



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

**(21) PI 1016238-0 A2**



\* B R P I 1 0 1 6 2 3 8 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 13/08/2010  
(43) Data da Publicação: 22/04/2014  
(RPI 2259)

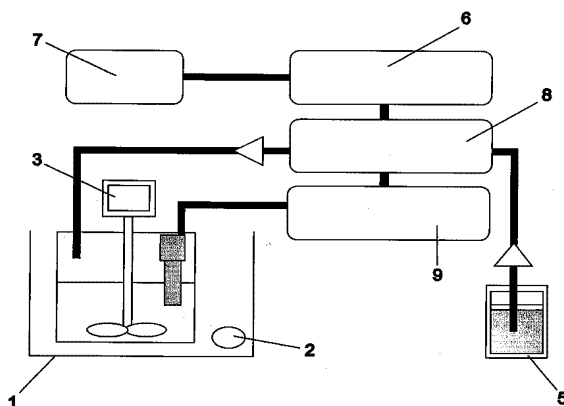
**(51) Int.Cl.:**  
C12P 7/56

**(54) Título:** CALDO FERMENTATIVO DO ÁCIDO LÁTICO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

**(73) Titular(es):** Ecoplástico Ltda

**(72) Inventor(es):** Tunehiro Uono

**(57) Resumo:** CALDO FERMENTATIVO DO ÁCIDO LÁTICO E MÉTODO DE PRODUÇÃO ÁCIDO LÁTICO , a presente invenção refere-se a um caldo fermentativo do ácido lático consistindo de melaço ou açúcar granulado e método de produção de ácido lático de alta pureza ótica através de fermentação láctica estável sob altas temperaturas em ambiente aeróbico e isento de esterilização.



## **“CALDO FERMENTATIVO DO ÁCIDO LÁCTICO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO”.**

### **Descrição Breve:**

Refere-se a Presente Invenção a um caldo fermentativo do ácido láctico  
5 consistindo de melaço ou açúcar granulado e processo de produção de ácido láctico de alta pureza ótica através de fermentação láctica estável sob altas temperaturas em ambiente aeróbico e isento de esterilização.

### **Campo de Aplicação:**

Produção de polilactato, produção de ácido láctico, produção de éster  
10 láctico.

### **Convencimento:**

O ácido láctico é um ácido orgânico de largo uso industrial, principalmente na área de alimentos, sendo útil como conservantes aditivos alimentares ou condimentos. Industrialmente, o ácido láctico polimerizado  
15 quimicamente pode ser utilizado como fibras e plásticos além de ser utilizado em medicamentos. Nos últimos anos, os derivados do ácido láctico, como os ésteres tal como o lactato de butila vem sendo utilizado como solvente altamente seguro e o seu uso tem se expandido. Dentre os produtos relativos ao ácido láctico, os polímeros lácticos (PLA) são polímeros derivados dos recursos vegetais e não de  
20 fósseis, simultaneamente possuem características biodegradáveis, além de propriedades mecânicas e de modelagem excelentes, o que o faz ser uma das alternativas promissoras para o futuro da substituição dos polímeros derivados de petróleo.

É amplamente sabido que o ácido láctico pode ser produzido através  
25 de síntese química ou através de fermentação láctica (onde é possível obter um

ácido óticamente ativo), que representa mais de 50 % da produção mundial de ácido láctico.

Na síntese química é feita a cianetação do acetaldeído para sintetizar o lactato de nitrila, que é hidrolisado para a obtenção do ácido láctico, produzindo  
5 geralmente, o ácido láctico racêmico, ou seja, é baseada na reação de acetoaldeído com ácido hidrocianico. No método da fermentação, primeiramente é feita a hidrólise enzimática, com enzimas tais como a amilase, do amido que é um polissacarídeo contido no milho, batatas, etc. e transformados em glicose que é um monossacarídeo. A seguir, é feito o crescimento das bactérias lácticas sob fontes  
10 adequadas de nutrientes, e através dessas bactérias lácticas a glicose é transformada em ácido láctico. É possível também obter o ácido láctico a partir da fermentação direta da sacarose contida na cana de açúcar ou da beterraba.

Na fermentação láctica existe um pH adequado (de cerca de 5-8) do caldo fermentativo que precisa ser mantido estável com adição de agentes  
15 neutralizantes no decorrer da fermentação para que não ocorra a estagnação da atividade ou mesmo a extinção das bactérias. Em geral são utilizados agentes alcalinos tais como a amônia, o carbonato de cálcio, o hidróxido de sódio como neutralizantes, e o ácido láctico passa a existir como um sal de lactato, tais como lactato de amônio ou lactato de cálcio no caldo da fermentação.

20 Na fermentação láctica por batelada é possível promover a fermentação até cerca de 5-20wt% da concentração de sal de ácido láctico em solução. Após o término da fermentação, o ácido láctico precisa ser isolado e purificado. Por exemplo, adiciona-se ácido sulfúrico liberando o ácido láctico do sal de lactato, cujo sal se precipita na forma de sulfato, separado posteriormente por  
25 filtração. Realiza-se então a eletrodialise, separação por membranas e por último a

purificação através de destilação. Outro método é a promoção da esterificação do ácido láctico com álcoois de baixa massa molar, com posterior destilação do éster produzido. O éster obtido é hidrolisado, separando o álcool do ácido láctico que é purificado através de destilação. Para a fermentação láctica são utilizadas bactérias das espécies tais como lactobacillus, lactococcus, streptococcus, e, fungos tais como o Rhizopus oryzae.

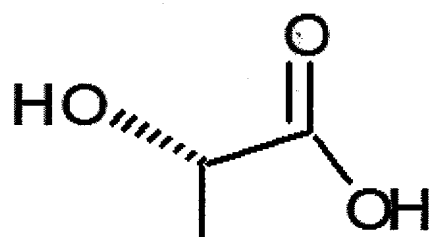
Rhizopus oryzae tem baixa auxotrofia, a velocidade de produção do ácido láctico também é baixa sendo que para obter um bom caldo fermentado leva em torno de duas semanas. Além disso, o consumo de açúcar é de cerca de 70%, sendo assim a eficiência da fermentação não pode ser considerada boa. Em contrapartida a velocidade de fermentação das bactérias de 24h-72h é rápida, e o consumo de açúcar atingem valores entre 90-99%.

Assim, apesar do conhecimento geral de que o ácido láctico pode ser produzido pela fermentação, o polímero do ácido láctico não é tão divulgado no mercado. Isso se deve ao alto custo de produção do ácido láctico, e também ao custo do seu polímero que é extremamente alto comparado aos polímeros derivados de petróleo. Ou seja, apesar do extrato de levedura, soro (de leite), Corn Steep Liquor (CSL) que incluem proteínas e vitaminas B serem conhecidos como nutrientes necessários para o crescimento das bactérias lácticas, estes representam um custo material extremamente caro. Se a fermentação do ácido láctico é realizada em ambiente aeróbico o rendimento do ácido láctico diminui devido à produção simultânea de outros ácidos tais como o acético e butírico.

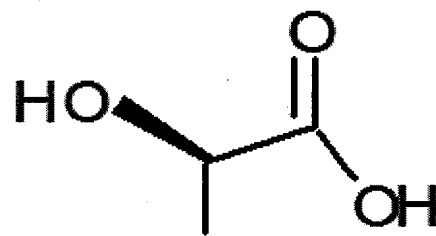
Para evitar esse fato, é necessário promover a fermentação sob ambiente anaeróbico, trocando todo o ar do tanque de fermentação por um gás inerte como o nitrogênio. No entanto, em ambiente anaeróbico a velocidade de

produção das bactérias lácticas diminui, além disso, em termos de custo e instalações é inadequado para produções em larga escala. Na fermentação do ácido láctico é necessário promover a esterilização por vapor de alta pressão do meio de cultura, do tanque de fermentação, dos encanamentos das rotas de fermentação, o que representa um custo alto em termos energéticos e de instalação. A purificação láctica necessita de promover a eletrodíálise, separação através de membranas e esterificação, o que representa uma purificação de alto custo.

O ácido láctico apresenta enantiomerismo apresentado moléculas opticamente diferentes com o mesmo peso molecular, o L(+)-ácido láctico e o D(-)-ácido láctico assim como mostram as estruturas abaixo. Se o objetivo é a produção do polilactato, e a pureza óptica do ácido láctico é menor que 94%, o polilactato produzido não cristaliza, além de suas propriedades mecânicas e sua resistência térmica serem extremamente baixas, sendo que o valor em termos de utilidade é reduzido. Dessa forma, conclui-se que é necessário promover uma fermentação láctica que produza ácido láctico de alta pureza óptica visando à produção do polilactato.



L-Lactic Acid



D-Lactic Acid

Estado da Arte:

É conhecido do estado da técnica a fermentação láctica com aplicação de extrato de levedura no meio de cultivo. Como exemplo, na tese de Young-Jung Wee, Jim-Nam Kim, Hwa-Won Ryu, Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (2004) pp. 568-573, foram feitos estudos detalhados da relação entre a quantidade de ácido láctico fermentado com os nutrientes quando da utilização das cepas de bactérias lácticas *Enterococcus faecalis* RKY1 em meio de melaço esterilizado mudando a quantidade de extrato de levedura. Os resultados da relação entre o extrato de levedura e produtividade estão expressos na Tabela 1.

10 **Tabela 1:** Influência da quantidade de extrato de levedura na fermentação láctica por *Enterococcus faecalis* RKY1

Yeast extract (g/L)	Lactic acid (g/L)	L(+)-Lactic acid content (%)	Lactic acid yield (%)	Maximum DCW (g/L)	Productivity (g/Lh)
5	83.1	98.7	93.7	6.6	0.9
10	96.5	98.4	95.5	11.6	1.8
15	95.7	98.7	94.9	14.4	4.0
20	95.1	98.6	94.2	16.1	5.3

**L(+)-Lactic acid content(%)=[L(+)-lactic acid(g)/total lactic acid(g)]x100.**

**Lactic acid yield(%)=[lactic acid produced(g)/total sugar consumed(g)]x100.**

15 **DCW, dry weight cell**

A saber, ocorre aumento da velocidade de fermentação proporcional ao aumento da quantidade de extrato de levedura, assim o extrato de levedura mostra claramente o seu efeito nutriente no crescimento das bactérias lácticas. Entretanto, são necessários 20g de extrato de levedura por litro para se produzir 100g de ácido láctico. Com relação ao soro de leite, a tese de *Hurok Oh, Young - Jung Wee, Jong-sun Yun, Seung Ho Han, Sangwon Jung, Hwa-Won Ryu, lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials, 96 (2005) pp.1492-1498*, realiza fermentação láctica através de meio de cultura de grãos integrais de trigo. De acordo com a tese, é sabido que é necessário adicionar de 0 a 25g de Corn Steep Liquor (CSL) e um tempo entre 24 a 78h para o tempo de fermentação a fim de se produzir 100g de ácido láctico. A velocidade de fermentação fica na faixa de 1.21 a 4.14g.

**Tabela 2: Influência da quantidade de Corn Steep Liquor na fermentação láctica por *Enterococcus faecalis* RKY1**

CSL (g/L)	Fermentation time (h)	Substrate conversion <sup>1</sup> (%)	Lactic acid (g/L)	Lactic acid yield <sup>2</sup> (g/g)	Lactic acid productivity (g/Lh)	Maximal dry cell weight (g/L)
0	78	96.7±0.5	94.4±0.8	0.94±0.01	1.21±0.01	7.15±0.05
5	39	96.8±2.1	96.8±2.1	0.92±0.02	2.48±0.06	7.75±0.12
10	30	103.1±1.1	103.1±1.1	0.94±0.01	3.43±0.03	12.42±0.09
15	27	102.7±1.6	102.7±1.6	0.93±0.01	3.80±0.06	11.07±0.15
25	24	99.4±1.0	99.4±1.0	0.92±0.01	4.14±0.06	12.8±0.11

Batch fermentations were performed on a 2.5L jar fermenter with 1L working volume at pH 7.0, 38°C, 200rpm, and the medium containing 200g/L of wheat hydrolyzate and 0-25g/L of CSL was sterilized by filtration. Data

5 are presented as the means of two replicates and  $\pm$  denotes standard deviation among the replicates.

<sup>1</sup>g-Glucose consumed/g-initial glucose x 100.

<sup>2</sup>g-Lactic acid produced/g-glucose consumed.

1 Também é conhecido do estado da técnica que a fermentação láctica  
10 em meio aeróbico produz simultaneamente outros ácidos orgânicos tais como ácido acético e ácido butírico, diminuindo o rendimento da produção de ácido láctico. A tese de *Hitomi Ohara and Masahito Yahata, L-Lactic Acid Production by Bacillus sp. In Anaerobic and Aerobic Culture, Journal of Fermentation and Bioengineering, 81-3(1996), pp. 272-274*, apresenta explicação detalhada do sobre os ambientes  
15 anaeróbico e aeróbico na fermentação láctica. A Tabela 3 abaixo mostra os resultados dos experimentos de fermentações anaeróbica e aeróbica do ácido láctico. Podemos verificar através desta que a taxa de conversão de glicose para ácido láctico é alta na fermentação láctica anaeróbica. Por exemplo, no caso do *Bacillus sp. SHO-1* 97.6% de glicose foi convertido a ácido láctico. Utilizando as mesmas cepas em  
20 ambiente aeróbico percebemos que a conversão diminui para 71.5%. Explica-se o fato pela ocorrência simultânea na fermentação láctica de ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido butírico, e afins. Ou seja, os dados mostram que a mudança de ambiente de fermentação, de anaeróbico para aeróbico, acarreta na fácil transição da fermentação chamada homoláctica para uma fermentação  
25 heteroláctica. E mesmo com uma cepa de microorganismo tal como o *Bacillus sp. SHO-1* que apresenta a mais alta taxa de conversão em ambiente aeróbico, a mesma é de apenas 71.5%. A baixa taxa de conversão acarreta no desperdício de açúcar como matéria-prima, o que aumenta o custo do polilactato e, portanto se

torna inviável economicamente. Dessa forma, seria necessário que a fermentação fosse do tipo anaeróbica, com troca de todo o ar do tanque de fermentação para um gás inerte tal como o nitrogênio, o que é uma grande desvantagem devido ao seu alto custo e mesmo em termos de instalação.

5 **Tabela 3: Resultados da fermentação pelas respectivas bactérias lácticas em ambientes tanto anaeróbico como aeróbico**

Culture	Strain	Lactic acid (g/L)	Consumed glucose(g/L)	Conversion rate (%)*	Optical purity (%)
<b>Anaerobic</b>	<i>Bacillus sp. SHO-1</i>	16.0	16.4	97.6	99.0
	<i>B. cereus</i>	13.5	13.3	98.5	98.8
	<i>B. coagulans</i>	0.0	0.0	-	-
	<i>B. subtilis</i>	0.1	0.4	25.0	86.1
	<i>B. thuringiensis</i>	10.2	12.0	85.0	96.8
<b>Aerobic</b>	<i>Bacillus sp. SHO-1</i>	14.3	20.0	71.5	98.5
	<i>B. cereus</i>	11.9	18.2	65.4	98.2
	<i>B. coagulans</i>	0.7	2.2	31.8	67.9
	<i>B. subtilis</i>	3.7	2.2	49.3	94.4
	<i>B. thuringiensis</i>	11.9	19.1	62.3	97.6

\*Conversion rate(%): Conversion rate of glucose to lactic acid

É conhecido do estado da técnica que em anos recentes descobriu-se que o *Bacillus coagulans* realiza fermentação láctica em temperaturas mais altas em torno de 50°C sem que haja necessidade de esterilização do meio de cultura. Ou seja, em temperaturas mais altas de cerca de 50°C, não há crescimento fermentativo de outros microorganismos, o que leva à produção preferencial das bactérias lácticas e ácido láctico. *Kenji Sakai and Yutaka Ezaki, Open L-Lactic Acid Fermentation of Food Refuse Using Thermophilic Bacillus coagulans and Fluorescence In situ Hybridization Analysis of Microflora Journal of Bioscience and Bioengineering, 101-6(2006), pp. 457-463.* Da Tabela 3, a fermentação láctica sem esterilização do lixo orgânico é realizado pelo *Bacillus coagulans*. A tabela mostra também que com o *L. plantarum* a temperaturas maiores que 45°C quase não ocorre o crescimento das cepas, porém com o *Bacillus coagulans* é possível realizar as fermentações com crescimento das cepas a temperaturas próximas de 70°C. Entretanto, pelo resultado vemos que pela velocidade de fermentação de 1.36 g /Lh a sua produtividade é baixa. Além disso, existe a produção simultânea de 12% de ácido acético em relação ao ácido láctico, donde pode se dizer que os resultados não são viáveis para uma fermentação láctica. Na patente japonesa publicada de nº 2006-333847, é apresentada a fermentação láctica termofílica sem esterilização com *Bacillus licheniformis* TY7 em meio de MRS, sendo a sua produtividade de 2.5g/Lh. E em termos de pureza óptica, que é de 97%, não se pode dizer que é suficiente ao considerarmos o fato de que existe grande possibilidade da diminuição da pureza óptica no momento do aquecimento na purificação do ácido láctico.

É objeto da presente invenção o aumento da taxa de conversão e pureza óptica na fermentação láctica, através de equipamentos simples de fermentação e nutrientes baratos.

De acordo com a presente invenção a melhoria do processo de fermentação láctica ocorre através da substituição do extrato de levedura por nutrientes mais baratos tais como okara (bagaço de soja); o aumento do grau de conversão de açúcar para o ácido láctico minimizando os subprodutos tais como os ácidos acético, butírico mesmo em fermentação aeróbica com instalações mais simples e conseguir uma fermentação estável sem a preocupação de esterilização do meio e dos equipamentos utilizados no processo através da fermentação láctica sob altas temperaturas com *Bacillus coagulans* ATCC7050.

#### **Objetivo da Invenção:**

O objetivo da presente invenção é substituir o extrato de levedura, matéria prima cara, utilizando nutrientes mais baratos; conseguir alto grau de conversão do açúcar para o ácido láctico minimizando os subprodutos tais como os ácidos acético, butírico mesmo em fermentação aeróbica com instalações mais simples; conseguir uma fermentação estável sem a preocupação de esterilização do meio fermentativo e dos equipamentos e obter um processo de fermentação láctica estável de produção de ácido láctico de alta pureza óptica.

#### **Vantagens da Invenção:**

- Utilizar o okara(bagaço de soja) como substituinte do extrato de levedura, o que resulta na grande redução do custo de produção do ácido láctico.
- Realizar a fermentação láctica sob temperaturas altas com o *Bacillus coagulans* ATCC7050, espécie de bactéria láctica termofílica, possibilitou a fermentação láctica em ambiente aeróbico e isento de esterilização.
- Caldo de fermentação como o melaço e açúcar granulado possibilitam a fermentação direta dos mesmos sem que necessite de sacarificação prévia do amido como no caso do milho ou batata-doce.

- Custo de produção do polilactato, que faz necessário grandes quantidades de ácido láctico, também diminui significativamente.

#### **DOS DESENHOS:**

A seguir, explica-se a inovação com referencia aos desenhos anexos,  
5 nos quais estão representadas de forma ilustrativa e não limitativa:

**Figura 1:** Mostra equipamento de fermentação láctica que consiste de um tanque de fermentação em banho-maria (01) aquecido por aquecedor (02), acoplado com sistema de agitação com o agitador (03). O equipamento possui uma conexão USB (06) a computador (07) para a manutenção do pH através de  
10 gotejamento sucessivo de solução a 28% de amônia (05) com bomba dosadora micro digital (08) e controlador de pH (09) compreendendo um eletrodo controle de pH (04);

**Figura 2:** Mostra o gráfico do meio de açúcar granulado, cromatograma HPLC do caldo fermentado cujo ácido aconítico é derivado do próprio  
15 melão;

**Figura 3:** Mostra o gráfico do meio de açúcar granulado, cromatograma HPLC do caldo fermentado;

**Figura 4:** Mostra o gráfico da relação entre a temperatura e quantidade de ácido láctico produzido;

20 **Figura 5:** Mostra o gráfico da relação entre o pH e quantidade de ácido láctico produzido;

**Figura 6:** Mostra o gráfico da relação entre minerais e quantidade de ácido láctico produzido.

#### **Da Invenção:**

25 A presente invenção está baseada em:

(A) Fermentação láctica é realizada em meios de cultura de meloço ou açúcar granulado. O meio de meloço pode ser utilizado em grande quantidade por ser uma fonte barata de açúcar. O açúcar granulado não é uma fonte barata tanto quanto o meloço, porém apresenta a vantagem do processo de purificação do ácido láctico posterior  fermentação, ser mais simples.

(B) Fermentação láctica é realizada utilizando cepas de *Bacillus coagulans* ATCC7050, com temperatura de fermentação de 53°C, o pH mantido na faixa de 6 a 6.5, e 3 a 4g de minerais. O conteúdo e a quantidade de minerais encontram-se na Tabela 4. A quantidade de minerais da tabela é cerca de 1g, e 3 a 4 vezes deste é adicionado no meio fermentativo. Com a utilização de *Bacillus coagulans* como bactéria láctica, a fermentação láctica objeto da presente invenção não necessita de esterilização tanto do meio fermentativo quanto dos equipamentos afins, possibilitando, dessa forma, a omissão da operação de esterilização do processo. Além disso, pelo fato do *Bacillus coagulans* ATCC7050 ser aeróbica, não há necessidade de mudar o ambiente para anaeróbico.

**Tabela 4: Composição de minerais nos meios de cultura de açúcar e meloço (por grama)**

Reagente	Citrato de amônio	Fosfato de potássio	Acetato de sódio	Sulfato de magnésio heptahidratado	Sulfato manganoso pentahidratado
Quantidade (g)	0.29	0.29	0.29	0.11	0.029

**Tabela 5: Resultado da análise de ácidos orgânicos do caldo de fermentação láctica em meio de meloço**

Organic	phosphoic	citric	Tartaric	Malic	Aconitic	Succinic	Lactic	Formic	Acetic
---------	-----------	--------	----------	-------	----------	----------	--------	--------	--------

acid	acid	acid	acid	acid	acid	acid	acid	acid	acid
Wt%	1.06	1.49	0.57	1.2	5.17	0.57	93.63	0.42	1.06

**Tabela 6: Resultados da análise de ácidos orgânicos do caldo de fermentação láctica em meio de açúcar**

Organic acid	phosphoic acid	citric acid	Tartaric acid	Malic acid	Aconitic acid	Succinic acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid
Wt%	0.32	0.32	0.07	0.09	0.13	0.32	98.20	0.13	0.30

5

De acordo com as Tabelas 5 e 6, o *Bacillus coagulans* ATCC7050 é uma bactéria que produz pouquíssima quantidade de ácidos orgânicos (tais como o acético e butírico, entre outros), além do ácido láctico, nas condições de fermentação supra citadas, donde conclui-se que é a fermentação objeto da presente invenção apresenta grande vantagem na purificação do ácido láctico após a fermentação láctica.

(C) Para o meio fermentativo utilizam-se as composições mostradas nas tabelas 7 e 8. No meio composto por melaço, pelo fato do próprio melaço conter pequenas quantidades de vitaminas, fontes de nitrogênio, e pela substituição do extrato de levedura por okara, não é necessário utilizar o extrato de levedura. O okara é o bagaço de soja. Ou seja, após deixar a soja de molho por 1 hora em água aquecida a 50°C, a mesma é triturada em liquidificador e posteriormente lavada. A quantidade de okara corresponde à quantidade da soja seca. No meio de açúcar granulado é necessário adicionar pequena quantidade de 5g(0.5%) de extrato de

15

levedura, que com a ajuda do okara é possível realizar fermentação láctica objeto da presente invenção de maneira satisfatória.

**Tabela 7: Composição (por L) do meio fermentativo de melação**

Reagente	Melção	Minerais	Extrato de levedura	Okara
Quantidade (g)	200	4	0	10

5 **Tabela 8: Composição (por L) do meio fermentativo de açúcar**

Reagente	Açúcar granulado	Minerais	Extrato de levedura	Okara
Quantidade (g)	100	4	5	10

(D) O meio fermentativo preparado (água, melação ou açúcar granulado. Minerais, okara, extrato de levedura) é colocado no tanque de fermentação acoplado com sistema de agitação, como mostra o esquema da Figura 1. Posteriormente inocula-se com 2% de um caldo fermentado previamente (24h de fermentação prévia). Durante a fermentação objeto da presente invenção, é promovida a agitação com agitador mantido a 50rpm.

(E) Na medida em que se desenvolve a fermentação láctica objeto da presente invenção, ocorre o crescimento das bactérias lácticas e a diminuição do pH. Assim como mostra a Figura 1, para manter o pH estável faz-se o gotejamento sucessivo de solução a 28% de amônia com bomba micro digital. Dessa forma o pH do meio fermentativo é mantido constante.

Como resultado dos experimentos de fermentação realizados de acordo com os processos descritos acima e que são objetos da presente invenção, 97.8% dos açúcares foram convertidos a ácidos orgânicos dentre os quais 98.6% é ácido láctico (o ácido aconítico da Tabela 5 é proveniente do próprio melaço). No meio fermentativo de açúcar 99.4% dos açúcares foram convertidos a ácidos orgânicos dentre os quais o ácido láctico conseguido foi de 98.20%. A fermentação foi concluída em 19.5h e a velocidade de fermentação atingiu valores de 5.1g/Lh, o que é considerada uma velocidade de fermentação extremamente alta, e a sua pureza óptica atingiu o valor de 99%.

No processo de fermentação láctica objeto da presente invenção, as fontes de nutrientes, tais como o extrato de levedura ou CSL, são utilizadas em pouca quantidade, não são necessárias instalações e equipamentos complexos de fermentação em ambientes anaeróbicos devido ao fato do mesmo ser aeróbico, tampouco há necessidade de processos de esterilização que necessitariam de grande quantidade de calor e equipamentos complexos. Portanto, o processo objeto da presente invenção possibilita a fermentação láctica com nutrientes baratos, equipamentos e instalações simples, conversão extremamente alta para ácido láctico e alta pureza óptica.

Uma modalidade não-limitativa do processo de fermentação láctica objeto da presente invenção é adicionalmente explicada por meio do exemplo a seguir:

**Exemplo:**

(A) Foi realizada a fermentação láctica utilizando as composições das tabelas 7 e 8. O teor de açúcar do melaço é de 47%. A essa composição foi adicionada água até 4L, fazendo desta a composição do meio de fermentação. Este foi vertido

num frasco de 3 bocas com capacidade de 4L e colocado no tanque de água á temperatura constante de 53°C. Em seguida foi inoculado 100ml de caldo fermentado previamente (por 24h) de *Bacillus coagulans* ATCC7050. A composição do caldo fermentado para inóculo é a mesma do meio a ser fermentado. A

5 fermentação foi realizada em ambiente aeróbico, com agitação de 50rpm. O pH diminui com o avanço da fermentação, o que foi mantido constante em pH 6.0 através de um controlador de pH conectado que controla o ON-OFF de bomba digital, responsável pelo gotejamento de solução de amônia a 28%. Deu-se como

10 término do experimento o momento em que o pH estacionou por completo. Após a fermentação foi feita a separação sólido-líquido do caldo fermentado, cujo líquido separado foi analisado em cromatografia iônica para observar a composição, onde conseguimos os cromatogramas mostrados pelos gráficos mostrados nas figuras 2 e

15 3. As composições estão de acordo com as tabelas 5 e 6. É sabido que o ácido aconítico que aparece no cromatograma do gráfico da figura 2 é derivado do próprio melaço. É possível verificar que as cepas de *Bacillus coagulans* realizam a fermentação homoláctica sob as condições descritas, assim como mostram os gráficos das figuras 2 e 3.

(B) Em seguida com o objetivo de estudar as condições ideais de fermentação do ácido láctico, mudou-se a temperatura da fermentação, quantidade

20 de minerais, o pH do caldo de fermentação. O volume do caldo de fermentação foi fixado em 1L, realizando os experimentos numa escala de ¼ das condições descritas no item anterior. Todos os experimentos foram finalizados em 24h.

Como a primeira condição fixou-se o pH em 6.0 e a quantidade de minerais em 5g, alterando somente a temperatura. A partir dos resultados mostrados

no gráfico da figura 4, verificamos que a produtividade do ácido láctico é máxima na temperatura de 53 °C tanto no meio de melaço como no de açúcar.

Os resultados dos estudos feitos alterando o pH e a temperatura e quantidade de minerais fixas em 53°C e 5g, respectivamente, são mostrados no gráfico da figura 5. Daí conclui-se que a quantidade de fermentação é máxima em pH na faixa de 6.0 a 6.5, tanto no melaço quanto no açúcar.

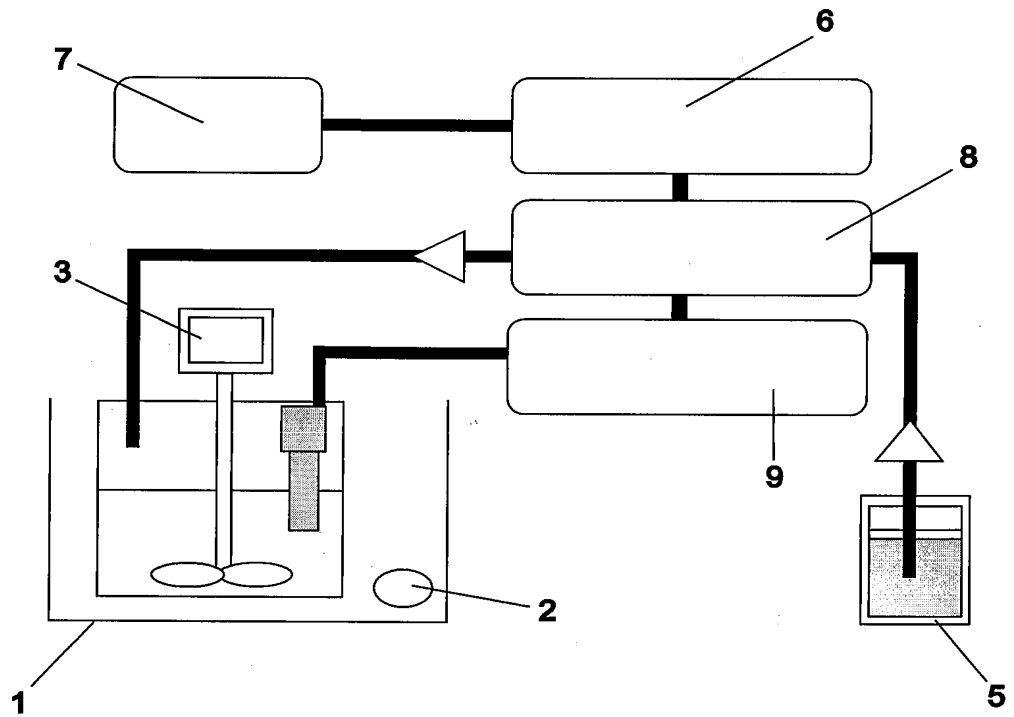
Por fim, sabendo as condições ideais de temperatura de fermentação de 53°C, e pH em 6.0, fixou-se os mesmos e realizou-se o experimento alterando somente a quantidade de minerais. Os resultados encontram-se no gráfico da figura 6. A composição por 1g da quantidade de minerais está de acordo com a tabela 4. A partir dos resultados dos experimentos, verificou-se que as quantidades ideais de minerais é de 5g para o melaço e 3,5g para o açúcar. Realizando o experimento com açúcar granulado nessas condições, a fermentação termina em 19.5h com conversão de 97.6% do açúcar para ácido láctico. A velocidade média de produção do ácido láctico foi de 5,01g/Lh. Este resultado está expresso nas Tabelas 1 e 2 e é igual com os resultados de outras teses em que a fermentação láctica foi realizada utilizando extrato de levedura ou CSL, o que demonstra que o okara, como ingrediente substituinte do extrato de levedura, conforme é objeto da presente invenção, é efetivo. A pureza óptica do ácido láctico obtida na fermentação objeto da presente invenção foi de 99.0%.

## REIVINDICAÇÕES

1. Caldo fermentativo do ácido láctico e processo de produção de ácido láctico através de fermentação **caracterizado** por utilizar melaço ou açúcar granulado como substrato.
- 5 2. Processo de produção de ácido láctico **caracterizado** por utilizar fermentação láctica sob altas temperaturas .
3. Processo de produção de ácido láctico **caracterizado** por utilizar fermentação láctica em ambiente aeróbico.
4. Processo de produção de ácido láctico **caracterizado** por utilizar fermentação  
10 láctica isenta de esterilização do meio fermentativo e dos equipamentos.
5. Processo de produção de ácido láctico **caracterizado** por utilizar cepas de *Bacillus coagulans* ATCC7050 como bactéria láctica.
6. Processo de produção de ácido láctico **caracterizado** por utilizar okara (bagaço de soja) como nutriente para a fermentação láctica.
- 15 7. Processo de produção de ácido láctico conforme reivindicações 1, 2, 3,4 e 5, **caracterizado** por utilizar tanque de fermentação acoplado com sistema de agitação.
8. Processo de produção de ácido láctico conforme reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado** por utilizar caldo fermentativo previamente inoculado.
- 20 9. Processo de produção de ácido láctico conforme reivindicações 8, **caracterizado** por utilizar caldo fermentativo inoculado previamente a 2% (24h de fermentação prévia).
10. Processo de produção de ácido láctico conforme reivindicação 7, **caracterizado** por promover a agitação constante.

11. Processo de produção de ácido láctico conforme reivindicação 10, **caracterizado** por promover a agitação com agitador mantido a 50rpm.
12. Processo de produção de ácido láctico conforme reivindicação 7, **caracterizado** por para manter o pH estável .
- 5 13. Processo de produção de ácido láctico conforme reivindicação 12, **caracterizado** por fazer a manutenção do pH através de gotejamento sucessivo de solução a 28% de amônia com bomba micro digital.

FIGURA 1



## FIGURA 2

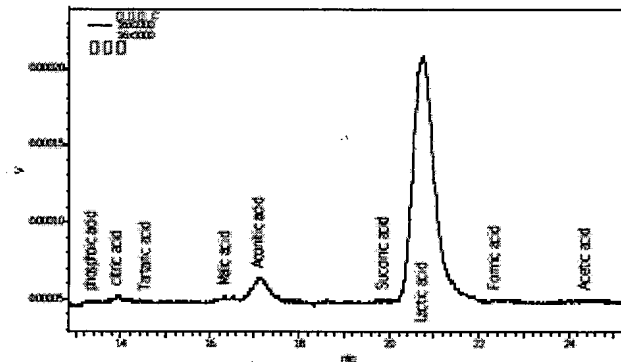


Figura 3 Meio de meloço, cromatograma HPLC do caldo fermentado

## FIGURA 3

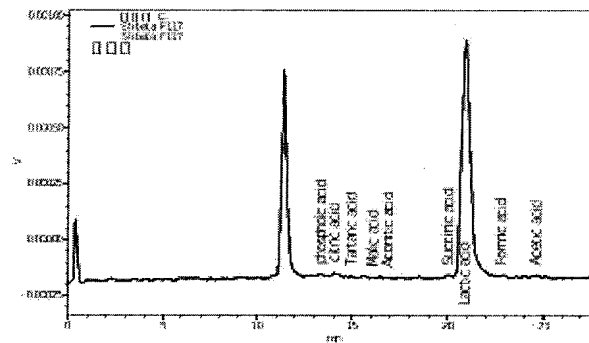


Figura 4 Meio de açúcar granulado, cromatograma HPLC do caldo fermentado

FIGURA 4

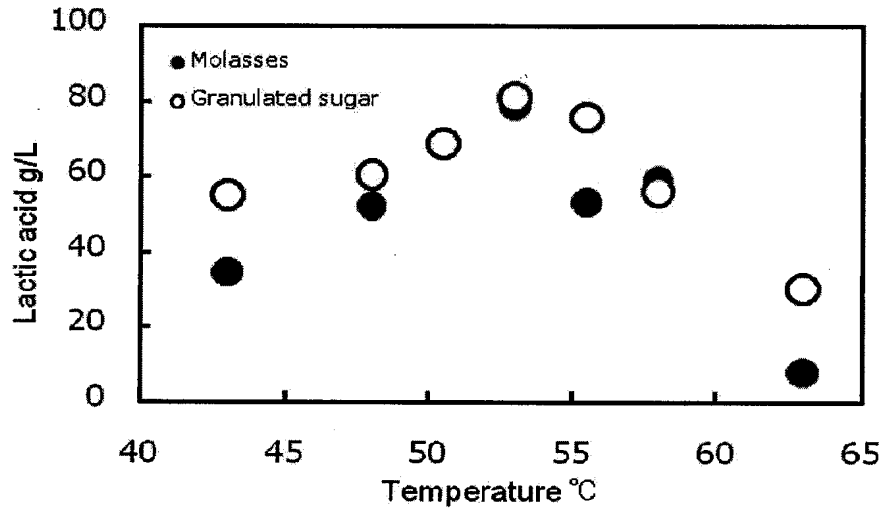


FIGURA 5

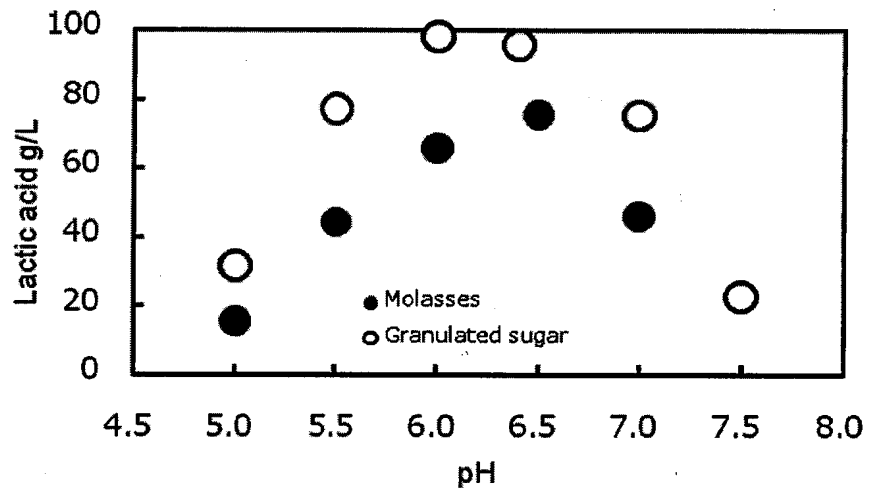
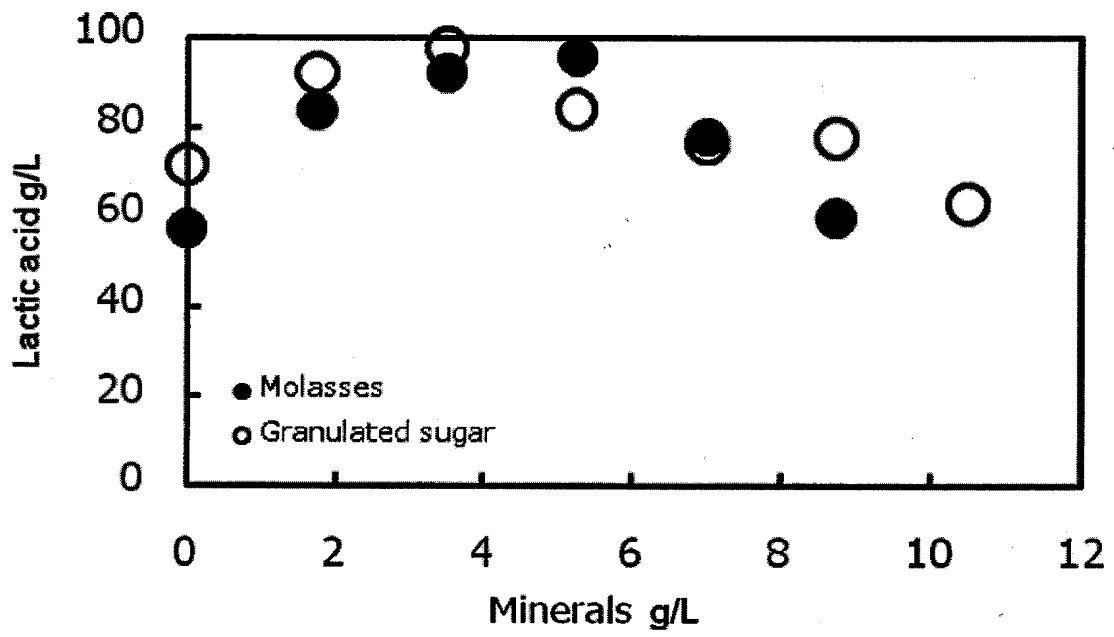


FIGURA 6



RESUMO

**“CALDO FERMENTATIVO DO ÁCIDO LÁTICO E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO”** a presente invenção refere-se a um caldo fermentativo do ácido láctico consistindo de melação ou açúcar granulado e método de produção de ácido láctico de alta pureza ótica através de fermentação láctica estável sob altas temperaturas em ambiente aeróbico e isento de esterilização.