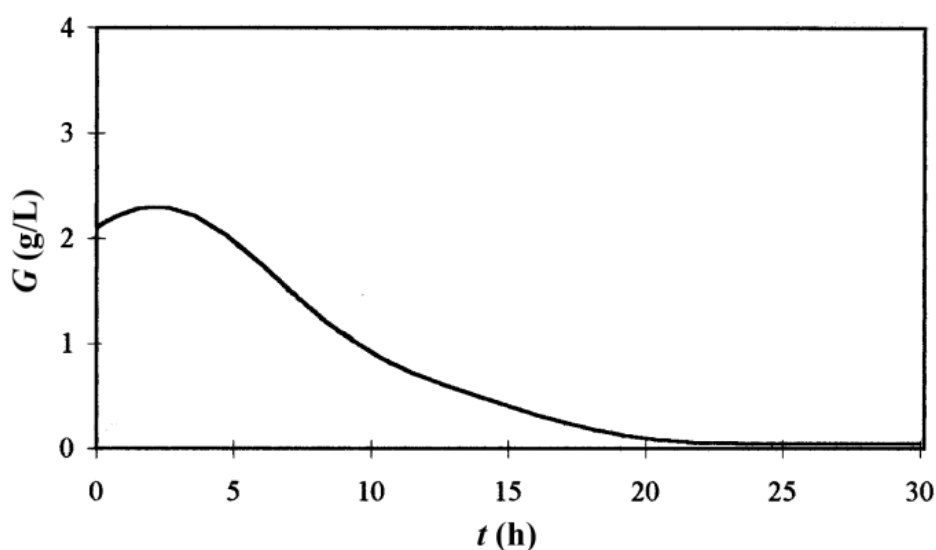
$$\mu = \mu_m e^{-K_p P} \left(\frac{G}{K_s + G + G^2 / K_i}\right) \quad ; \quad r_m = r_{m_0} e^{-(kP)^n}$$

Nestas equações,  $X$ ,  $S$ ,  $G$  e  $P$  são as concentrações de microrganismos, amido, glicose e ácido láctico, respectivamente,  $r_s$  é a taxa de consumo de substrato complexo pela reação de hidrólise,  $r_h$  é a taxa de hidrólise expressa em termos da quantidade de glicose formada,  $r_f$  é a taxa de consumo de glicose pela fermentação e  $r_p$  é a taxa de formação de produto, respectivamente. Demais símbolos correspondem aos parâmetros cinéticos do modelo, os quais foram estimados a partir de dados experimentais do processo, sendo os valores dos mesmos reportados por Anuradha *et al.*(1999).

Como principais aspectos do modelo apresentado, pode-se destacar os seguintes: (i) o crescimento microbiano é inibido exponencialmente pelo produto, bem como pela glicose, sendo a inibição pelo açúcar descrita pela equação de Andrews; (ii) a cinética de hidrólise segue a equação de Michaelis-Menten, modificada para incorporar uma inibição pela glicose do tipo competitiva e uma inibição pelo produto do tipo exponencial; (iii) segundo a estequiometria simplificada da reação de hidrólise [  $(C_6H_{10}O_5)_n + (n-1)H_2O \rightarrow n C_6H_{12}O_6$  ], 1 grama de amido gera 1,11 gramas de glicose; (iv) glicose é consumida durante a fermentação para crescimento e manutenção celular; (v) a formação de produto é parte associada e parte não associada ao crescimento celular conforme estabelecido pela cinética de Luedeking-Piret.

Uma vez dispondo-se dos valores dos parâmetros determinados para as condições experimentais utilizadas, pode-se obter curvas como aquelas mostradas nas Figuras 32 e 33, as quais representam os perfis temporais de concentração de glicose e produto simulados para o processo simultâneo de sacarificação e fermentação de amido a ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii*.

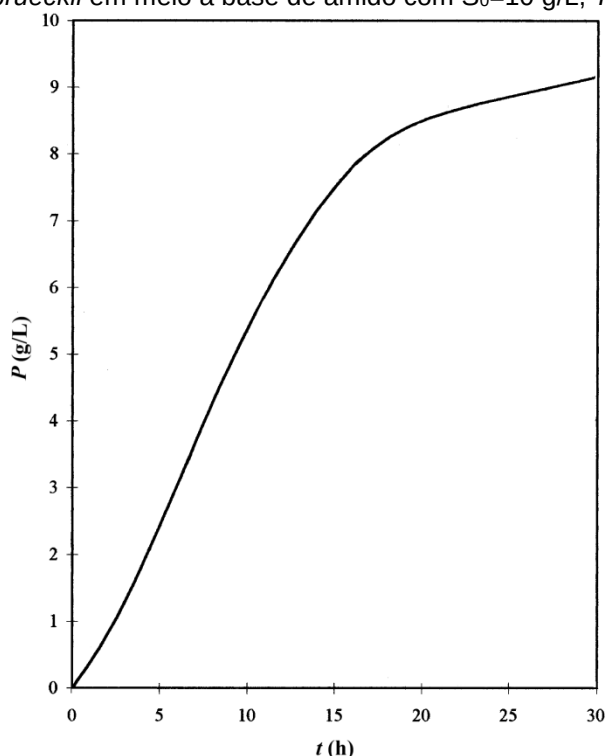
Figura 32 – Perfil simulado de concentração de glicose durante o processo SSF de produção de ácido láctico por *L. delbrueckii* em meio à base de amido com  $S_0=10$  g/L,  $T=45$  °C e pH 5,5.



Fonte: Adaptado de ANURADHA et al., 1999.



Figura 33 – Perfil simulado de concentração de produto durante o processo SSF de produção de ácido láctico por *L. delbrueckii* em meio à base de amido com  $S_0=10$  g/L,  $T=45$  °C e pH 5,5.



Fonte: Adaptado de ANURADHA et al., 1999.

Analisando-se a Figura 32 observa-se que a concentração de glicose manteve-se abaixo de 2,2 g/L, decaindo continuamente até zero ao final da fermentação. Isso significa que a taxa de sacarificação foi a controladora da velocidade global do processo SSF. Entretanto, para altas concentrações iniciais de substrato complexo, pode ser que a taxa de fermentação seja controladora do processo, principalmente nos estágios iniciais, quando ocorre acúmulo de glicose no meio devido ao crescimento ainda incipiente dos microrganismos. Uma vez atingida uma concentração suficiente de células, a demanda por glicose aumenta e a etapa de sacarificação torna-se limitante, provocando diminuição da concentração de glicose no meio até esta tornar-se virtualmente nula, quando então a taxa de sacarificação se igual à taxa de fermentação. Nesta fase, as células atingem a fase estacionária, produzindo ácido láctico ao final do processo principalmente por um metabolismo de manutenção celular.

Analisando-se a Figura 33, observa-se que o rendimento final em ácido láctico a partir da quantidade total teórica de glicose (11,1 g/L) oriunda de 10 g/L de amido foi de 82%, isto é, 9,1 g/L.

Os resultados apresentados demonstram a viabilidade técnica da utilização de hidrólise enzimática simultaneamente à fermentação para uma completa conversão em ácido láctico de todos os açúcares presentes no melaço de soja, aumentando, assim, o rendimento neste produto.

## 5.7 Análise de viabilidade econômica preliminar

O estudo de viabilidade econômica teve como principal ponto a ser considerados o tratamento enzimático a ser realizado no mosto. Como a etapa de estudo desta dissertação teve como ponto principal a fermentação, as etapas posteriores como separação, purificação e ensaque não foram consideradas.

Para a realização da análise preliminar de viabilidade econômica foram consideradas os seguintes parâmetros:

- Concentração mínima de ácido láctico em 100 g para cada litro de mosto fermentado.
- Produção diária mínima de ácido láctico de 24.876 litros.
- Densidade do ácido láctico: 1,206 g/mL
- Produção em quilogramas: 30.000 quilogramas.
- Capacidade volumétrica de produção: considerando 30.000 quilos de ácido láctico a serem produzidos, um volume de 300.000 litros de mosto teria que ser fermentado, o que requereria 5 dornas de 60.000 litros.
- Densidade do mosto de melaço de soja BRIX 20: 1,35 g/mL
- Mosto de melaço de soja em quilogramas: 405.000 quilogramas
- Enzima invertase ao custo de R\$ 0,76/g (Fonte: PROZIN,2023)
- Enzima  $\alpha$ -galactosidase ao custo de R\$ 1,00/g (Fonte: PROZIN,2023)
- Acréscimo diário de enzima invertase (0,05%): 202,5 quilogramas
- Acréscimo diário de enzima  $\alpha$ -galactosidase (0,05%): 202,5 quilogramas
- Custo diário enzima invertase 0,05% (v/v) – R\$ 153.900,00
- Custo diário enzima  $\alpha$ -galactosidase 0,05% (v/v) – R\$ 202.500,00
- Densidade do mosto de melaço de soja BRIX de 20°: 1,35g/mL
- Custo diário melaço de soja (R\$ 338,00/ton) – R\$ 136.890,00 (CJSelecta,2023)
- Custo de fabricação dos equipamentos - R\$ 15.000.000,00 (CJSelecta,2023)
- Demais custos – R\$ 10.000,00 (CJSelecta,2023)
- Preço FOB ácido láctico – R\$ 6,06/kg (MIDC,2023)

- Imposto – Zero (considerando 100% do produto exportado)
- Horizonte de 5 anos

Todos os cálculos levaram em consideração uma paridade de R\$ 5,00 por dólar.

Na Tabela 16 estão apresentados os resultados do estudo preliminar de viabilidade econômica, a partir da qual é possível notar que o projeto gera um déficit na ordem de quase R\$ 119 milhões por ano. É importante ressaltar que as etapas de *downstream* não estão contempladas neste estudo preliminar.

Tabela 16 – Estudo preliminar de viabilidade econômica (em milhões de reais).

| <b>Ácido láctico</b>         | ANO 1             | ANO 2             | ANO 3             | ANO 4             | ANO 5             |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Receita de Vendas            | 65.448,00         | 65.448,00         | 65.448,00         | 65.448,00         | 65.448,00         |
| (-) Custo de Produção        | 177.584,4         | 177.584,4         | 177.584,4         | 177.584,4         | 177.584,4         |
| <b>(=) Lucro Bruto</b>       | <b>-112.136,4</b> | <b>-112.136,4</b> | <b>-112.136,4</b> | <b>-112.136,4</b> | <b>-112.136,4</b> |
| (-) Despesas Operacionais    | 3.600,00          | 3.600,00          | 3.600,00          | 3.600,00          | 3.600,00          |
| (-) Depreciação              | -3.000,00         | -3.000,00         | -3.000,00         | -3.000,00         | -3.000,00         |
| <b>(=) Lucro Operacional</b> | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> |
| (-) Imposto                  | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |
| <b>(=) Lucro Líquido</b>     | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> | <b>-118.736,4</b> |

Fonte: Autoria própria, 2023.

A Tabela 17 mostra a relação de tempo de retorno sobre o investimento realizado pela empresa em equipamentos.

Tabela 17 – Tempo de retorno de investimento (em milhões de reais).

|                                | ANO 0             | ANO 1              | ANO 2              | ANO 3              | ANO 4              | ANO 5              |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Investimento Inicial           | -15.000,00        |                    |                    |                    |                    |                    |
| Lucro Líquido                  |                   | -118.736,4         | -118.736,4         | -118.736,4         | -118.736,4         | -118.736,4         |
| (+) Depreciação                |                   | 3.000,00           | 3.000,00           | 3.000,00           | 3.000,00           | 3.000,00           |
| (+) Valor Residual             |                   |                    |                    |                    |                    | 2.250,00           |
| <b>(=) Entrada Operacional</b> | <b>-15.000,00</b> | <b>-115.736,40</b> | <b>-115.736,40</b> | <b>-115.736,40</b> | <b>-115.736,40</b> | <b>-115.736,40</b> |
| <b>Acumulado</b>               | -15.000,00        | -130.736,40        | -246.472,80        | -362.209,20        | -477.945,60        | -591.432,00        |

Fonte: Autoria própria, 2023.

Conforme a Tabela 16 pode-se notar que o retorno sobre o investimento não é atingido. Ressaltando novamente que toda a etapa *downstream* não está contemplada.

## 6. CONCLUSÕES

Dentre os avanços científicos esperados com a realização desse projeto, inclui-se o desenvolvimento do conhecimento sobre o reaproveitamento do melaço de soja, um resíduo agroindustrial gerado em todo o Brasil e que pode ser utilizado para a produção de ácido láctico. O projeto tem potencial de aplicação industrial, e envolve desde a escolha de cepas produtoras até um possível aumento de escala desse processo. Seu impacto inovador está relacionado ao desenvolvimento de um processo de obtenção de um produto de maior valor agregado, a partir de resíduos agroindustriais.

O projeto de pesquisa tem potencial para transferência de tecnologia diretamente para a indústria. A produção de ácido láctico também se enquadra no conceito de biorrefinaria por ser um “*building block*” para a produção do poliácido láctico e, conseqüentemente, agregando valor ao agronegócio regional.

A técnica de *screening* mostrou-se uma poderosa ferramenta na seleção de microrganismos capazes de produzir ácido láctico a partir de meios a base de melaço de soja. O *Lactobacillus sp* RE 07 foi o que melhor se adaptou a este meio de cultura. A cinética do consumo de açúcares durante a fermentação do melaço de soja por este microrganismo mostrou-se de primeira ordem, apresentando um decaimento exponencial da concentração de açúcares ao longo do tempo.

A simulação do modelo matemático proposto na literatura para o processo SSF com hidrólise enzimática mostrou haver uma fase inicial na qual há acúmulo de glicose no meio, seguida de uma fase de declínio da concentração deste açúcar devido a um crescimento mais vigoroso dos microrganismos, o que acarreta uma maior demanda por glicose, fazendo com que a sacarificação se torne a etapa limitante do processo SSF neste estágio. O processo SSF segue até que seja atingida uma fase estacionária em que as taxas de sacarificação e fermentação se igualam, ocorrendo a partir desta condição de equilíbrio, uma expressiva formação de ácido láctico por um metabolismo de manutenção.

Outro aspecto a ser melhor analisado é o custo da hidrólise enzimática no processo de fermentação para produção de ácido láctico, pois, atualmente, a CJSelecta, empresa pesquisada, já produz etanol a partir do melaço de soja sem realização de hidrólise, ou seja a levedura metaboliza a sacarose, glicose e frutose, presentes no meio.

O levantamento preliminar de viabilidade econômica demonstrou a inviabilidade do projeto utilizando a hidrólise enzimática, sendo interessante uma análise mais aprofundada levando-se em consideração ensaios experimentais, com a determinação da quantidade necessária de enzimas, bem como um potencial uso de um complexo de enzimas para tornar o processo mais interessante do ponto de vista econômico.

O projeto com o substrato melaço de soja demonstra potencial, porém o microrganismo utilizado é incapaz de quebrar os açúcares não redutores o que torna o projeto não atrativo economicamente devido ao custo envolvido para realização de hidrólise.

## 7. PRÓXIMAS ETAPAS

Um trabalho de continuidade que pode ser realizado e vai de encontro ao conceito de building block em biorrefinaria seria o estudo de microrganismos capazes de realizar diretamente a conversação de açúcares não redutores, sem a necessidade de uma etapa de hidrólise, como o *Lactobacillus salivarius* (MONTELONGO,1993), *Lactobacillus pentosus* ou *Lactobacillus agilis* (KARP, 2007) utilizando como substrato o melaço de soja ou ainda o subproduto do etanol de soja, ou seja, a vinhaça de soja que possui ainda os açúcares não redutores estaquiose e rafinose. O projeto possui uma viabilidade econômica interessante por não utilizar nenhum insumo para a realização de hidrólise, que se mostrou um custo elevado do processo nesta fase de *upstream*.

A vinhaça de soja possui condições propícias para a conversão dos açúcares estaquiose e rafinose em ácido láctico, por ter como características uma temperatura de saída em 105°C do processo de destilação além de um BRIX de 18°. A produtividade de conversão pode ser estudada também com a seleção de microrganismos de acordo com a finalidade de uso da ácido láctico, e também acrescentando um volume de mosto de melaço a vinhaça.

O subproduto gerado na obtenção do ácido láctico pode ainda servir como substrato na obtenção do metano para geração de energia elétrica.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. *Multiple  $\alpha$ -galactosidases from Aspergillus niger: purification, characterization and substrate specificities*. *Enzyme and Microbial Techonology*, v.29, p.441-448, 2001.
- AKOH, C.C.; SWANSON, B.G. *One-stage synthesis of raffinose fatty acid polyesters*. *Jornal of food science*, Chicago, v.52, n.6, p.1570-1576, 1987.
- AL LOMAN, A; et al. *Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals*, *Process biochemistry*. Vol 51. p 1046-1057. 2016.
- ALVES, F. Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes versicolor* para produção de enzima lacase. Dissertação. Departamento de engenharia química. Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, 2010.
- AMARAL, F. S. Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose. Dissertação. Departamento de engenharia química. Universidade Federal de Uberlândia, 107 p., Uberlândia, 2009.
- ANURADHA R., SURESH A.K., VENKATESH K.V. *Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid*. *Process Biochemistry*. V 35: 367–75, 1999.
- BARTHOLOMAI, A. *Fábricas de alimentos: processos, equipamentos, custos*. Zafagoza: Ed. Acriba S.A., 293p., 1987.
- BAZINET, L; et al. *Electroacidification of soybean proteins for production of isolate*. *Food Technology*. 51: 56-60,1997.
- BENEVENUTI, C.S.J. Prospecção tecnológica da produção de ácido láctico no contexto de biorrefinaria: tendências e oportunidades. 2016 – f. 87. Dissertação (Mestrado em ciências). Departamento de tecnologia de processos químicos e bioquímicos. UFRJ. Rio de Janeiro. 2016.
- BOBBIO, F.O. BOBBIO, P.A. Carboidratos. In: *Introdução à química de alimentos*. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. P-46.



- BUENO, T. Modelagem, Simulação de Bioprocessos uma Abordagem introdutória. Curitiba, 2006.
- CALLEGARI, C.M. Hidrólise de Oligossacarídeos de Rafinose presentes em produtos de soja, por  $\alpha$ -galactosidases. 2003. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CAMPOS, S. A Qualidade da Soja Processada e a Importância de Eliminar os Fatores Anti- Nutricionais. Medicina Avançada. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/>> 2006.
- CAVIN, J. F., et al. *Medium for screening Leuconostoc oenos strains defective in malolactic fermentation. Applied and Environmental Microbiology.* v. 55.3, p: 751-753. 1989
- CJSELECTA. Disponível em: [www.cjselecta.com.br](http://www.cjselecta.com.br). Acessado em Agosto/2022.
- COELHO, L.F; et al. *Lactic acid production by Lactobacillus plantarum LMISM6 grown in molasses: optimization of medium. Brazilian journal of chemical engineering.* Vol 28. p 27-36. 2011.
- COWAN, R.M; HO, C.S. *Separating lactic acid fermentation media with surfactant membranes. 194<sup>th</sup> National ACS Meeting. USA.* p 1-26. 1987.
- CONAB. Acomp. safra bras. grãos, v. 8 Safra 2022/2023 – Quinto levantamento, Brasília, p. 1-84 fevereiro 2023
- CORBION. Disponível em: <http://www.corbion.com/biochemicals>. Acessado em Agosto, 2022
- DA SILVA, F.B; et al. *Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. Biochemical engineering journal.* Vol 69. p 61-68. 2012.
- DAESCHEL, M. A., Fleming, H.P. *Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. Food microbiology .* v 1.4,p: 303-313.1984

- DATTA, R. *Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives*. *FEMS Microbiology Reviews*. v-16, p-221-231. 1995.
- DE LUMEN, B.O. *Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legume*. *Food Structure*, v.11, p.33-46, 1992.
- DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. *Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles*. *Journal of Dairy Science*, v.73, p.299-307, 1990.
- DODIC J. M.; *et al.* Modelagem cinética da produção de etanol por lotes a partir de suco bruto de beterraba sacarina. *Appl Energy*. V 99:192–197.2012
- ES, I; *et al.* *Recent advancements in lactic acid production - a review*. *Food research internacional*. Vol 107. p 763-770. 2018.
- FERNANDES JÚNIOR, C. C. Integração Energética da Etapa de Extração de Óleo de Soja, Utilizando a Análise Pinch. (Dissertação Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 80 p. 2009.
- FUGELSANG, K. C. & Edwards, C., 2007. *Wine Microbiology*. USA: Springer.
- GAO, C; *et al.* *Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass*. *Biotechnology Advances*. Vol 29. p 930-939. 2011.
- GÓES, S. P.; RIBEIRO, M. L. L.  $\alpha$ -galactosidase: aspectos gerais e sua aplicação em produtos a base de soja. *Semina: Ciências Agrárias*, v.23, n.1, p.111-119, 2002.
- HETTIARACCHY, N.S.; KALAPATHY, U. *Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin*. *Journal of Food Science*, Chicago, v.62, n.6, p.1110- 1115, 1997.
- HON, D.N.S.; SHIRAISHI, N. *Wood and cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1020 p., 1991

- HOU, H.J; CHANG, F.C. *Yeld and quality of soft tofu as affected by soybean physical damage and storage. Journal of agricultural and food chemistry*. Chicago, v-116, p-4798-4805, 1998.
- HOFVENDAHL K., HAHN-HAGERDAL B., *Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology*. 26: 87–107, 2000.
- HUGENHOLTZ, J; KLEEREBEZEM, M. *Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathways rerouting involved in food fermentation. Current opinion in Biotechnology* 10, 492-497. 1999.
- IRISH, G.G. et al. *Removal of the alpha-galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous alpha-galactosidase and broiler performance. Poultry Science, Saskatoon*, v.74, n.9, p.1484-1494, 1998.
- JOHN, R.P., R. K. SUKUMARAN, K.M. NAMPOOTHIRI, A. PANDEY. *Statistical optimization of simultaneous saccharification and L(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. Biochemical Engineering Journal*. v. 36, p. 262–267, 2007.
- KARP, S.G. *Production of L-lactic acid from soybean vinasse*. Dissertação. Departamento de processos biotecnológicos. UFPR, 2007.
- KARP, S.G et al. *Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. Bioresource Technology*. Vol 102. p 1765-1772. 2011.
- KHARE, S.K.; KRISHNA, J. *Entrapment of wheat phytate in polyacrylamide gel and its application in soymilk phytate hydrolysis. Biotechnology applied biochemistry*, v. 19, p. 193- 198, 1994.
- LETTI, L.A.J. *Production of Bioethanol by Soybean Molasses Fermentation by Zymomonas Mobilis*. Dissertação. Departamento de engenharia química. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, p. 50, 2007.

- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios-aquo-restritos: Fundamentos e Aplicações Analíticas. *Química Nova*, v.22, p.229-243, 1999.
- LIMA, U.A. Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos. Vol. 3 Ed. Edgard Blucher. p 616. 2002.
- LUNELLI, B.H, et al. *Lactic acid purification by reactive distillation system using design of experiments. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. v. 95, p 26-30.2015.
- LUZ, R.A.S, et al. *Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability. Chemelectrochem*. 2014.
- MACHADO, R.P. Produção de etanol a partir de melaço de soja. 1999 – f. 151. Dissertação (Mestrado em engenharia química). Departamento de engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 1999.
- MARKETS & MARKETS. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/polylacticacid-387.html>. Acessado em fevereiro de 2023..
- MARKLEY, K.S. *Soybean and soybean products*. New York: Interscience publishers, 1974, 2v.
- MENDESA, A.J.B; et al. Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos. Parte I: Fundamentos básicos e classificação. *Ciência e Tecnologia*, p. 40. 2011.
- MIDC. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>. Acessado em Fevereiro de 2023.
- MILLER, G.L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry*. P 426-428. 1959.
- MITAL B.K, et al. *Alpha-galactosidase activity of lactobacilli. Applied Microbiology*. 26:783. 1973.
- MONTEIRO, A. R. G., Introdução à Análise Sensorial de Alimentos. Maringá, EDUEM, Editora da Universidade Estadual de Maringá, 47 p., 2000.

- MONTELONGO, J.L; et al. *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid, *Journal of food science*. Vol 58. p 863-866. 1993.
- MOREIRA, A. M. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR, Anais, p.99-104, 1999.
- PALLARDY, S. G, KOZLOWSKI, T. T. Carbohydrates: Kinds of Carbohydrates. Physiology of Wood Plants. Estados Unidos: Elsevier, 1997. p. 199-204.
- PARAÍSO, Paulo R. Modelagem e Análise do Processo de Obtenção de Óleo de Soja. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 220p. 2001.
- PINATTI, R. Usos e aplicações do melaço de soja. Trabalho de conclusão de curso – Departamento de Química - Universidade Estadual Paulista, 2022.
- PROZIN. Disponível em: <https://www.prozyn.com.br/>. Acessado em janeiro de 2023.
- PORTER, J. E. et al. Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean  $\alpha$ -galactosidase. *Enzyme Microbial Technology*, New York, v.14, p.609-613, 1992.
- POTTER, N. N.; HOTCKISS, J. H. *Food Science*. Ed 5. New York: Ed. Chanpman & Hall, 608p., 1997.
- RECH, R. et al. Curso de processamento de soja. UFRGS, Porto Alegre, 1998.
- RESEARCH IN CHINA. *Global and China Lactic Acid and Derivative Industry Report* 2014- 2016. 2014.
- REZENDE, S. T., FELIX, C. R. *Rafinose-hydrolyzing activity of Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology letters*, Kew, V.19, N.3, P217-220, 1997.
- RIBEIRO, E.P, SERAVALLI, E.A.G, Química dos alimentos. Ed. Blucher. 2007.

- RICHTER, R. L., and E. R. Vedamuthu. *Milk and milk products. Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 4. p - 483-505.2001.
- ROCHA, J.R; *et al.* *Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food chemistry.* V 95, p 77-82, 2006.
- RODRIGUES, F. A. Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana. (Dissertação Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Campinas, 2007.
- ROMÃO, B.B. Produção de etanol por hidrólise ácida de melaço de soja. 2011 – f.93. Dissertação (Mestrado em engenharia química). Departamento de engenharia química. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.2011.
- ROY S, *et al.* *Optimal control strategies for simultaneous saccharification and fermentation of starch. Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology, Mumbai.*2001.
- SANADA, C.T.D et al. *Utilization of soybean vinasse for a  $\alpha$ -galactosidase production. Food Research International*, Curitiba, v-42. P-476-483, 2009.
- SÁNCHEZ, O. J; CARDONA, C. *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology*, Colombia, n. 99, p.5270- 5295, 26 dez. 2008.
- SANTIAGO, P. A. Contribuição o estudo da produção de galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluveromyces marxianus*. (Dissertação Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Uberlândia, 2002.
- SANTOS, S. F. M. Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato. Tese (Doutorado em Engenharia Química) –Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.
- SCHLITTER, L.A.F, *et al.* *Use of Patent Applications as a Tool for Technology Development Investigations on Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass in Brazil. Journal of Technology Management & Innovation.* v. 3. 2012.

- SGARBIERI, V.C. Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações. São Paulo: Varela, 517 p, 1996.
- SILVA, M.T.C.; TURATTI, J.M. Extração de óleo de soja com etanol. Coletânea ITAL, Campinas, v.21, n.1, p.73-89, 1991.
- SILVA, F.B. Produção de etanol a partir de melaço de soja hidrolisado enzimaticamente. 2011 – f. 120. Dissertação (Mestrado em engenharia química). Departamento de engenharia química. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2011.
- SINGH, V. P. Modelação e Simulação de Sistemas. 260 p. 1ª Ed. New Age International Publishers. Índia, 2009.
- SIQUEIRA, P.F. *Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces Cerevisae*. 2007. Dissertação (Mestrado em processos biotecnológicos) – Universidade Federal do Parana. Curitiba. 2006.
- SMITH, A.K; CIRCLE, S.J. *Soybean:Chemistry and technology*.v-1,Westport:The AVI publishing company,1975,470 p.
- STRÖHER, R. Hidrólise enzimática da proteína do farelo de soja. Dissertação (Mestrado). Maringá-PR Brasil UEM 2010.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. *Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*. *BioResources* 2 (3), 472–499, 2007.
- THANANUNKUL, D. et al. *Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by galactosidase from Mortierella vinacea*. *Jornal of food science*, Chicago, v.41, p173-175, 1976.
- *THE HIMEDIA MANUAL FOR MICROBIOLOGY LABORATORY PRACTICE*. 1998. HiMedia Laboratories Pvt Limited.
- UONO, T. *Fermentation broth used for obtaining lactic acid, is provided for utilizing granulated sugar or molasses as substrate*. Patente: BR201016238-A2.

- VARADARAJAN, S., D.J. MILLER. *Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. Biotechnology Progress.* v. 15, p. 845–854, 1999.
- VENUS, J.; IDLER F., ALBRECHT C. *New ways o selecting lactic acid bacteria for biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol,* v. 37, p. 240-243 1992.
- VIANA, P. A. et al. *Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by Debaryomyces hansenii UFV-1  $\alpha$ -galactosidases. Food Chemistry,* Viçosa, n. 103, p.331-337, 2006.
- VISHNU, C, et al. *Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using Lactobacillus amylophilus GV6. World Journal of Microbiology and Biotechnology.* v. 18, p 429-433, 2002.
- WEE, Y.J., J.N. KIM, H.W RYU. *Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. Food Technology Biotechnology.* v. 44, n. 2, p. 163–172, 2006.
- YI,Y; et al. *Producing lactic acid by fermenting soybean molasses, involves preparing culture mediums, inoculating Lactobacillus acidophilus into culture mediums, sequentially and subjecting obtained culture to fermentation to obtain lactic acid.* Patente: CN102181491-A; CN102181491-B



## ANEXO A

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

O procedimento para a determinação da concentração de biomassa obtida é realizado após a fermentação.

Os resultados obtidos para biomassa seca estão apresentados nas Tabelas A.1, A.2 e A.3.

Na Tabela A.1 estão apresentadas as pesagens relativas à biomassa para o meio MRS, o qual é considerado padrão. A concentração de biomassa determinada foi de 3,3529 g/L, sendo considerado 40 mL como volume total.

Tabela A.1 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação com MRS.

| <b>Tubo</b>  | <b>Tara</b> | <b>Peso</b> | <b>Massa Seca</b> | <b><math>\Sigma</math></b> |
|--------------|-------------|-------------|-------------------|----------------------------|
| A            | 19,0256     | 19,1642     | 0,1386            | 0,1386                     |
| B            | 20,3123     | 20,4432     | 0,1309            | 0,2695                     |
| C            | 19,4032     | 19,5376     | 0,1344            | 0,4039                     |
| D            | 20,0996     | 20,2350     | 0,1354            | 0,5393                     |
| E            | 20,2260     | 20,3575     | 0,1315            | 0,6708                     |
| F            | 19,9866     | 20,1205     | 0,1339            | 0,8047                     |
| <b>Média</b> |             |             |                   | 0,1341                     |

Fonte: Autoria própria, 2022

Na Tabela A.2 estão apresentadas as pesagens de biomassa ao final da fermentação usando MS *in natura*. A concentração de biomassa determinada foi de 3,7544 g/L, sendo considerado 40 mL como volume total.

Tabela A.2 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação com MS *in natura*.

| <b>Tubo</b>  | <b>Tara</b> | <b>Peso</b> | <b>Massa Seca</b> | <b><math>\Sigma</math></b> |
|--------------|-------------|-------------|-------------------|----------------------------|
| A            | 19,2747     | 20,6602     | 1,3855            | 1,3855                     |
| B            | 19,3259     | 20,8692     | 1,5433            | 2,9288                     |
| C            | 19,7396     | 21,2775     | 1,5379            | 4,4667                     |
| D            | 19,4513     | 20,9257     | 1,4744            | 5,9411                     |
| E            | 20,3927     | 21,9044     | 1,5117            | 7,4528                     |
| F            | 20,1927     | 21,7506     | 1,5579            | 9,0107                     |
| <b>Média</b> |             |             |                   | 1,5018                     |

Fonte: Autoria própria, 2022

Na Tabela A.3 estão apresentadas as pesagens de biomassa ao final da fermentação usando MS hidrolisado. A concentração de biomassa determinada foi de 4,1306 g/L, onde foi considerado como volume total 40 mL.

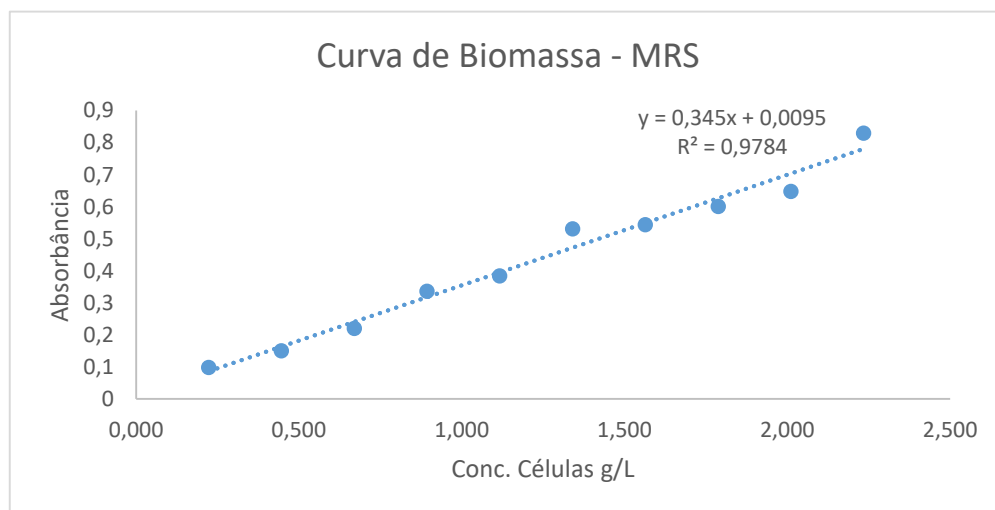
Tabela A.3 - Determinação da concentração de biomassa ao final da fermentação com MS hidrolisado.

| Tubo  | Tara    | Peso    | Massa Seca | $\Sigma$ |
|-------|---------|---------|------------|----------|
| A     | 19,352  | 20,9886 | 1,6366     | 1,6366   |
| B     | 20,3592 | 22,0625 | 1,7033     | 3,3399   |
| C     | 19,021  | 20,68   | 1,659      | 4,9989   |
| D     | 19,0942 | 20,7401 | 1,6459     | 6,6448   |
| E     | 19,1726 | 20,8114 | 1,6388     | 8,2836   |
| F     | 19,5459 | 21,1758 | 1,6299     | 9,9135   |
| Média |         |         |            | 1,6523   |

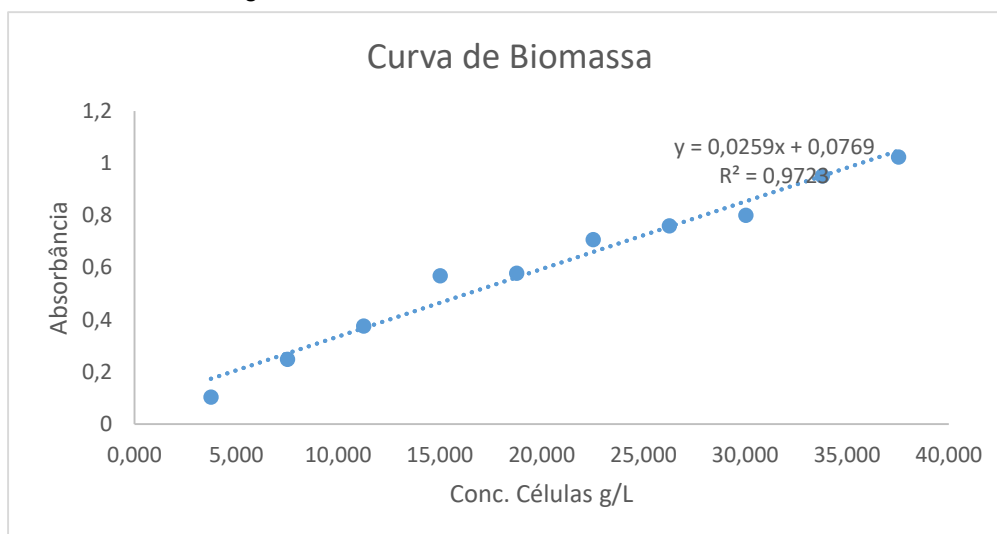
Fonte: Autoria própria, 2022.

Os gráficos que correlacionam absorbância e concentração celular estão apresentados nas Figuras A.1, A.2 e A.3, a seguir.

Figura A.1 - Curva de biomassa – MRS.

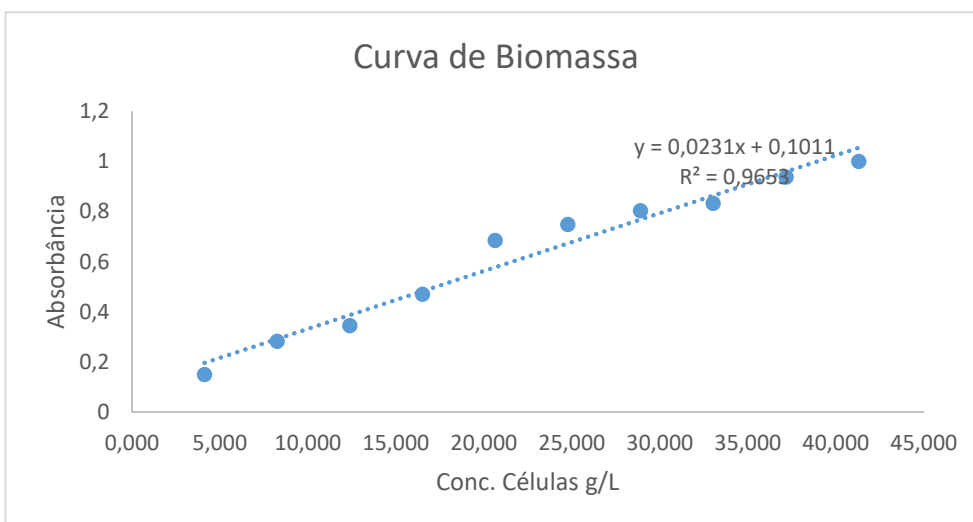


Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura A.2 - Curva de biomassa – MS *in natura*.

Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura A.3 - Curva de biomassa – MS hidrolisado.



Fonte: Autoria própria, 2022

## ANEXO B

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ART

Na Tabela B.1 estão apresentados os valores da concentração de açúcares redutores totais (ART) em função das medidas de absorbância a 540 nm para o melaço de soja (MS) *in natura* e hidrolisado. Esta correlação foi estabelecida tendo como base uma solução padrão de glicose, conforme valores apresentados na Tabela B.2.

Tabela B.1 - ART em MS *in natura* e hidrolisado.

| Melaço (diluição em água) - % | Medida absorbância (540 nm) |             | ART (g/L)        |             |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------|------------------|-------------|
|                               | <i>In Natura</i>            | Hidrolisado | <i>In Natura</i> | Hidrolisado |
| 0                             | 1,324                       | 2,25        | 2,65             | 4,64        |
| 10                            | 0,777                       | 1,65        | 1,48             | 3,35        |
| 20                            | 0,526                       | 1,15        | 0,94             | 2,28        |
| 30                            | 0,446                       | 0,92        | 0,77             | 1,78        |
| 40                            | 0,342                       | 0,77        | 0,54             | 1,46        |
| 50                            | 0,301                       | 0,65        | 0,46             | 1,20        |
| 60                            | 0,276                       | 0,685       | 0,40             | 1,28        |
| 70                            | 0,261                       | 0,57        | 0,37             | 1,03        |
| 80                            | 0,195                       | 0,52        | 0,23             | 0,93        |
| 90                            | 0,133                       | 0,51        | 0,10             | 0,90        |

Fonte: Autoria própria, 2022.

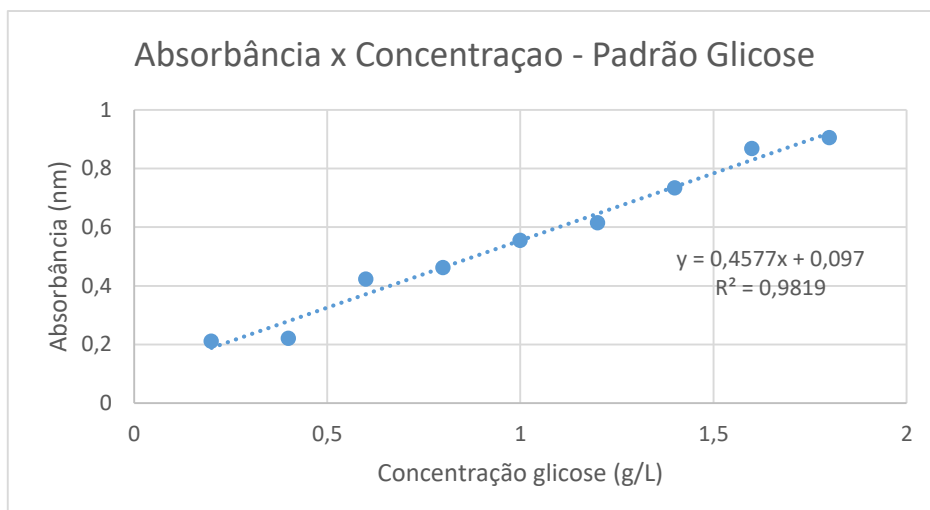
Tabela B.2 - Solução padrão de glicose.

| Concentração glicose (g/L) | Medida absorbância (540 nm) |
|----------------------------|-----------------------------|
| 0,2                        | 0,211                       |
| 0,4                        | 0,221                       |
| 0,6                        | 0,422                       |
| 0,8                        | 0,462                       |
| 1                          | 0,555                       |
| 1,2                        | 0,615                       |
| 1,4                        | 0,733                       |
| 1,6                        | 0,868                       |
| 1,8                        | 0,905                       |

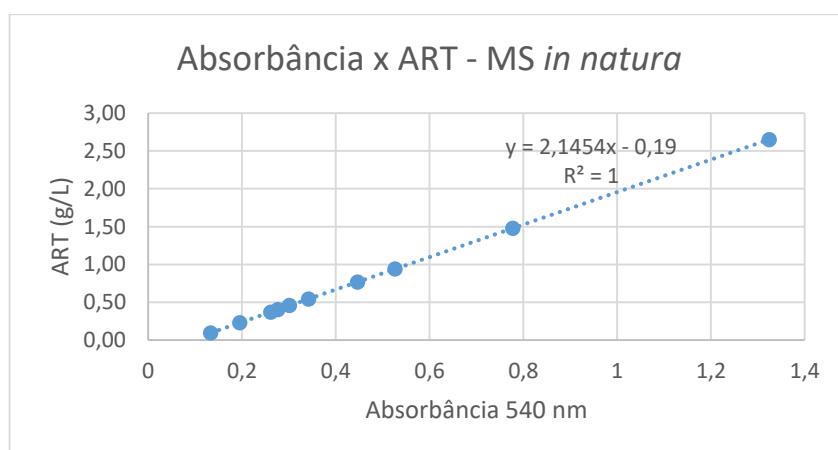
Fonte: Autoria própria, 2022

Os gráficos de correlação de ART (g/L) com absorbância estão mostrados nas Figuras B.1, B.2 e B.3.

Figura B.1 - Concentração de glicose – Padrão glicose.

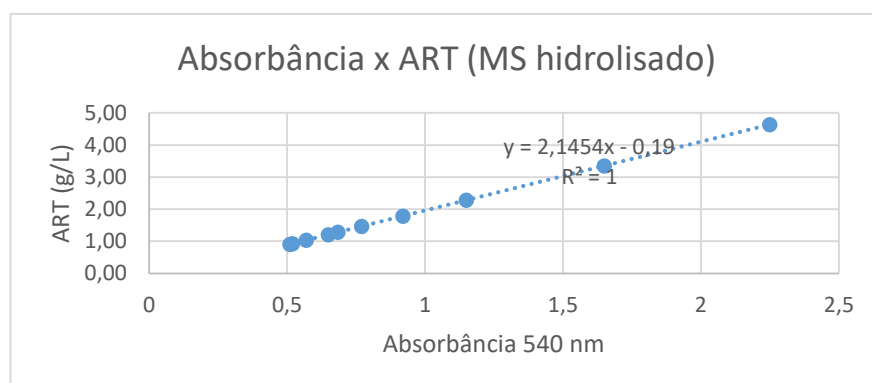


Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura B.2 - Açúcares redutores totais – MS *in natura*.

Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura B.3 - Açúcares redutores totais – MS hidrolisado.



Fonte: Autoria própria, 2022

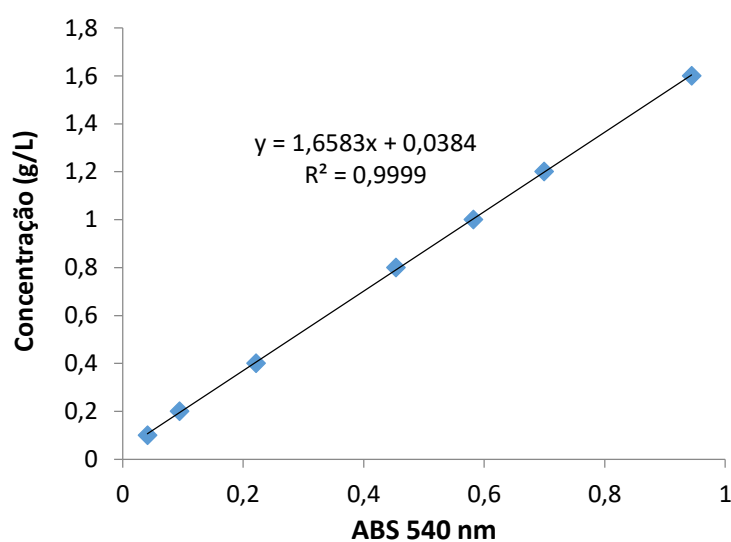
O sobrenadante clarificado pós-fermentação foi analisado para detectar os açúcares residuais que não foram convertidos no processo bioquímico. A Tabela B.3 e a Figura B.4 mostram os resultados obtidos em relação à curva padrão de glicose.

Tabela B.3 - Concentração versus absorvância para uma solução padrão de glicose.

| Concentração (g/L) | ABS 540 nm |
|--------------------|------------|
| 0,1                | 0,041      |
| 0,2                | 0,094      |
| 0,4                | 0,221      |
| 0,8                | 0,453      |
| 1                  | 0,582      |
| 1,2                | 0,699      |
| 1,6                | 0,944      |

Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura B.4 - Curva de concentração x absorvância – Solução padrão de glicose.



Fonte: Autoria própria, 2022.

## ANEXO C

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ART

A busca de anterioridades sobre ácido láctico foi realizada por meio de consulta a 66.725.435 registros nos limites de dados selecionados da base *Principal Collection* da Plataforma Web of Science<sup>TM</sup>. A Tabela C.1 apresenta os resultados da busca realizada conforme estratégia definida.

Tabela C.1 - Resultado da busca sobre ácido láctico na base *Principal Collection* da plataforma *Web of Science*<sup>TM</sup>.

| Resultados | Resultados | Salvar histórico/Criar alerta                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Abrir histórico salvo | Editar resultados | Combinar resultados | Excluir resultados         |
|------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|----------------------------|
|            |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                       |                   | AND OR<br>Combinar  | Selecionar tudo<br>Excluir |
| # 10       | 20         | #1 AND #11 AND #12 AND #13 AND #14<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado=Todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                       | Editar            |                     |                            |
| # 9        | 27         | #1 AND #10 AND #11 AND #12<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                       | Editar            |                     |                            |
| # 5        | 30         | #1 AND #7 AND #11<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                       | Editar            |                     |                            |
| # 7        | 179        | #1 AND #7 AND #14<br>Referido por (produção) Ácidos de fermentação (ACIDULEURS OR FERMENTARY ACIDULEURS OR FERMENTATION OR FERMENT OR LACTIC ACIDULEURS OR OTHER TOPICS OR PLANT SCIENCES OR GEOLOGY OR FISHERIES OR INFECTIOUS DISEASES OR MICROBIOLOGY OR REPRODUCTION RESEARCH MANAGEMENT NUTRITION OR PHARMACOLOGY)<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos |                       |                   |                     |                            |
| # 6        | 344        | #1 AND #7 AND #14<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                       | Editar            |                     |                            |
| # 5        | 140.710    | TS=(lactic acid bacteria OR Lactobacillus OR Streptococcus)<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                             |                       | Editar            |                     |                            |
| # 4        | 1.097.546  | TS=(fermentation OR production)<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                       | Editar            |                     |                            |
| # 3        | 125.389    | TS=(soybean OR soy)<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       | Editar            |                     |                            |
| # 2        | 7.754      | TS=(melanosis)<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       | Editar            |                     |                            |
| # 1        | 71.884     | TS= (lactic acid)<br>Index=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSR, ESCI Tempo estipulado= todos os anos                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                       | Editar            |                     |                            |
|            |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                       |                   | AND OR<br>Combinar  | Selecionar tudo<br>Excluir |

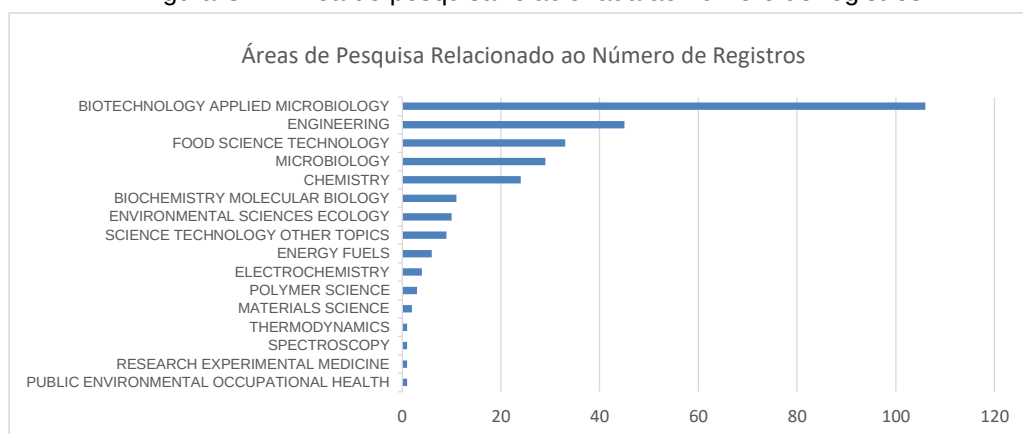
Fonte: Autoria própria, 2022.

A estratégia adotada foi ampliar o universo de amostras utilizando somente 3 palavras-chave (ácido láctico, melão e fermentação ou produção) sem restringir ao melão de soja. Verificou-se que existia um número significativo de registros (384 registros da busca #6). Estes foram refinados dentro das áreas de pesquisas pertinentes ao foco desta prospecção resultando em 179 registros na busca #7.

Uma análise preliminar de alguns artigos dentro deste universo não revelou significância quanto ao tema de interesse mas revelou muitas pesquisas envolvendo o uso do melão como substrato para processos fermentativos úteis para obtenção de produtos variados nas área de zootecnia (silagem e ração), saúde (nutrição) e farmácia (medicamentos).

A Figura C.1 apresenta a distribuição dos registros em função da área de pesquisa. Verifica-se que existe um número significativo de pesquisas na área de Biotecnologia Aplicada e Microbiologia tratando do uso de melão, produção de ácido láctico e processos fermentativos.

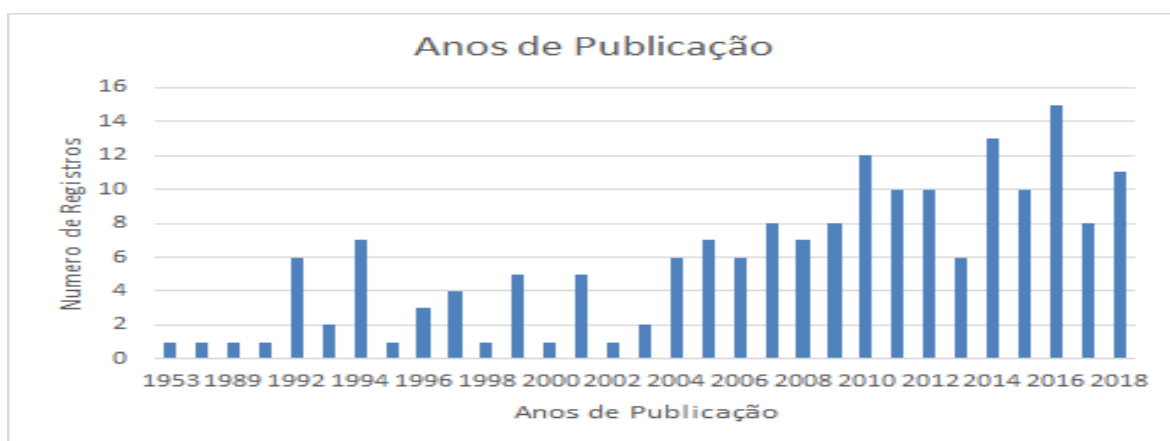
Figura C.1 - Área de pesquisa relacionada ao número de registros.



Fonte: Autoria própria, 2022.

A Figura C.2 mostra uma grande evolução em número de registros de trabalhos em relação ao ano de publicação em que há um crescimento mais significativo a partir de 2004

Figura C.2 - Número de registros x Anos de publicação.

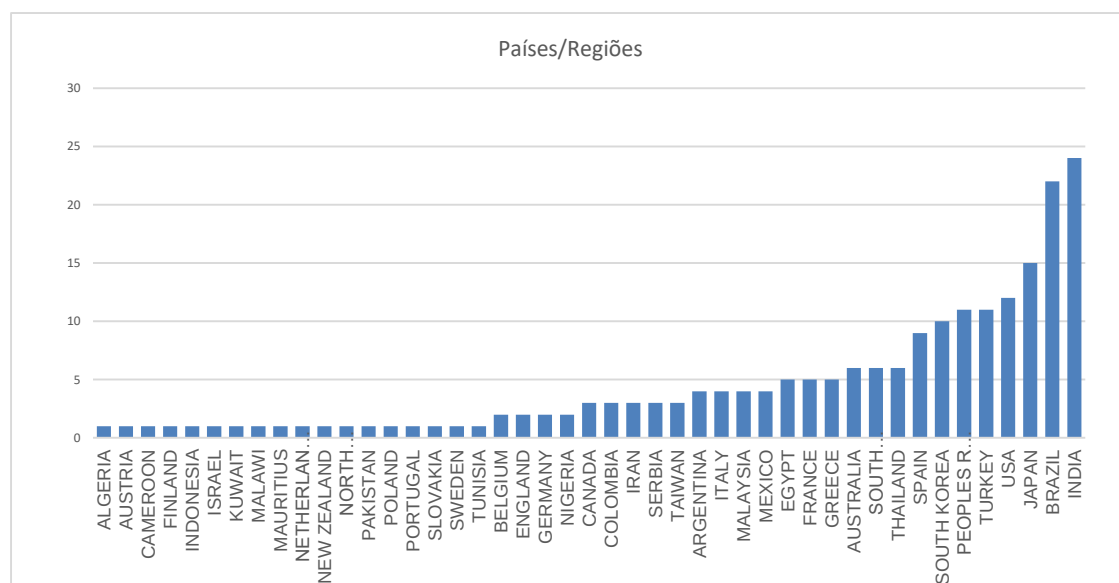


Fonte: Autoria própria, 2022.

A Figura C.3 mostra a quantidade de publicações por país e é interessante notar um grande número de publicações por parte da Índia e Brasil. Japão e Estados Unidos também se destacam em publicações nesta área.



Figura C.3 - Quantidade de publicações por país.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Com objetivo de refinar ainda mais os registros obtidos na busca #7, foram feitas as buscas #8, #9 e #10 que retornaram um número de registros dentro do recomendado, ou seja, abaixo de 50. Destas buscas #8, #9 e #10, foram selecionados 7 (sete) registros como sendo os mais relevantes relacionados ao assunto da busca, ou seja, ácido láctico utilizando melão de soja como substrato, que estão dispostos na Tabela 9. Em relação a busca de patentes foram encontrados 2 resultados mais relevantes também dispostos na Tabela

