

Produção de ácido láctico e viabilidade celular de *Lactobacillus plantarum* inoculado em caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) suplementado

Lactic acid production and cell viability of *Lactobacillus plantarum* inoculated into sugarcane juice (*Saccharum* spp.) supplemented

Producción de ácido láctico y viabilidad celular de *Lactobacillus plantarum* inoculado en melaza de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) suplementada

Débora Francielly de Oliveira

Laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Claudia Eugênia Castro Bravo

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Ivane Benedetti Tonial

Laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

RESUMO

A inoculação de silagem com bactérias lácticas representa um avanço tecnológico eficiente porque garante uma elevada concentração inicial de tais bactérias que, em condições favoráveis, multiplicam-se, garantindo produção intensiva de ácido láctico e fermentação de forma rápida e eficiente. Considerando que vários subprodutos e matérias primas têm sido utilizados como meio de cultura viável para o crescimento de microrganismos de interesse biotecnológico, o estudo objetivou verificar a melhor composição de um meio de cultura constituído de caldo de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), extrato de levedura e sulfato de amônia, tomados no estudo como variáveis independentes e avaliados em três níveis equidistantes de variação por meio de desenho experimental de combinação central 2^3 por metodologia de superfície de resposta (MSR), tendo sido avaliadas como funções resposta a produção de ácido láctico e células viáveis de *Lactobacillus plantarum*, essas, variáveis dependentes. O meio de cultura constituído de caldo de cana-de-açúcar a 5 $^{\circ}$ Brix suplementado com 1,1% de extrato de levedura e 1,1% de sulfato de amônia, foi a melhor condição para a produção de ácido láctico (1,53%) e de células viáveis (8,63 log UFC mL⁻¹) de *L. plantarum*.

Palavras-chave: *Lactobacillus plantarum*; *Saccharum* spp.; Ácido Láctico.

INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) têm sido estudadas na aplicação em silagens usadas para a alimentação animal. No entanto, para o crescimento numeroso de BAL é necessário o fornecimento de nutrientes específicos e em quantidades ideais¹. As BAL que estão regularmente associadas à fermentação de silagem são as espécies dos gêneros *Lactobacillus*,

Pediococcus, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*².

A aplicação de inoculantes biológicos em silagens implica na adição de BAL em quantidade suficiente para dominar o processo fermentativo e produzir rapidamente ácido láctico, favorecendo a diminuição do pH que, junto com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e as bacteriocinas produzidas no processo de fermentação, auxiliam na preservação e melhoram as propriedades nutritivas da silagem³.

O meio de cultura formulado por De Man et al⁴ está entre os meios comumente mais usados para o crescimento de *Lactobacillus*. No entanto, este meio de cultura inclui componentes muito caros para aplicações industriais⁵. Sabe-se que por ser o meio de cultura Man, Rajosa e Sharpe (MRS) constituído com 0,4% de extrato de levedura, a utilização de um meio de cultivo

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Débora Francielly de Oliveira

Laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Rua Porto Alegre, 909, apto. 12. Bairro: Alvorada

CEP: 85480-000 Francisco Beltrão-Paraná-Brasil

Tel.: (46) 3525-3445

E-mail: deborafolhe@hotmail.com

com quantidades elevadas de extrato de levedura torna-se inviável, em função do alto custo desse constituinte. Este estudo propôs a redução do percentual de 0,4% para 0,1% de extrato de levedura na formulação do meio de cultura, sugerindo uma melhor relação custo-benefício.

Estudos pertinentes, relatados na literatura, foram realizados para encontrarem-se meios de cultivo mais baratos para favorecer o crescimento de *Lactobacillus* em escala industrial. Esses meios incluíram carboidratos e fontes de nitrogênio, tais como soro de leite⁶, melão de cana⁷, hidrolisados de farelo de trigo combinado com milhocina⁸ e vinhaça de trigo e melão de açúcar de beterraba⁵. A maioria desses estudos destinou-se somente a otimizar o meio de cultura para a produção de ácido láctico, com exceção dos realizados por Krzywonos e Eberhard⁵, que estudaram meio de cultura alternativo visando baixar o custo para a produção de biomassa de *L. plantarum* e ácido láctico.

Poucos trabalhos podem ser encontrados na literatura sobre um processo viável e eficiente para a produção de ácido láctico e, também, de viabilidade celular da cultura estudada. Entre os existentes, nota-se o que trata da produção de biomassa de *Lactobacillus casei*⁹.

A MSR é uma das técnicas mais eficientes para a otimização de processos. Ela tem como objetivo principal determinar as condições para operação ótima de um sistema, ou determinar a região do espaço dos fatores que satisfazem as condições de operação. Essa metodologia é utilizada com êxito na indústria química e, nos últimos anos, tem tido aplicação na microbiologia, para a formulação de meios de cultivo, inclusive na produção de enzimas por processos fermentativos, usando extrato de levedura e glicose, entre outros componentes¹⁰.

Este trabalho propôs-se a avaliar os efeitos da adição de extrato de levedura e sulfato de amônia sobre a fermentação láctica por *Lactobacillus plantarum* em caldo de cana-de-açúcar (5, 10 e 15 °Brix), bem como a otimização da produção de ácido láctico e células viáveis por meio da MSR.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAGEM E LOCAL DE CONDUÇÃO DO ESTUDO

O experimento foi conduzido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco

Beltrão. A bactéria ácido láctica utilizada foi *Lactobacillus plantarum* (ATCC 4005), mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultura MRS⁴, específicos para cultivo de bactérias lácticas, no qual o microrganismo foi ativado através de repiques sucessivos realizados a cada 48 h.

PREPARO DO MEIO E CULTIVO DE *L. PLANTARUM*

O caldo de cana-de-açúcar foi diluído em água destilada para obtenção das concentrações de °Brix (quantidade de compostos solúveis, ou seja, açúcares na solução) correspondentes aos níveis desta variável (A) no delineamento estatístico indicado na tabela 1. O caldo de cana-de-açúcar foi suplementado com extrato de levedura (B) e sulfato de amônia (C) e o pH ajustado para 6,2. O processo fermentativo foi desenvolvido utilizando frascos *erlenmeyers* de 250 mL contendo 50 mL do respectivo meio de cultivo. Os inóculos de 1% (v/v) foram transferidos para o caldo de cana-de-açúcar (estéril) suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônia, posteriormente incubados à temperatura de 37° C por 72 h. Após o processo fermentativo, a viabilidade celular foi determinada por meio da técnica de contagem em placas, utilizando ágar MRS, tendo o caldo sido centrifugado durante 10 min com força centrífuga de 2.000 x g, e submetido à determinação de ácido láctico de acordo com Taylor¹¹.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram investigadas três variáveis independentes: caldo de cana-de-açúcar (°Brix), extrato de levedura e sulfato de amônia, representadas por A, B e C, respectivamente, por meio da MSR, um método de planejamento de experimentos para otimização de processos. Estas variáveis foram avaliadas em três níveis equidistantes de variação, por meio do desenho experimental de combinação central 2³, obtendo 16 diferentes tratamentos, conforme demonstrado na tabela 1. A resposta avaliada foi a produção de ácido láctico e células viáveis de *L. plantarum* (variáveis dependentes).

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

A quantificação do ácido láctico foi obtida por método espectrofotométrico na região do espectro visível, tendo o comprimento de onda sido fixado a 570 nm¹¹. A formação dos grupos cromógenos absorventes de luz se deu por meio de reação prévia, a quente, entre ácido sulfúrico PA e o ácido láctico produzido durante a fermentação.

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis de variação para produção de ácido láctico e células viáveis de *L. plantarum*

Variáveis independentes	Unidade	Código	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Caldo de cana-de-açúcar	°Brix	A	5	10	15
Extrato de levedura	g/100 mL	B	0,1	0,6	1,0
Sulfato de amônia	g/100 mL	C	0,1	0,6	1,1

DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS

Para a determinação de células viáveis de *L. plantarum* utilizou-se a técnica de semeadura por profundidade em placas de petri contendo ágar MRS, as quais foram previamente incubadas em estufa durante 48 h a uma temperatura de 37° C, para depois serem submetidas à contagem de unidades

formadoras de colônias por mL de caldo fermentado (UFC mL⁻¹).

RESULTADOS

Na tabela 2 são demonstrados os níveis de variação utilizados no meio de cultura, produção de ácido láctico e células viáveis de *L. plantarum* nas diferentes condições.

Tabela 2 – Níveis de variação, produção de ácido láctico e células viáveis de *L. plantarum*

Tratamentos	A (°Brix)	B (g/100 g)	C (g/100 g)	Ácido láctico (%)	UFC mL ⁻¹	Log
1	5	0,1	0,1	1,08	1,75 x 10 ⁸	8,24
2	5	0,1	1,1	0,76	1,40 x 10 ⁸	8,14
3	5	1,1	0,1	1,03	2,90 x 10 ⁸	8,46
4	5	1,1	1,1	1,53	4,22 x 10 ⁸	8,63
5	15	0,1	0,1	1,12	2,80 x 10 ⁸	8,45
6	15	0,1	1,1	1,31	2,05 x 10 ⁸	8,31
7	15	1,1	0,1	1,44	3,50 x 10 ⁸	8,54
8	15	1,1	1,1	1,51	4,25 x 10 ⁸	8,62
9	5	0,6	0,6	1,15	1,50 x 10 ⁸	8,18
10	15	0,6	0,6	1,42	4,05 x 10 ⁸	8,60
11	10	0,1	0,6	1,26	1,44 x 10 ⁸	8,16
12	10	1,1	0,6	1,37	1,50 x 10 ⁸	8,18
13	10	0,6	0,1	1,19	2,65 x 10 ⁸	8,42
14	10	0,6	1,1	1,33	3,10 x 10 ⁸	8,49
15	10	0,6	0,6	1,37	3,01 x 10 ⁸	8,48
16	10	0,6	0,6	1,37	3,04 x 10 ⁸	8,48

A: Quantidade de compostos solúveis, ou seja, açúcares na solução; B: Quantidade (g/100 g) adicionada de extrato de levedura; C: Quantidade (g/100 g) adicionada de sulfato de amônia.

DISCUSSÃO

A composição do meio, bem como as condições de cultivo, são essenciais para um bom crescimento da cultura iniciadora. Os resultados obtidos mostram a melhor composição de meio de cultivo tendo como base caldo de cana-de-açúcar suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônia.

Conforme pode ser observado na tabela 1, o melhor resultado experimental para contagem de células viáveis e produção de ácido láctico foi obtido no tratamento 4, constituído de caldo de cana-de-açúcar 5 °Brix suplementado com 1,1% de extrato de levedura e 1,1% de sulfato de amônia. A condição que pareceu menos adequada para o crescimento bacteriano e produção de ácido láctico foi obtida no tratamento 2, constituído de caldo de cana-de-açúcar 5 °Brix suplementado com 0,1% de extrato de levedura e 1,1% de sulfato de amônia. Utilizando a MSR foi possível intrapolar entre os valores mínimos e máximos das variáveis estudadas (°Brix, extrato de levedura e sulfato de amônia), predizendo

que o meio de cultivo com cana-de-açúcar a 12 °Brix suplementado com 1,1% de extrato de levedura e 0,6% de sulfato de amônia também ocasionaria condição favorável para a produção de ácido láctico (1,50%).

Ao estudarem a influência da adição de aditivos (sulfato de amônia e ureia) em silagens de cana-de-açúcar, Bravo-Martins et al¹² verificaram que a população de BAL nas silagens sem aditivos foi de aproximadamente 8.62 log UFC g⁻¹ de silagem, enquanto que nas silagens contendo 1% de sulfato de amônia e 1% de ureia a contagem foi 6,40 e 6,54 log UFC g⁻¹ de silagem, respectivamente. Oliveira et al¹³ verificaram que o meio de cultivo à base de melaço de cana-de-açúcar, suplementado com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona, atingiu bons resultados para a produção de ácido e viabilidade celular de *Lactobacillus casei*. Krzywonos e Eberhard⁵ constataram que a combinação de vinhaça de trigo, melaço de beterraba e extrato de levedura obteve bons resultados para o cultivo de bactérias produtoras de ácido láctico, tendo demonstrado que o meio de cultura avaliado

poderia ser utilizado para a produção de BAL em escala industrial.

A população de bactérias ácido-láticas mostrou-se superior a $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de silagem em todos os experimentos deste estudo, o que corrobora com os estudos de Muck¹⁴ e Pereira et al¹⁵, os quais relataram que concentrações inferiores a esse valor podem acarretar perdas significativas durante o processo fermentativo de silagens.

CONCLUSÃO

A cepa *L. plantarum* ATCC 4005 demonstrou potencial de aplicação em silagens como cultura iniciadora. Com base nos resultados preliminares,

sugere-se que o uso de meio de fermentação constituído de caldo de cana-de-açúcar suplementado, nas condições experimentais, com extrato de levedura e sulfato de amônia, forneça nutrientes necessários para o desenvolvimento de *L. plantarum*, podendo ser utilizado para a obtenção de produtos de valor agregado como a biomassa de BAL e ácido láctico em substituição aos meios tradicionais. No entanto, é necessária a continuidade do estudo.

APOIO FINANCEIRO

A pesquisa foi fomentada pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico por meio de concessão de bolsa.



Lactic acid production and cell viability of *Lactobacillus plantarum* inoculated into sugarcane juice (*Saccharum* spp.) supplemented

ABSTRACT

Silage inoculation with lactic bacteria is an efficient technological advance used for ensuring high initial concentration of those bacteria that are multiplied in good conditions, allowing intensive lactic acid production and a prompt and efficient fermentation. Whereas many subproducts and raw materials have been used as a viable culture medium for microorganism growth of biotechnological interest, this study aimed to verify the best composition of a culture medium, and had sugarcane juice in different soluble solids concentrations ($^{\circ}\text{Brix}$), yeast extract and ammonium sulfate as independent variables which were evaluated in three equidistant levels of variation through experimental design of 2^3 central combination by response surface methodology (RSM); the dependent variables were lactic acid production and *Lactobacillus plantarum* viable cells, both denoted as response function. The best condition for lactic acid production (1.53%) and *L. plantarum* viable cells ($8.63 \log \text{ CFU mL}^{-1}$) was the culture medium containing sugarcane juice at 5°Brix , supplemented with 1.1% yeast extract, and 1.1% ammonium sulfate.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; *Saccharum* spp.; Lactic Acid.

Producción de ácido láctico y viabilidad celular de *Lactobacillus plantarum* inoculado en melaza de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) suplementada

RESUMEN

El inoculado del ensilaje con bacterias lácticas representa un avance tecnológico eficiente por que garantiza una elevada concentración inicial de tales bacterias que, en condiciones favorables, se multiplican, garantizando la producción intensiva de ácido láctico y la fermentación de forma rápida y eficiente. Considerando que varios subproductos y materias primas han sido utilizadas como medio de cultivo viable para el crecimiento de microorganismos de interés biotecnológico, el estudio tuvo como objetivo comprobar la mejor composición de un medio de cultivo constituido de melaza de caña de azúcar en diferentes concentraciones de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$), extracto de levadura y sulfato de amonio, tomados en el estudio como variables independientes y evaluados en tres niveles equidistantes de variación, a través de diseño experimental de combinación central 2^3 por metodología de superficie de respuesta (RSM), habiendo sido evaluadas como funciones respuesta a la producción de ácido láctico y células viables de *Lactobacillus plantarum*, estas, variables dependientes. El medio de cultivo constituido por melaza de caña de azúcar a 5°Brix suplementado con 1,1% de extracto de levadura y 1,1% de sulfato de amonio fue la mejor condición para la producción de ácido láctico (1,53%) y de células viables ($8,63 \log$ de UFC mL^{-1}) de *L. plantarum*.

Palabras clave: *Lactobacillus plantarum*; *Saccharum* spp.; Ácido Láctico.



REFERÊNCIAS

- 1 Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant uc-3 in batch fermentation. Appl Environ Microbiol. 2008 Jan;74(1):333-5.
- 2 Coan RM, Reis RA, Rojas Garcia G, Schocken-Iturrino RP, Ferreira DS, Resende FD, et al. Dinâmica fermentativa e microbiológica de silagens dos capins tanzânia e marandu acrescidas de polpa cítrica peletizada. Rev Bras Zootec. [Internet]. 2007 set-out [citado 2013 jan 12];36(5):1502-11. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982007000700007.
- 3 Gollop N, Zakin V, Weinberg ZG. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. J Appl Microbiol. 2005 Mar;98(3):662-6.
- 4 De Man JD, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J Appl Bacteriol. 1960 Apr;23(7):130-5.
- 5 Krzywonos M, Eberhard T. High density process to cultivate *Lactobacillus plantarum* biomass using wheat stillage and sugar beet molasses. Electron J Biotechnol. 2011 Mar;14(2):99-105.
- 6 Mondragón-Parada ME, Nájera-Martínez M, Juárez-Ramírez C, Galíndez-Mayer J, Ruiz-Ordaz N, Cristiani-Urbina E. Lactic acid bacteria production from whey. Appl Biochem Biotechnol. [Internet]. 2006 [cited 2013 Jan 12];134(3):223-32. Available from: <http://www.mendeley.com/research/lactic-acid-bacteria-production-whey/>.
- 7 Tondee T, Sirianuntapiboon S. Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861. Bioresour Technol. 2008 Sep;99(14):6258-65.
- 8 Zheng L, Lu H, Yizhi J, Xiaonan W, Tianwei T. Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. Bioch Eng J. 2010 Mar;49(1):138-42.
- 9 Aguirre-Ezkauriatza EJ, Aguilar-Yáñez JM, Ramírez-Medrano A, Alvarez MM. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. Bioresour Technol. 2010 Apr;101(8):2837-44.
- 10 Udeh KO, Achremowicz B. Optimization of cultivation medium composition of an L-lysine producing mutant: the use of response surface methodology. Acta Microbiol Polonic. 1993;42(2):171-80.
- 11 Taylor KACC. A simple colorimetric assay for muramic and lactic acid. Appl Biochem Biotechnol. 1996 Jan;56(1):49-58.
- 12 Bravo-Martins CEC, Carneiro H, Castro-Gómez RJH, Figueiredo HCP, Schwan RF. Chemical and microbiological evaluation of ensiled sugar cane with different additives. Braz J Microbiol. 2006 Oct-Dec;37(4):499-504.
- 13 Oliveira RF, Soudaleff M, Lima MVS, Lima HOS. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*: VII BMCFB. Braz J Food Technol. [Internet]. 2009 jun [citado 2013 jan 8];12:34-40. Disponível em: http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0081.pdf.
- 14 Muck RE. Factors influencing silage quality and they implications for management. J Dairy Sci. 1988 Nov;71(11):2992-3002.
- 15 Pereira OG, Rocha KD, Ferreira CLLF. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens. Rev Bras Zootec. 2007 nov-dez;36(6):1742-50.

Recebido em / Received / Recibido en: 22/4/2013
 Aceito em / Accepted / Aceito en: 1/10/2013