



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Avaliação do potencial biológico do soro de Tofu

Autor: Matheus Silva Erreira

Orientadora: Daniele Misturini Rossi

Coorientadora: Mariana Fensterseifer Fabricio

Porto Alegre, setembro de 2022

Autor: Matheus Silva Erreira

Avaliação do potencial biológico do soro de Tofu

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
COMGRAD/ENQ da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química*

Orientadora: Daniele Misturini Rossi
Coorientadora: Mariana Fensterseifer Fabricio

Banca Examinadora:

Dra., Débora Jung Luvizetto Faccin, UFRGS

Msc. Dener Acosta de Assis, ICTA-UFRGS

Porto Alegre

2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar saúde e proteção e me manter amparado em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus pais Adriano e Isabel, e ao meu irmão, Henrique, por todo amor, carinho, educação, confiança e incentivo. Por serem minha base e manterem-me de pé nos momentos de aflição.

À minha companheira de vida, Gabriele, que em todos os momentos da graduação esteve ao meu lado, com muito amor e sempre dando todo suporte necessário para que esse momento chegasse.

Às minhas orientadoras, Daniele Misturini Rossi e Mariana Fensterseifer Fabricio, por todos os ensinamentos, ajuda e paciência durante a elaboração do trabalho.

À UFRGS por proporcionar-me um ensino de qualidade, público e gratuito.

À todos os professores que passaram durante a minha trajetória e de alguma forma contribuíram para a minha formação, em especial os professores do Departamento de Engenharia Química.

E a todos que em algum momento dessa trajetória estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma forma para que esse objetivo fosse alcançado.

RESUMO

A escassez de recursos, correlacionada à preocupação constante com a preservação do meio ambiente, aumentam a necessidade de pesquisas sobre o potencial de utilização de substratos alternativos (ex: resíduos agrícolas e da indústria de alimentos) na produção de bioprodutos de valor agregado. O soro de tofu é um subproduto do processo de fabricação do tofu, conhecido como “queijo” de soja, que recentemente vem sendo utilizado como alternativa ao soro de leite e de outros subprodutos para o cultivo de bactérias ácido lácticas e leveduras, os quais utilizam os açúcares presentes como fonte de energia e fonte de carbono. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do soro de tofu como meio de cultivo para a produção de bioprodutos de valor agregado, com enfoque no ácido láctico e etanol. Na primeira etapa do trabalho, selecionou-se potenciais microrganismos capazes de utilizar o soro de tofu, sem adição de qualquer outra fonte de nutriente, para a verificação dos potenciais metabólitos de interesse. Os microrganismos que se mostraram promissores nesta primeira etapa de *screening*, foram selecionados para os cultivos em batelada. Após a primeira etapa do trabalho, três microrganismos foram selecionados: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Kluyveromyces marxianus*. As linhagens foram inoculadas separadamente em soro de tofu previamente autoclavado, e mantidas a 150 rpm e 30 °C. O cultivo da levedura durou 24 horas, já as bactérias foram mantidas por 48 horas em cultivo. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo para avaliação de parâmetros cinéticos, pH e crescimento celular. Os três microrganismos foram capazes de consumir total ou parcialmente apenas um dos açúcares presentes no meio, a sacarose, enquanto rafinose e estaquiose não tiveram suas concentrações alteradas. *L. plantarum*, *L. fermentum* e *K. marxianus* obtiveram um consumo de sacarose de 37,7 %, 42,0% e 100,0%, respectivamente. As bactérias *L. plantarum* e *L. fermentum*, em 48 horas de cultivo, foram capazes de produzir 7,06 g.L⁻¹ e 4,12 g.L⁻¹ de ácido láctico, respectivamente. Já a levedura *K. marxianus* produziu 19,05 g.L⁻¹ de etanol em 24 horas. Esses resultados sugerem que os três microrganismos possuem potencial para a conversão do resíduo da produção de tofu em produtos de alto valor agregado.

Palavras-chave: soro de tofu, ácido láctico, etanol, fermentação

ABSTRACT

The scarcity of resources, related to the constant concern with the preservation of the environment, increases the need to use alternative sources in the production of value-added bioproducts, in which agricultural and food industry residues stand out. Tofu whey is a by-product of the tofu manufacturing process, known as soy “cheese”, and has recently been used as an alternative to whey and other by-products for the cultivation of lactic acid bacteria and yeasts, which use the sugars present as a source of energy. Within this context, the objective of this work was to evaluate the potential of tofu whey as a culture medium for the production of value-added bioproducts, focusing on lactic acid and ethanol. In the first stage of the work, potential microorganisms capable of using tofu whey were selected, without the addition of any other nutrient source, to verify the potential metabolites of interest. The microorganisms that showed promise in this first screening step were selected for batch cultures. After the first stage of the work, three microorganisms were selected: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* and *Kluyveromyces marxianus*. The strains were inoculated separately in previously autoclaved tofu serum and kept at 150 rpm and 30 °C for 24 and 48 hours for yeast and bacteria, respectively. Aliquots were taken at time intervals for evaluation of kinetic parameters, pH and cell growth. The three microorganisms were able to fully or partially consume only one of the sugars present in the medium, sucrose. *L. plantarum*, *L. fermentum* and *K. marxianus* obtained sucrose consumption of 37.71%, 42.07% and 100.00%, respectively. The bacteria *L. plantarum* and *L. fermentum*, in 48 hours of culture, were able to produce 7.06 g.L⁻¹ e 4.12 g.L⁻¹ of lactic acid, respectively. The yeast *K. marxianus* produced 19.05 g.L⁻¹ of ethanol in 24 hours. These results suggest that the three microorganisms have the potential to convert tofu production residue into high value-added products.

Keywords: *sofu whey, lactic acid, ethanol, fermentation*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do processo de produção de tofu

Figura 2 – Vias de fermentação das bactérias ácido lácticas a partir da glicose. (A) Via homofermentativa; (B) Via heterofermentativa

Figura 3 – Passo a passo de plaqueamento pelo método *Single Plate-Serial Dilution Spotting*

Figura 4 - Cromatograma do soro de Tofu: (a) in natura antes da autoclave (b) depois da autoclave

Figura 5- Quantificação dos bioprodutos formados durante fermentação

Figura 6 – Cinética do consumo de sacarose e produção de etanol em soro de tofu com a levedura *Kluyveromyces marxianus*

Figura 7 – Crescimento celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* durante ensaio de fermentação em meio soro de tofu

Figura 8 - Placa de meio YPD sólido, contendo colônias de *Kluyveromyces marxianus*.

Figura 9 – Cinética do consumo de sacarose e produção de ácido láctico em soro de tofu com a bactéria *Lactobacillus plantarum*

Figura 10 – Placa de meio MRS sólido, contendo colônias de *Lactobacillus plantarum*

Figura 11 – Crescimento celular da bactéria *Lactobacillus plantarum* durante ensaio de fermentação em meio soro de tofu

Figura 12 - Cinética do consumo de sacarose e produção de bioprodutos em soro de tofu com a bactéria *Lactobacillus fermentum*

Figura 13 – Placa de meio MRS sólido, contendo colônias de *Lactobacillus fermentum*

Figura 14 - Crescimento celular da bactéria *Lactobacillus fermentum* durante ensaio de fermentação em meio soro de tofu

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal do soro de tofu (ST)

Tabela 2 - Uso do soro de tofu para diversos fins industriais

Tabela 3 - Composição do meio de cultura MRS

Tabela 4 - Composição do meio de cultura YPD

Tabela 5 - Parâmetros de consumo de açúcares e rendimento da produção de etanol

Tabela 6 - Parâmetros de consumo de açúcares, rendimento e produtividade da produção de ácido lático.

Tabela 7 - Parâmetros de consumo de açúcares, rendimento e produtividade da produção de ácido lático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	SORO DE TOFU	4
2.1.1	Produção do soro de tofu	4
2.1.2	Aplicações industriais do soro de tofu	8
2.2	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	9
2.3	LEVEDURAS	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	SORO DE TOFU	16
3.2	MICROORGANISMOS	16
3.3	SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS POTENCIAIS PRODUTORES DE BIOPRODUTOS	16
3.4	MEIOS DE CULTURA	17
3.5	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	18
3.5.1	Análise de crescimento celular	18
3.6	METODOLOGIA ANALÍTICA	21
3.7	CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1	SORO DE TOFU	23
4.2	SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS	23
4.3	CINÉTICA <i>Kluyveromyces marxianus</i>	25
4.4	CRESCIMENTO CELULAR <i>Kluyveromyces marxianus</i>	27
4.5	CINÉTICA <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
4.6	CRESCIMENTO CELULAR <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
4.7	CINÉTICA <i>Lactobacillus fermentum</i>	33
4.8	CRESCIMENTO CELULAR <i>Lactobacillus fermentum</i>	36
5	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	38
	REFERÊNCIAS	40
	APÊNDICE A	51

1 INTRODUÇÃO

Em um mundo cada vez mais preocupado com a manutenção de um estilo de vida mais saudável e sustentável, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para a obtenção de produtos e substâncias naturais que possam ser utilizados em larga escala na indústria alimentícia e em outros setores, como alternativa a produtos não sustentáveis e muitas vezes prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Com isso, cresce cada vez mais o interesse por resíduos da indústria agrícola e de alimentos, que possam servir de matéria-prima para a obtenção de bioprodutos através de processos biotecnológicos fermentativos.

Diante disso, surge como promissora alternativa o soro de tofu, um subproduto oriundo da produção do “queijo” de soja, rico em nutrientes e que atualmente possui um baixo valor comercial para indústria devido seu alto teor de água, sendo considerado um problema ambiental e industrial (PEÑAS et al., 2006). Em contrapartida, apresenta uma alta concentração de sólidos totais, tornando viável sua utilização como substrato em diferentes aplicações biotecnológicas. Além disso, foi comprovado que o uso de derivados de soja pode trazer diversos benefícios no controle de doenças crônicas, tais como câncer e diabetes (PENHA et al., 2007)

Tendo em vista o potencial do soro de tofu como fonte de carbono e nutrientes, este subproduto vem sendo utilizado como meio de cultura alternativo no crescimento de diversos microrganismos capazes de produzir bioprodutos de interesse tecnológico através de processos fermentativos. É de extrema importância levar em consideração que a síntese química de muitos desses bioprodutos, como o ácido lático, que passa por diversos processos durante a sua produção, normalmente é custosa e poluente e que os recursos fósseis utilizados nos processos são finitos. Sendo assim, a produção biotecnológica a partir de subprodutos da indústria vem recebendo bastante atenção e apresenta-se como uma solução limpa, obtida do aproveitamento de matérias primas amplamente disponíveis e de baixo custo (PEÑAS et al., 2006).

Existem diversos microrganismos capazes de produzir bioprodutos utilizando fontes de carbono oriundas de meios de cultura alternativos, como o soro de tofu. Entre eles,

destacam-se os probióticos, definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como microrganismos vivos, que quando ingeridos em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). Dentre os microrganismos de interesse, estão as bactérias ácido lácticas (BAL), que compreendem um amplo grupo de microrganismos que possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. Dentre essas características, está a capacidade de metabolizar diferentes açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e gorduras em compostos voláteis, como ácido láctico, etanol e ácido acético.

Outros microrganismos com grande potencial biotecnológico são as leveduras da espécie *Kluyveromyces marxianus*, que além de também conseguirem produzir ácido láctico no seu processo de fermentação, algo que não é comum entre as leveduras, são capazes de produzir diversos outros compostos, tais como enzimas, proteínas, componentes de sabor, aroma e etanol, tornando-a uma potencial alternativa para a produção de bioetanol, em substituição a utilização de combustíveis fósseis (TABANELLI et al., 2016)

Para o cultivo desses microrganismos, normalmente são utilizados meios de cultura quimicamente definidos, compostos pelos micronutrientes necessários para o seu crescimento ideal. No cultivo das BAL, os nutrientes necessários estão presentes no meio definido por Man, Rogosa e Sharpe (1960) denominado MRS. Já para leveduras, o meio ideal para seu crescimento é conhecido como YPD, composto por extrato de levedura, peptona e dextrose. Esses meios possuem um alto valor comercial para a sua produção e este quesito reforça a necessidade do desenvolvimento e estudo de novos meios de cultura alternativos e de baixo custo, para o cultivo desses microrganismos.

Nesse contexto, estudar a produção de biocompostos através do cultivo de microrganismos em meios alternativos, sustentáveis e de baixo custo é de fundamental importância para o desenvolvimento e crescimento de diferentes setores da indústria.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial do soro de tofu, resíduo proveniente da produção de tofu, como fonte de carbono e nutrientes alternativa em bioprocessos.

Dentre os objetivos específicos, destacam-se:

- Avaliar potenciais microrganismos produtores de ácido láctico e etanol, que consigam utilizar unicamente o soro de tofu como fonte de carbono e energia;
- Selecionar os microrganismos com maior potencial e avaliar a cinética de produção dos compostos de interesse, através do modo batelada.
- Avaliar a cinética de crescimento microbiano dos microrganismos selecionados;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SORO DE TOFU

O interesse por estudos envolvendo consumo de soja e derivados têm aumentado nas últimas décadas, pois foi comprovado que esses produtos trazem benefícios no controle de doenças crônicas tais como câncer, diabetes, osteoporose e doenças cardiovasculares, se ingeridos regularmente. Esses benefícios são atribuídos às isoflavonas, que são compostos bioativos pertencentes à classe dos fitoestrógenos. As isoflavonas são encontradas em alimentos como o tofu, bem como no resíduo líquido proveniente da sua produção, denominado soro de tofu.

O soro de tofu é um subproduto do processo de fabricação do “queijo” de soja e recentemente vem sendo utilizado como meio alternativo ao soro de leite e de outros meios de crescimento para o cultivo de bactérias ácido lácticas e leveduras, que são capazes de utilizar como fonte de energia os açúcares presentes no soro (THI et al., 2003). A principal vantagem de utilizar o soro de tofu, considerado um problema ambiental e industrial, é o seu baixo valor comercial para a indústria (PEÑAS et al., 2006). O soro de tofu é uma fonte rica de carbono, contendo açúcares como sacarose, rafinose, estaquiose e oligossacarídeos, que podem ser consumidos por bactérias ácido lácticas e leveduras, além de ser considerado uma fonte rica em proteínas e minerais (SHURTLEFF; AYOAGI, 1984), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 — Composição média do soro de tofu (ST)

Componentes (g/L)	Concentração
Carboidratos	8,50
Estaquiose	5,48 a 6,40
Rafinose	0,30 a 1,80
Sacarose	2,87 a 11,30
Lactose	N.D
Glicose	0,14 a 1,20
Frutose	0,36-1,10
Proteínas	1,33 a 8,20
Gorduras	3,90 a 10,0
Minerais	3,90 a 4,60

Fonte: Chua & Liu, 2019.

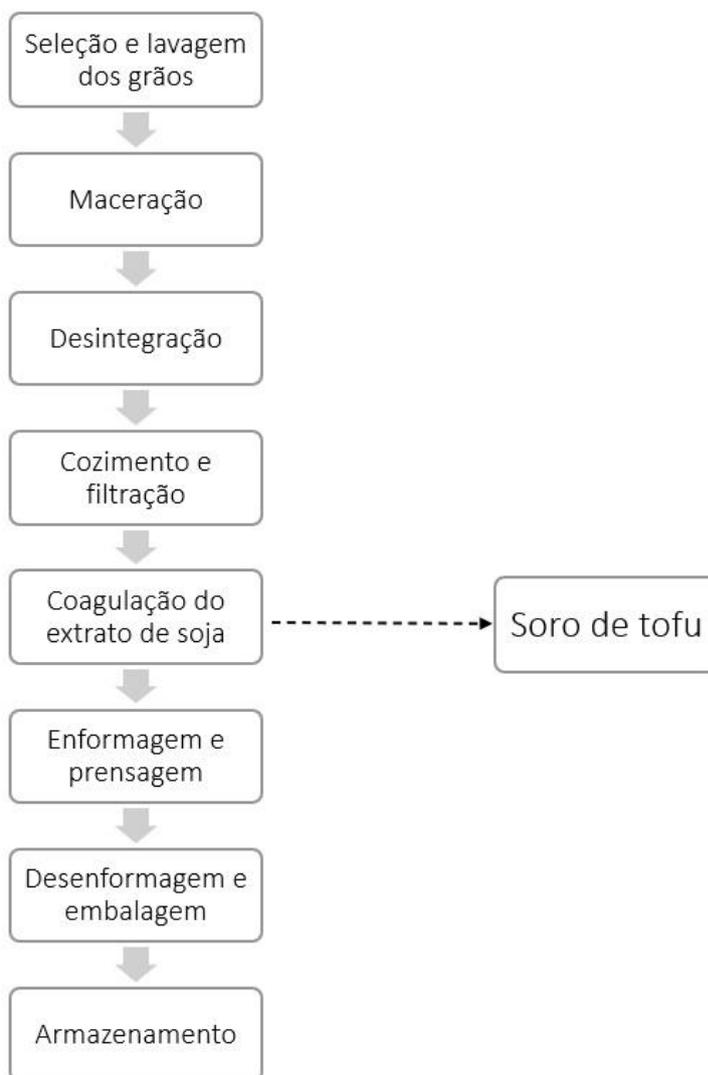
2.1.1 Produção do soro de tofu

O soro é resíduo do processo de produção do tofu, composto por uma solução aquosa rica em nutrientes. Estima-se que para a produção de 2 quilos de tofu seja necessário 30 L de água (BENASSI, 2007). O tofu tradicional consiste em um gel obtido a partir do extrato de soja, cuja formação envolve primeiramente a desnaturação das proteínas pelo calor e dependendo do método utilizado, tipo de coagulante e o teor de umidade, o tofu pode ser classificado em tofu firme, tofu macio e tofu tipo silken. Além disso, o rendimento e a qualidade do produto podem ser influenciados pelo tipo de cultivar de soja, qualidade do grão (que depende das condições de cultivo da planta e do armazenamento) e pelas condições de processamento do tofu (LI et al., 2012).

É um alimento milenarmente consumido por asiáticos e portanto, até hoje sua maior produção mundial está concentrada em países orientais. Atualmente, é consumido em países do oriente e do ocidente, pois sua digestibilidade torna-o recomendado tanto para crianças como para idosos. Embora o consumo de tofu ainda não seja um hábito para os brasileiros, apresenta um bom potencial de aceitação, por diversos motivos: É um produto nutritivo, saudável e com baixo conteúdo calórico; tem sabor suave, relativamente neutro, o que permite utilizá-lo tanto em preparações salgadas, como doces (EMBRAPA, 2010).

O processamento do tofu pode variar conforme o fabricante, mas as etapas básicas são: maceração dos grãos; trituração com água; filtração; adição de um ou mais coagulantes ao extrato de soja; seguindo-se o aquecimento, para facilitar a coagulação (CUI et al., 2004). Corte e dessoragem do coágulo são etapas opcionais, realizadas quando se deseja obter uma textura mais firme (PRABHAKARAN, PERERA, VALITAVEETIL, 2006). Noh et al. (2005) ressaltam que durante essas etapas podem ocorrer perdas de componentes químicos, por solubilização e arraste na fase aquosa, durante a maceração dos grãos, na separação entre o extrato e o resíduo sólido da soja, e na dessoragem. O processo da produção de tofu é ilustrado no fluxograma da Figura 1.

Figura 1 – Etapas do processo de produção de tofu.



Fonte: adaptado de Benassi et al., 2007.

Na produção do tofu, a coagulação é a etapa mais importante e mais difícil de ser controlada porque envolvem muitas variáveis, como o tipo e concentração de coagulante, o tratamento térmico do extrato de soja e as condições de tempo e temperatura para coagulação (HOU; CHANG; SHIH, 2006). A formação do gel proteico envolve duas etapas: primeiramente, ocorre a desnaturação da proteína pelo calor e, em seguida, a coagulação hidrofóbica promovida por um coagulante (KOHYAMA; SANO; DOI, 1995; NOH, 2005). É nesta etapa que o soro de tofu, objeto de estudo deste trabalho, é gerado.

2.1.2 Aplicações industriais do soro de tofu

O soro de tofu, apesar da riqueza de sua composição, ainda é um subproduto sem aplicação efetiva dentro da indústria. Porém, nos últimos anos, têm-se desenvolvido diversas pesquisas de aplicações desse resíduo.

Uma das novas aplicações surgiu de uma iniciativa na Indonésia, em que produtores locais de tofu estão utilizando o resíduo para a geração de energia no vilarejo onde moram. O soro de tofu é tratado com uma bactéria capaz de converter o ácido que é acrescentado durante o processo de produção em biogás. O método é baseado em diversos estudos que utilizam subprodutos da indústria alimentícia, ricos em matéria orgânica para geração de energia através da ação de microrganismos. Para tanto, utiliza-se da digestão anaeróbia que se trata de uma alternativa de baixo custo e fácil manejo, sendo o mecanismo mais usado para tratamento dos efluentes oriundos de atividades industriais e agrícolas que possuem elevadas taxas de matéria orgânica, a qual é convertida em energia sob forma de biogás (CASSINI, 2003).

Outro estudo de aplicação, consistiu na utilização do soro de tofu concentrado, como fonte de compostos bioativos na produção de bebidas lácteas fermentadas. A adição do soro de tofu concentrado permitiu a obtenção de bebidas lácteas fermentadas com concentrações significativas de malonil glicosídeos e β -glicosídeos e em menores concentrações de agliconas (SILVIA BENEDETTI et al., 2014).

Azambuja (2014) relatou a capacidade do soro de tofu servir como suplemento nutricional, realizando o cultivo com *L. plantarum* para produção de exopolissacarídeos (EPS), que são fibras incluídas no grupo de prebióticos, definidos como polissacarídeos extracelulares que podem ser produzidos por alguns fungos e bactérias e são encontrados em forma de limo, ou seja, excretados para o meio extracelular ou podem ser encontrados ligados à superfície das células. Outras aplicações do soro de tofu são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Uso do soro de tofu para diversos fins industriais

Métodos físicos	Métodos microbiológicos e enzimáticos
Recuperação de íons	Produção de coagulante de tofu
Recuperação de proteínas	Produção de probióticos
Recuperação de oligossacarídeos	Produção de hidrogênio
Recuperação de isoflavonas	Processo de biocimentação
Produção de crioprotetores	Propagação de culturas para teste de tuberculose
Concentração de soro	Produção de ácido cítrico
Produção de emulsificantes	Cultivo de probióticos/ Bactérias ácido lácticas
	Produção de nisina
	Produção de peptídeo
	Produção de proteína micelial fúngica
	Produção de endopolissacarídeos a partir de fungos
	Produção de biodiesel a partir do cultivo de fungos
	Bebida de ácido láctico com leite
	Produção de ácido láctico com soro de soja
	Produção de bebidas alcoólicas
	Produção de Kombuchá

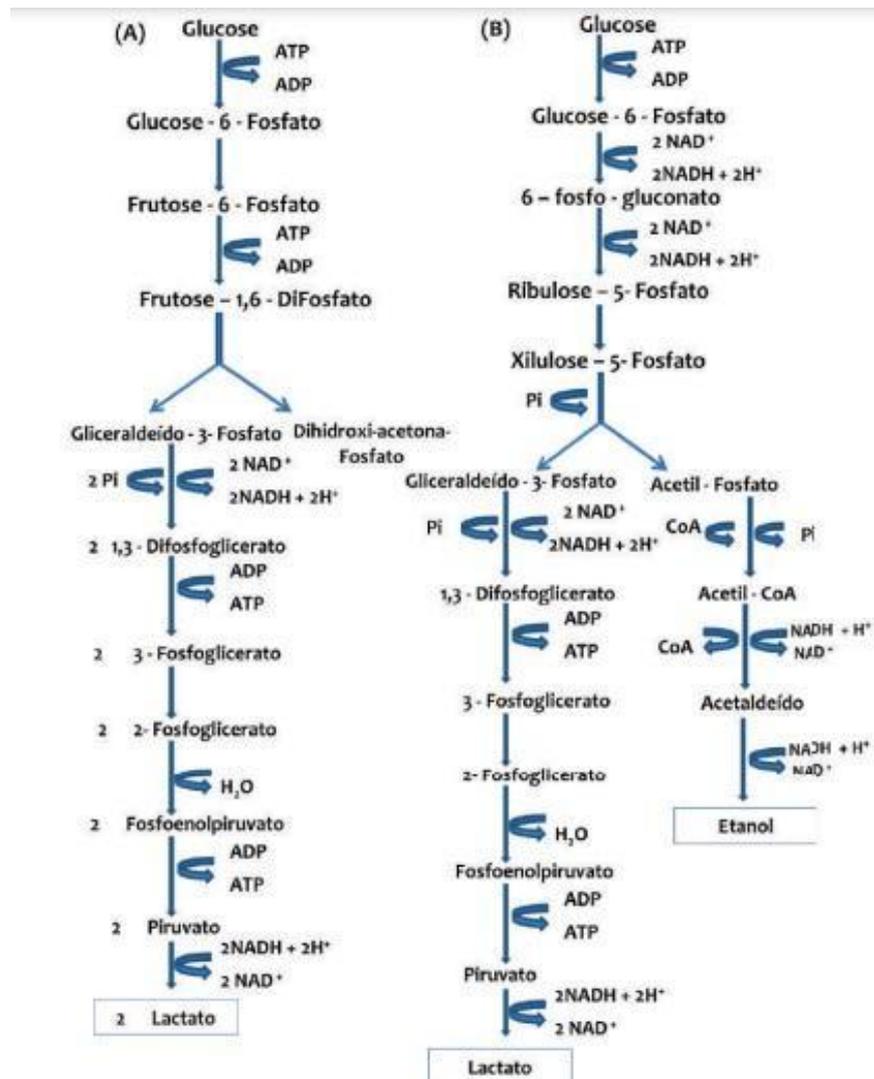
Fonte: traduzido e adaptado de Chua e Liu (2019).

2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) pertencem a um amplo grupo de diferentes bactérias encontradas na natureza. Apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. Elas não são definidas sistematicamente com base em relações evolutivas, mas sim em um grupo funcional utilizado por microbiologistas para as bactérias que são inofensivas tanto para a qualidade alimentar quanto para a saúde humana e que crescem espontaneamente fermentando alimentos (D'SOUZA et al., 2020). São amplamente empregadas na produção de alimentos, tais como leite fermentado, iogurtes, queijos e no processamento de carnes e bebidas alcoólicas. Além disso, as BAL são capazes de estender a vida útil dos alimentos através da diminuição do pH e também possuem a capacidade de modificar as propriedades sensoriais dos alimentos fermentados, como aroma e sabor (FREIRE, et al., 2021).

Esses microrganismos ainda podem ser classificados como homo ou heterofermentativos, dependendo dos metabólitos produzidos durante o processo fermentativo. A obtenção de energia ocorre pela fermentação de carboidratos. Enquanto as homofermentativas produzem apenas ácido láctico como produto da fermentação da glicose, os heterofermentativas produzem ácido láctico em menor quantidade e também produzem etanol e, em alguns casos, ácido acético e dióxido de carbono (CO₂) (FRANCO; LANDGRAF, 2008; MASSAGUER, 2005). A figura 2 apresenta a rota metabólica das BAL utilizando glicose como fonte de carbono. Como demonstrado na Figura 2, independente da rota metabólica usada, sempre haverá a produção de ácido láctico. Porém, nem sempre a fonte de carboidrato será unicamente glicose, podendo haver outros açúcares presentes, dependendo do meio utilizado para o cultivo.

Figura 2 – Vias de fermentação das bactérias ácido lácticas a partir da glicose. (A) Via homofermentativa; (B) Via heterofermentativa.



Fonte: Adaptado de Salminen e Wright, 1993.

Ainda, algumas BAL, quando ingeridas em quantidades adequadas, são capazes de trazer benefícios à saúde do hospedeiro, sendo consideradas probióticas. Para serem utilizadas, essas bactérias devem ter sua identidade conhecida e apresentar características específicas. Os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA,

2002) estipula que a quantidade mínima viável para os probióticos atuarem de maneira benéfica para o hospedeiro deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para consumo.

A fabricação de produtos contendo bactérias probióticas tem como base a seleção desses microrganismos de acordo com a estabilidade frente ao ácido estomacal e à bile, o gênero ao qual pertence a bactéria, que deve ser preferencialmente de origem humana, a capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal humano e a capacidade de produzir compostos antimicrobianos no intestino. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), também necessitam ser reconhecidas como seguras, ou seja, não ser patogênicas e não causar doenças tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da transmissão da resistência a antimicrobianos (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998; LEE; NOMOTO; SALMINEM, 1999; SAARELA et al., 2000; NAGPAL et al., 2012).

O uso de probióticos vem aumentando gradativamente, tanto para a saúde humana como para a saúde animal. Os probióticos utilizados em humanos, são geralmente oriundos de alimentos lácteos, enquanto as fontes de probióticos utilizados em animais são muitas vezes oriundas do próprio trato digestivo do animal. Com isso, cresce cada vez mais o interesse por fontes alternativas para o crescimento de microrganismos probióticos, como produtos alimentícios de origem vegetal, visto que, essas fontes apresentam vantagem por exemplo, sendo uma opção para consumidores intolerantes a lactose ou veganos (SAAD, 2006)

Dentro das BAL existe o gênero dos *Lactobacillus*, que são microrganismos encontrados no intestino de seres humanos e outros animais, com seu número variando de acordo com as espécies, a idade do hospedeiro ou a localização dentro do intestino. As bactérias deste gênero geralmente são benignas, e algumas são comprovadamente benéficas, levando as pessoas a utilizá-las em preparações probióticas, projetadas para promover a saúde. Alguns usos convencionais de bactérias do gênero *Lactobacillus* incluem restauração da flora intestinal após infecções graves e no tratamento de vaginose bacteriana. (PANDEY et al., 2018).

O uso das bactérias ácido lácticas em bioprocessos está muito ligado à sua capacidade de produzir ácido lático em grande quantidade. O ácido lático possui aplicação em diversos

setores, além de ser essencial para a produção de ácido polilático (PLA), um polímero biodegradável utilizado como alternativa à polímeros de origem fóssil, por exemplo, na obtenção de plástico (BOONTIN et al., 2016)

Dentro da indústria alimentícia, bactérias ácido lácticas vêm sendo usadas como conservantes de alimentos, devido a suas propriedades antimicrobianas, inibindo o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, sem que seja necessário o uso de conservantes. São muito empregadas na produção de fermentados, seja como culturas *starter* ou adjuntas (DIAS et al., 2008).

Lactococcus lactis subespécie *lactis* e *cremoris* juntamente ao *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *cremoris* são largamente empregados na indústria de laticínios, na produção de leites fermentados e queijos, como culturas iniciadoras mesofílicas. *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus plantarum* são capazes de sintetizar o folato, vitamina com propriedades antioxidantes. *L. acidophilus* é capaz de aumentar a concentração dessa vitamina em leites fermentados (COELHO et al., 2011).

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica também tem voltado suas atenções para as BAL devido ao seu potencial probiótico, à sua capacidade de produção de ácido láctico e à sua capacidade de retenção de água, que permite a utilização na produção de pomadas, loções, soluções anti-acne, umectantes e soluções parentais (KRISHNA et al., 2018).

2.3 LEVEDURAS

As leveduras têm uma longa história de uso com uma ampla gama de aplicações em diferentes áreas, incluindo alimentos, bebidas, indústrias farmacêuticas, bem como setores de aquicultura, pecuária e biotecnologia (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

Além disso, esses microrganismos eucarióticos têm capacidades promissoras como fábricas de células e carregadores nutracêuticos, bem como na forma de probióticos e iniciadores funcionais, adjuntos ou co-culturas. Esses microrganismos podem produzir compostos bioativos com propriedades terapêuticas e benéficas à saúde, como oligossacarídeos e peptídeos bioativos, carotenóides, polifenóis, glutatona, β -glucana, ácido γ -aminobutírico (GABA), selênio orgânico e prebióticos (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

Recentemente o interesse por probióticos do Reino Fungi tem aumentado, surgindo como alternativa a probióticos usados comumente tais como bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Bacillus* (CANHOS; MANFIO, 2010).

As leveduras probióticas são capazes de tolerar baixo pH e sais biliares, e apresentam atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos e deteriorantes. Algumas características interessantes da levedura probiótica incluem sua resistência intrínseca a antibióticos, capacidade de formação e agregação de biofilme, habilidades antimicotoxigênicas e de degradação de fitatos, bem como seus efeitos promotores de saúde (MIRANDA, 2020).

O gênero mais comum entre as leveduras usadas pela indústria alimentícia, é o *Saccharomyces*. Linhagens deste gênero estão presentes nos mais diversos processos de produção utilizados em cervejarias, vinícolas, destilarias e em processos de panificação. Entretanto, atualmente tem crescido o interesse em aplicações de leveduras de outros gêneros que até pouco tempo possuíam pouco interesse por parte da indústria, como *Bretanomyces*, *Torulasporea*, *Pichia* e vários outros gêneros de leveduras selvagens (FARNWORTH, 2005).

Neste contexto, algumas leveduras apresentam-se como potenciais objetos de estudo, tanto por sua capacidade probiótica em humanos, quanto também pela capacidade de conseguir produzir diferentes compostos orgânicos, além do etanol, no seu processo de fermentação. Nos últimos anos, muita pesquisa tem sido focada no isolamento e caracterização dessas leveduras do ponto de vista tecnológico e do ponto de vista funcional (PENNACHIA et al., 2008; BINETTI et al., 2013). Devido a isso, a *Kluyveromyces marxianus* tem ganhado atenção por suas características peculiares, alta termotolerância, taxa de crescimento, amplo espectro de substrato e ausência de metabolismo fermentativo por excesso de açúcar (FARNWORTH, 2005; BOLLA et al., 2011; TOFALO et al., 2014).

No que diz respeito às aplicações biotecnológicas, a *Kluyveromyces marxianus* é conhecida pela produção de enzimas (FONSECA et al., 2008), de compostos aromáticos (FABRE et al., 1995), e etanol (FONSECA et al., 2008). Além disso, pode ser usada para a redução do teor de lactose (RAJOKA et al., 2004) e para a produção de bioingredientes de

alto valor (BELEM et al., 1997). Dentre essas aplicações citadas, podemos destacar a produção de etanol no seu processo fermentativo, que, em escala industrial, apresenta potencial como uma alternativa aos combustíveis fósseis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SORO DE TOFU

O soro de tofu utilizado neste trabalho foi fornecido pela empresa **Família Hattori (Viamão, RS)**. O soro foi fracionado em garrafas de 2 litros e congelado para posterior uso.

3.2 MICRORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizadas bactérias ácido lácticas isoladas previamente de soro de leite e grãos de kefir, identificadas por espectrofotometria de massas, MALDI-TOF, como: *Lactobacillus fermentum* e *Lactococcus lactis*, que fazem parte do banco de culturas LABIO (UFRGS). *Lactobacillus plantarum*, previamente identificado, foi selecionado do banco de culturas do Bioteclab (ICTA/UFRGS). Além das bactérias, para o desenvolvimento do trabalho também foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* (anteriormente *fragilis*), o qual faz parte do banco de culturas do Bioteclab (ICTA-UFRGS). Os microrganismos foram mantidos em estoque de glicerol 50 %, congelados a -20°C para posterior uso.

3.3 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS POTENCIAIS PRODUTORES DE BIOPRODUTOS

A fim de avaliar a utilização dos açúcares presentes no soro de tofu e a produção de ácido láctico, foi realizada uma seleção com as BAL citadas no item 3.2. Os ensaios de fermentação foram realizados em agitador orbital em Erlenmeyers de 125 mL, com volume útil de meio fermentativo de 60 mL. Quanto à oxigenação dos meios de cultura, os Erlenmeyers foram vedados com buchas de algodão permeáveis ao oxigênio, simulando uma condição de microaerofilia, com agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. O soro de tofu, utilizado diretamente como fonte de carbono e nutrientes, foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e o pH inicial foi ajustado a 6,7 com Hidróxido de Sódio (NaOH). Nesta etapa, estoques de glicerol dos microrganismos foram utilizados diretamente como inóculo, a fim de verificar a produção de ácido láctico. O cultivo foi realizado por 24 horas e após esse período o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em relação a produção de ácido láctico. O mesmo procedimento foi realizado com a levedura *Kluyveromyces marxianus*, porém a análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em relação à produção de etanol. As análises nesta primeira etapa de verificação foram realizadas em simplificada.

3.4 MEIOS DE CULTURA

Para o cultivo dos pré inóculos dos microrganismos foram utilizados os meios descritos nas tabelas 3 e 4, respectivamente. O caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) foi utilizado para o crescimento das BAL e o meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) foi utilizado para o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura MRS

Componente	Concentração (g/L)
Peptona	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Dextrose	20
Polisorbato 80	1
Citrato de Amônio	2
Acetato de Sódio	5
Fosfato de Potássio	2
Sulfato de Magnésio	0,1
Sulfato de Manganês	0,05

Tabela 4 – Composição do meio de cultura YPD

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	20
Extrato de malte	10
Dextrose	20

3.5 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Os ensaios de fermentação foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, em agitador orbital, com volume útil de meio fermentativo de 125 mL, simulando condição de microaerofilia. Os Erlenmeyers foram vedados com buchas de algodão permeáveis ao oxigênio e mantidos a 150 rpm e 30 °C. Avaliou-se a fermentação em ensaios com soro de tofu, o qual foi previamente esterilizado e ajustado a pH 6,7 com NaOH, após a esterilização foi feita a centrifugação de forma estéril para a retirada de precipitados e o meio foi utilizado diretamente como fonte de carbono e nutrientes. As BAL selecionadas para os ensaios foram *L. plantarum* e *L. fermentum*, após o screening da etapa 3.3.

O inóculo foi realizado com os microrganismos selecionados no item 3.3, os quais cresceram overnight em meio de cultura MRS líquido. Após, foi feita a leitura da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro e, quando necessário, a padronização com meio MRS líquido estéril para a densidade óptica de 1,0. Em seguida, o inóculo foi centrifugado por 15 minutos, a 4 °C e 3000 × g, descartando o sobrenadante. As células centrifugadas foram ressuspensas em soro de tofu estéril e inoculadas nos Erlenmeyers contendo soro de tofu estéril. Utilizou-se volume de inóculo igual a 5 % do volume do meio de fermentação. O cultivo foi monitorado pela retirada de uma alíquota de 4 mL a cada 3 horas nas primeiras 12 horas de cultivo e, após, o mesmo volume foi retirado em diferentes intervalos até atingir o tempo final de cultivo de 48 horas. O pH das amostras foi medido e as amostras foram centrifugadas para posterior análise por CLAE. O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para a levedura *Kluyveromyces marxianus*, com meio YPD usado para o inóculo e com um tempo de cultivo de 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.5.1 Análise de crescimento celular

Para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), foram preparadas placas com meio sólido para acompanhar o crescimento dos microrganismos. Ao meio MRS (Tabela 3, adicionado de 15 g/L de ágar) foi adicionado 1,7 µL/mL de fluconazol para inibir o crescimento de qualquer tipo de levedura, a fim de avaliar o crescimento das LAB, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*.

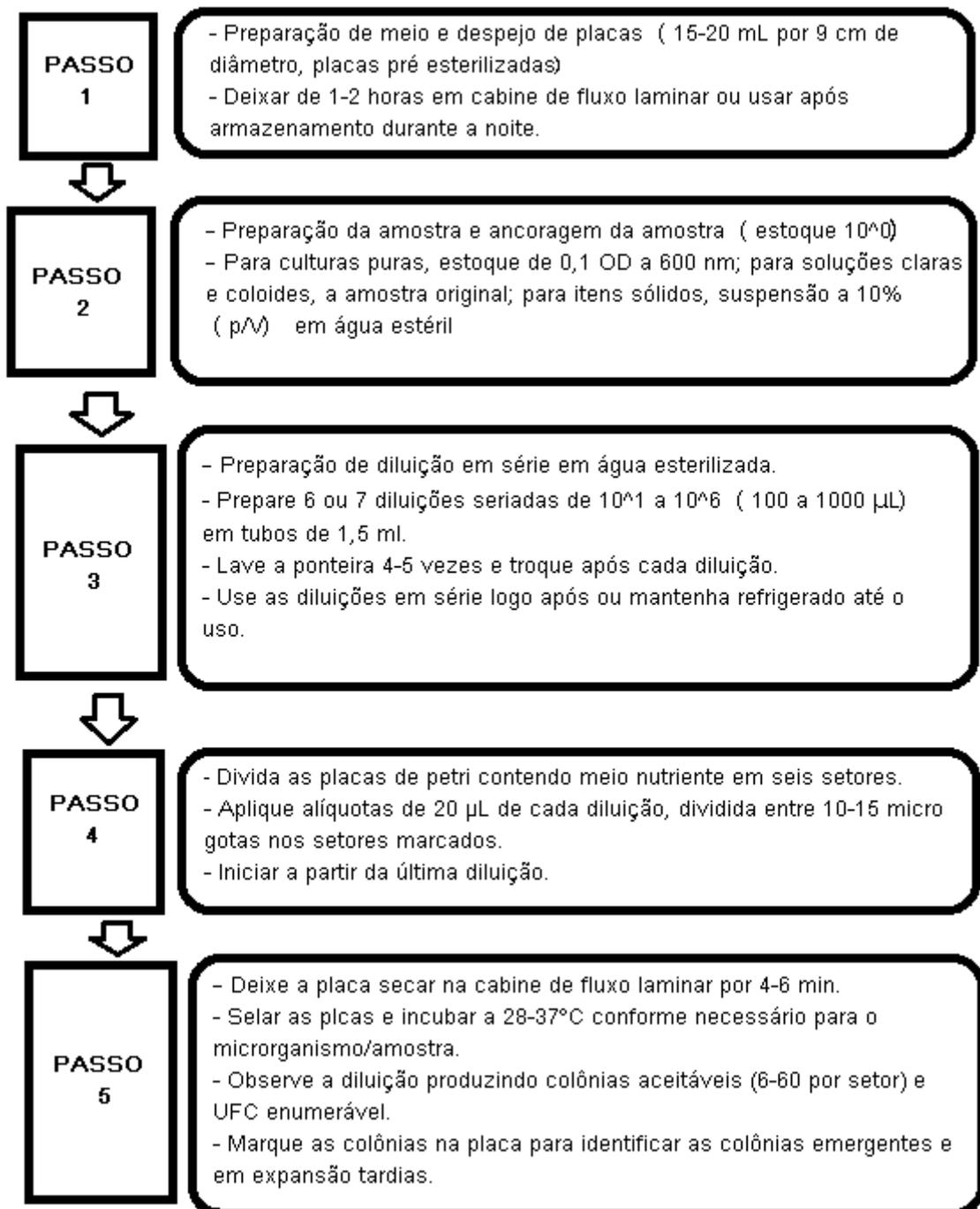
Já para a contagem das colônias formadas durante o cultivo da levedura *Kluyveromyces marxianus*, foram preparadas placas de meio sólido YPD (Tabela 4, acrescido

de 15 g/L de ágar), com 1 µL/mL de cloranfenicol para inibir o crescimento de qualquer tipo de bactéria.

A metodologia utilizada para a quantificação das unidades formadoras de colônias, procedeu-se através do método SP-SDS, *Single Plate-Serial Dilution Spotting*, adaptado de Thomas et al. (2015). A Figura 3 apresenta o procedimento realizado.

Para o plaqueamento, foi realizado diluições seriadas para cada ponto de amostra coletada. As diluições foram realizadas até 10^6 e plaqueadas em meio sólido, em duplicata. Cada placa foi dividida em seis quadrantes (10^1 a 10^6) e em cada quadrante foi plaqueado uma alíquota de 20 µL da diluição correspondente, dividida em 10 a 15 microgotas. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa, durante 72 h a 30 °C.

Figura 3 – Passo a passo de plaqueamento pelo método *Single Plate-Serial Dilution Spotting*.



Fonte: Adaptado de Piou Thomas, et al., 2015.

Para a quantificação em UFC/mL foi usada a equação 1 apresentada a seguir:

$$\text{UFC/mL} = \frac{N \times 1000 \times d}{20} \quad (1)$$

Onde: N = número de colônias contadas

d = diluição

3.6 METODOLOGIA ANALÍTICA

A concentração de produtos de fermentação (ácido lático, ácido acético e etanol) e açúcares foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando o equipamento da marca Shimadzu equipado com detector de índice de refração (RID-10A). Para a quantificação dos produtos de fermentação a coluna utilizada foi a Bio-Rad Aminex 87H, com vazão de 0,6 ml/min a 45 °C, utilizando solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM como fase móvel. Já para a quantificação do consumo de açúcares utilizou-se as condições de 85 °C e fluxo de 0,6 mL/min na coluna Bio-Rad Aminex 87C, com água ultrapura como fase móvel. As amostras coletadas do meio de fermentação foram centrifugadas a 4 °C e 3000 ×g por 15 minutos, a fim de separar as células em suspensão. O sobrenadante foi filtrado utilizando membranas de acetato de celulose (porosidade de 0,22µm; Sartorius, Alemanha). Para todas as análises por CLAE, padrões de ácido lático, ácido acético e açúcares (estaquiose, rafinose, sacarose, glicose e frutose) com pureza de cromatografia a (superior a 99,5 %) foram utilizados.

3.7 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A conversão do bioproduto de interesse foi calculada através da equação 2.

$$Y_{PS} = \frac{P}{(S_0 - S)} \quad (2)$$

Sendo:

Y_{PS} a conversão do substrato em produto (rendimento), em g/g;

P a quantidade do bioproduto de interesse formado ao final da fermentação, em g/L;

S_0 a concentração de açúcares no início da fermentação, em g/L;

S a concentração de açúcares ao fim da fermentação, em g/L.

Para o cálculo da produtividade, foi usada a equação 3.

$$Q_p = \frac{P}{t} \quad (3)$$

Sendo:

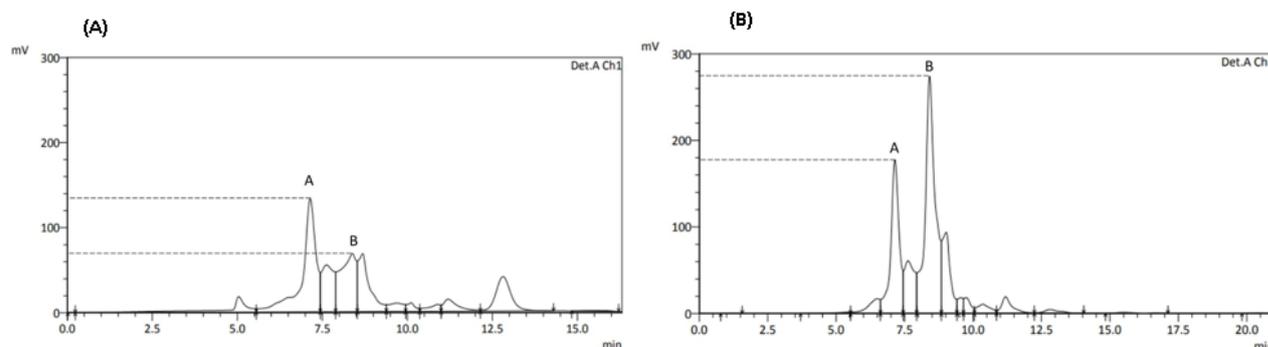
Q_p a produtividade, em g/(L.h);

t o tempo da fermentação, em h.

4.1 SORO DE TOFU

A quantificação dos açúcares presentes no soro de Tofu in natura, foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Houve uma diferença na quantificação dos açúcares presentes no soro antes e depois da autoclave, como pode-se notar na Figura 4 (a e b). A coluna Aminex HPX-87C que foi utilizada neste trabalho é ideal para a maioria das análises com açúcares como: análises de monossacarídeos e separação de dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeos.

Figura 4 — Cromatograma do soro de Tofu: (a) in natura antes da autoclave (b) depois da autoclave. As letras nos picos referem-se a (A) estaquiose e (B) sacarose.

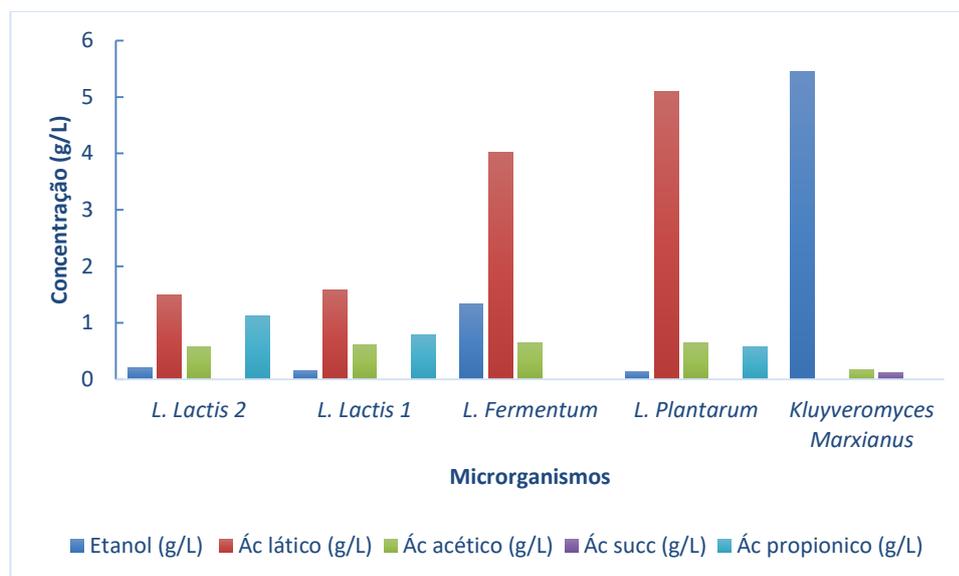


Esta diferença de quantificação dos açúcares pode-se explicar por uma possível degradação térmica. Woo et al. (2009) citam que existem duas principais reações de degradação térmica da sacarose: (1) reações de Maillard que acontecem quando há o aquecimento na presença de compostos nitrogenados e (2) caramelização que sofre grande influência do pH e concentração de sacarose e ocorre em altas temperaturas. Este fato pode explicar as diferenças observadas entre os tratamentos, os quais mostraram, principalmente, valores diferentes nos teores de sacarose em diferentes ensaios, como mostrados nos resultados ao longo do trabalho.

4.2 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

No ensaio fermentativo inicial, o objetivo foi avaliar quais das linhagens estudadas apresentariam produção dos compostos de interesse (ácido lático e etanol) tendo como fonte de carboidratos, apenas os açúcares presentes no soro de tofu in natura. O tempo de cultivo foi de 24 horas. Os resultados são apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Quantificação dos bioprodutos formados durante a fermentação.



Analisando os resultados obtidos no ensaio de fermentação das cinco linhagens, foi possível observar que *L. fermentum* e *L. plantarum* foram as linhagens que apresentaram maior produção de ácido lático, produzindo, respectivamente 4,02 g/L e 5,10 g/L e ainda outros compostos em menor quantidade, como etanol e ácido acético. Já a levedura *K. marxianus* foi o microrganismo responsável pela maior produção de etanol, produzindo no ensaio de 24 horas 5,45 g/L, além de também produzir em menores concentrações ácido acético e ácido succínico. Com base na produção dos metabólitos, os microrganismos *L. fermentum*, *L. Plantarum* e *K. marxianus* foram selecionados para a próxima etapa do trabalho.

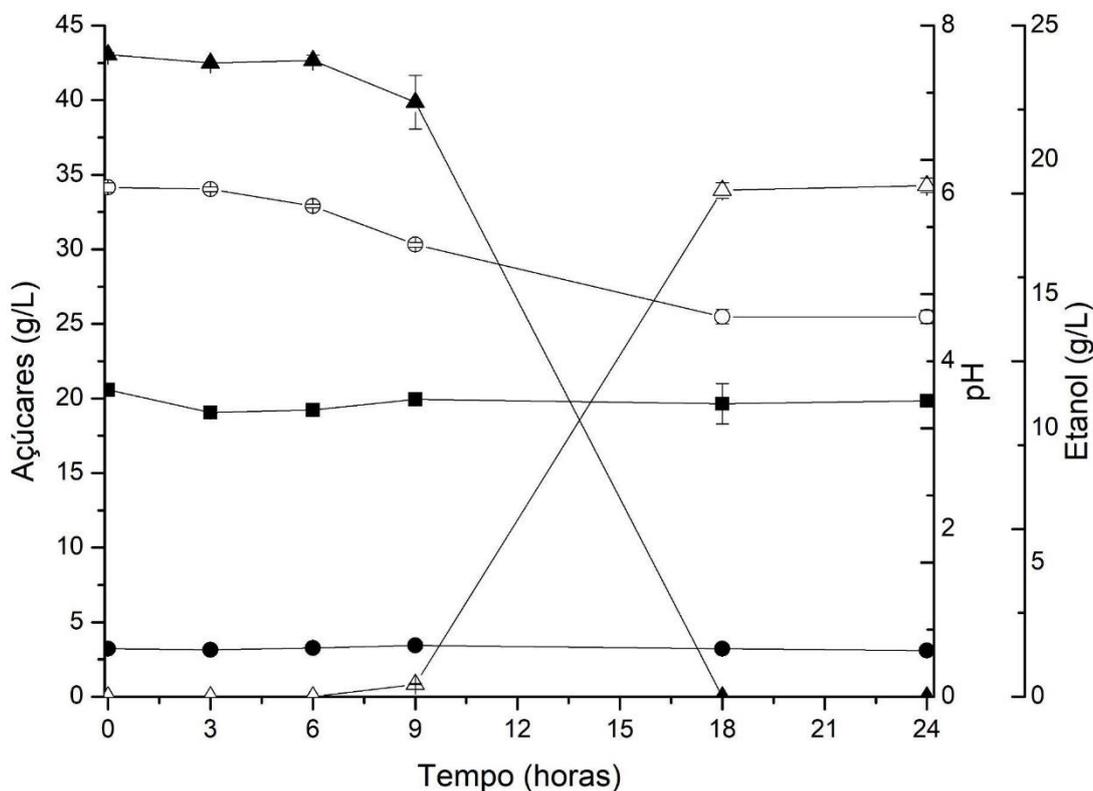
O consumo de açúcares não foi avaliado nesta etapa. As análises cromatográficas do soro in natura e de algumas amostras ao longo do trabalho, foram dificultadas em relação às técnicas cromatográficas e uso de equipamentos.

4.3 CINÉTICA *Kluyveromyces marxianus*

Visando estudar o comportamento da levedura *Kluyveromyces marxianus* durante a sua fermentação no meio de soro de tofu, foi realizada a cinética durante o tempo de 24 horas com retirada de alíquotas em intervalos de tempo determinados, com o objetivo de se estabelecer os parâmetros cinéticos.

Com a análise dos resultados, foi possível observar que a *Kluyveromyces marxianus* produziu uma quantidade significativa de etanol e em menor quantidade outros bioprodutos (Apêndice A.1). Dos açúcares presentes no soro de tofu, a levedura foi capaz de consumir apenas a sacarose, enquanto os demais açúcares presentes, como estaquiose e rafinose, mantiveram sua concentração até o final do cultivo. A cinética do ensaio em duplicata está apresentada na Figura 6.

Figura 6 – Cinética do consumo de açúcares e produção de etanol em soro de tofu com a levedura *Kluyveromyces marxianus*. (-■-) estaquiose, (-●-) rafinose, (-▲) sacarose; (-○-) pH, (-△) Etanol.



O fato de o microrganismo em estudo ter consumido apenas a sacarose durante o seu processo de fermentação, pode ser explicado pelo fato da sacarose ser um dissacarídeo, possuindo uma estrutura mais simples quando comparada aos outros açúcares presentes, rafinose e estaquiose. A rafinose é um trissacarídeo formado de galactose, frutose e glicose pode ser encontrado no feijão, repolho, brócolis, aspargo, couve-de-bruxelas, outras hortaliças e grãos integral, já a estaquiose é um tetrassacarídeo consistido de duas unidades de α -D galactose, uma unidade de α -D-glicose e uma unidade de β -D-frutose sequencialmente ligados como gal ($\alpha 1 \rightarrow 6$) gal ($\alpha 1 \rightarrow 6$) glc ($\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$). Microrganismos como um todo, tem preferência por açúcares mais simples. É possível que em um maior tempo de cultivo, açúcares mais complexos viessem a ser consumidos. Para metabolizar esses açúcares mais complexos, é preciso que o microrganismo produza enzimas específicas para isto, como a α -galactosidase.

A enzima α -Galactosidase (α -Gal), também chamada de α -D-galactosídeo galactohidrolase (E.C. 3.2.1.22) ou de melibiase, catalisa a hidrólise de ligações α - (1,6)-galactosídicas, causando a liberação de α -D-galactose (DU et al., 2013). Estas ligações são encontradas em oligossacarídeos, sendo os mais comuns a estaquiose e a rafinose, oligossacarídeos indesejáveis, muito presentes em derivados de soja.

Entre os substratos que permitem o crescimento desses microrganismos, estão ainda polissacarídeos tais como inulina, xilana e pectina, que são degradados por enzimas extracelulares. A lactose é um outro substrato passível de utilização, mas, neste caso, sua utilização é intracelular (Espinoza et al., 1992).

Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros cinéticos do ensaio de fermentação da levedura e seu rendimento e produtividade em relação à produção de etanol.

Como podemos observar nos resultados apresentados na Tabela 5, a levedura apresentou altos valores de rendimento e produtividade.

Tabela 5 – Parâmetros de consumo de sacarose e rendimento da produção de etanol. Os cálculos foram realizados com pontos de 24 horas.

Meio de cultivo	Sacarose consumida (%)	Etanol (g/L)	Y_{PS} (g/g)	Q_P [g/(L.h)]
Soro de Tofu	100,00	19,05	0,44	0,79

Vale ser destacado que, mesmo em menor quantidade, houve a produção de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo (Apêndice A.1), o que refletiu na diminuição do pH do meio, conforme observado na Figura 6.

4.4 CRESCIMENTO CELULAR *Kluyveromyces marxianus*

O crescimento celular foi acompanhado através do método SP-SDS, *Single Plate-Serial Dilution Spotting* (Pious Thomas, et al., 2015) descrito no item 3.5.1. A Figura 7 apresenta a cinética de crescimento celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* durante 24 horas de cultivo. A Figura 8, representa uma placa exemplificando como foi realizado o método de contagem.

Figura 7 – Crescimento celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* durante ensaio de fermentação em meio soro de Tofu. (-■-) UFC, (-▲) sacarose, (-△) Etanol.

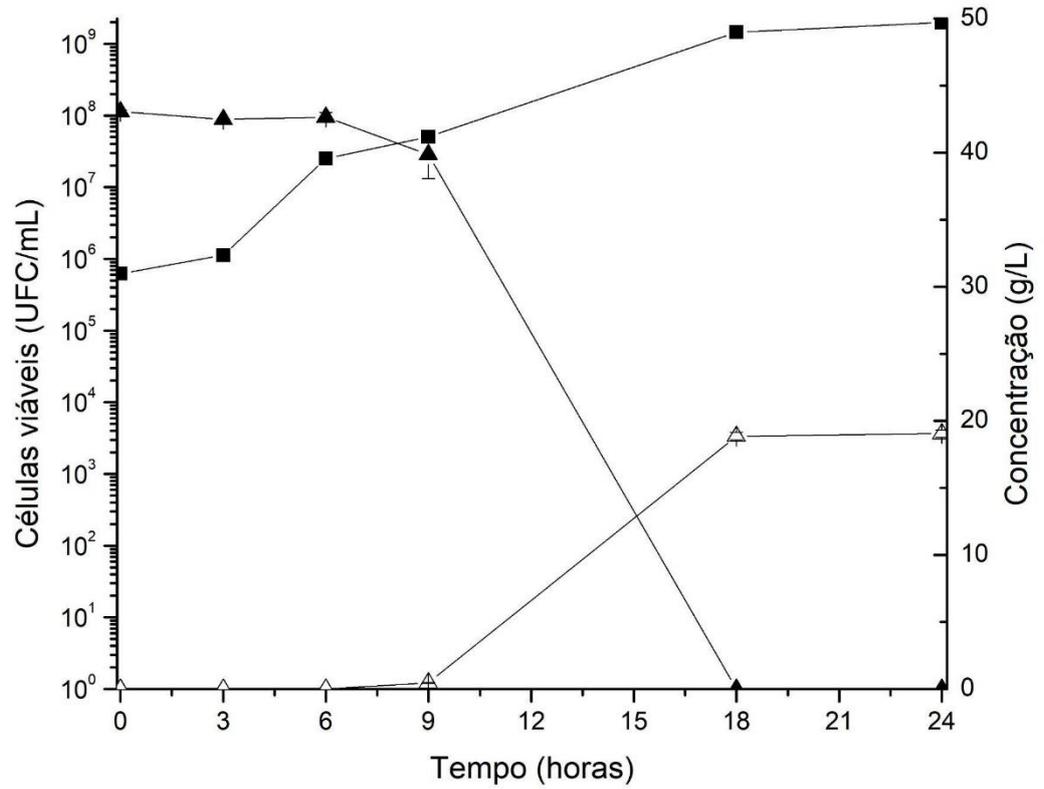
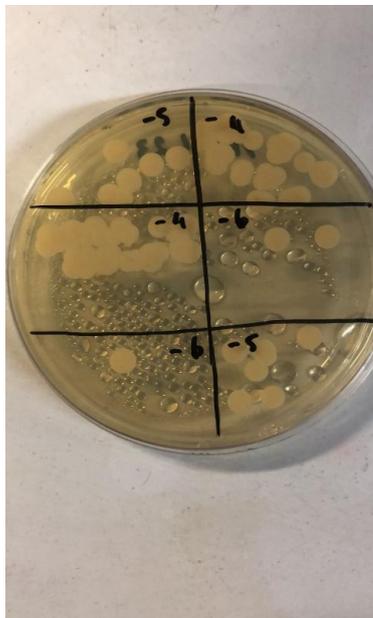


Figura 8 – Placa de meio YPD sólido, contendo colônias de *Kluyveromyces marxianus*. Os quadrantes mostram as diluições que foram utilizadas.



Através do resultado apresentado na Figura 7, observou-se que mesmo com a diminuição do pH do meio devido a sua acidificação, o meio soro de tofu proporcionou um ambiente rico em nutrientes para que o microrganismo conseguisse se desenvolver. Além disso, pode-se verificar que quando houve o completo consumo do açúcar a levedura entrou em sua fase estacionária em 18 horas de cultivo, evidenciando a depleção de fonte de carbono para o microrganismo. Conforme apresentado também na Figura 7, a produção de etanol acompanha a cinética de crescimento celular, mostrando-se como um produto associado ao crescimento.

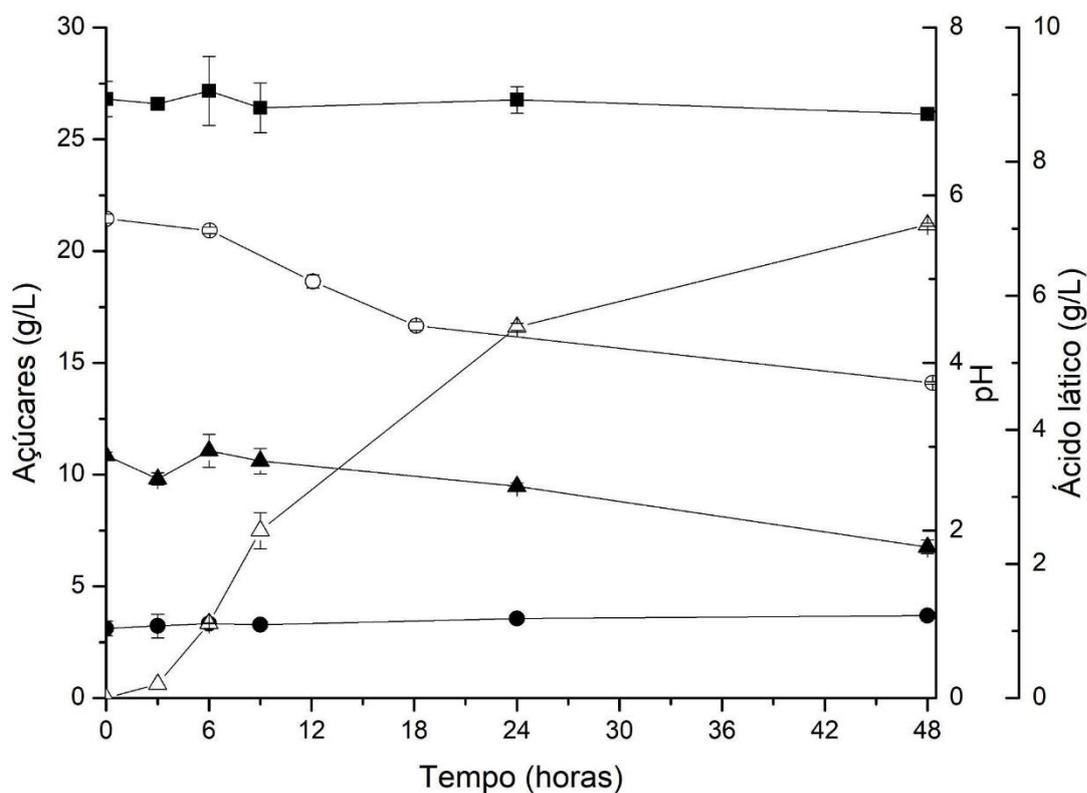
Chu et al., (2018) em seu estudo, utilizaram cinco leveduras não-*Saccharomyces* disponíveis comercialmente (*Torulaspora delbrueckii*; *Lachancea thermotolerans*; *Metschnikowia pulcherrima*; *Pichia kluyveri* e *Williopsis saturnus*) na fermentação do soro de tofu e cada uma das leveduras mostrou cinética de crescimento e desempenho de fermentação diferentes. *T. delbrueckii* e *L. thermotolerans* consumiram a sacarose suplementada e produziram 6-7% (v/v) de etanol, enquanto *M. pulcherrima*, *P. kluyveri* e *W. saturnus* utilizaram apenas a frutose e glicose endógenas, produzindo níveis vestigiais de etanol. Os autores mostram também que a rafinose foi completamente consumida por todas as leveduras, mostrando que continham α -galactosidase para hidrolisar a ligação glicosídica

α -1,6 entre galactose e glicose. Estes resultados mostram a diferença entre as leveduras, já que no presente estudo com *Kluyveromyces marxianus*, a rafinose não foi utilizada.

4.5 CINÉTICA *Lactobacillus plantarum*

Para o acompanhamento do comportamento do *Lactobacillus plantarum* durante o curso da fermentação, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempos predeterminados para estabelecer parâmetros cinéticos do seu cultivo. O ensaio durou 48 horas e seus resultados são apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Cinética do consumo de açúcares e produção de ácido lático em soro de tofu com a bactéria *Lactobacillus plantarum*. (-■-) estaquiose, (-●-) rafinose, (-▲-) sacarose; (-○-) pH, (-△) Ác lático.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, podemos notar que *Lactobacillus plantarum*, apresentou uma produção significativa de ácido láctico, 7,06g/L em 48 horas de fermentação. Entretanto, não obteve nenhuma produção de etanol (Apêndice A.2), mesmo sendo uma bactéria heterofermentativa. Produziu ainda pequenas concentrações de outros ácidos orgânicos, como o ácido acético e o propiônico, mostrando-se produtora, quase que unicamente, de lactato.

Segundo Kandler e Weiss (1986) nesse tipo metabólico as hexoses são convertidas quase exclusivamente em ácido láctico pela via Embdem-Meyerhof, sendo que 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico.

No progresso da fermentação, é possível observar também uma diminuição do pH. Fato este, que caracteriza a atividade antimicrobiana das bactérias ácido lácticas. O efeito antimicrobiano das BAL é devido, principalmente, à produção de ácido láctico e de outros ácidos orgânicos, fazendo com que o pH do ambiente de crescimento diminua (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). O pH baixo induz a que os ácidos orgânicos tornem-se lipossolúveis e que se difundam através da membrana celular para o citoplasma (SILVA, 2012).

Este grupo bacteriano pode também produzir acetaldeído, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, polissacarídeos e bacteriocinas, os quais podem atuar como agentes antimicrobianos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; RODRÍGUEZ, 2003).

Os ácidos orgânicos, tais como o ácido láctico, ácido acético e propiônico, interferem na força protón motiva e nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática bacteriana (DAVIDSON; PARISH, 1989). A produção de peróxido de hidrogênio deve-se à carência da enzima catalase nas BAL (FORSYTHE, 2002). Este composto pode causar a oxidação da membrana (LINDGREN; DOBROGOSZ, 1990), além de ativar o sistema de lactoperoxidase no leite fresco, causando a formação do hipotiocianato, um agente antimicrobiano (FORSYTHE, 2002).

Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros de consumo de sacarose, bem como o rendimento e produtividade em relação a produção de ácido láctico.

Tabela 6 - Parâmetros de consumo de sacarose, rendimento e produtividade da produção de ácido láctico. Os cálculos foram realizados com pontos de 48 horas.

Meio de cultivo	Sacarose consumida (%)	Ác láctico g/L	Y_{PS} (g/g)	Q_p [g/(L.h)]
Soro de tofu	37,71	7,06	1,73	0,15

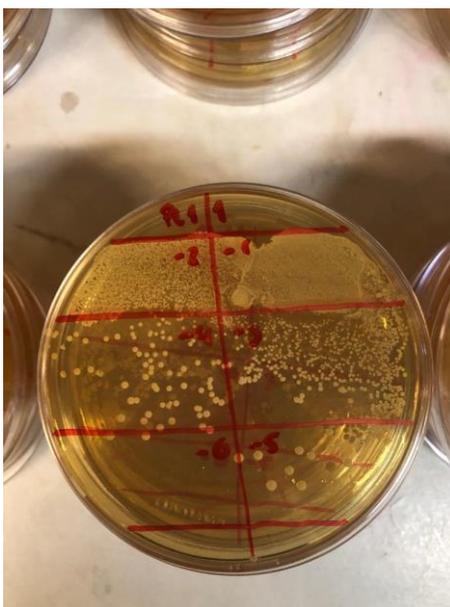
Para os cálculos de rendimento e produtividade foram usadas as equações 2 e 3 respectivamente, sendo P a quantidade de ácido láctico produzida ao final da fermentação.

Foi possível observar que, apesar de uma produção significativa de ácido láctico, o microrganismo apresentou um consumo mais lento de sacarose, consumindo apenas 37,71 % deste açúcar durante o ensaio de 48 horas e nenhum consumo dos demais açúcares presentes, rafinose e estaquiose. Observa-se também um rendimento elevado, apesar do baixo consumo de açúcar. Este fato, pode estar ligado as análises de sacarose, os quais sofreram um decréscimo em comparação ao ensaio com a levedura que apresentou valor de sacarose acima de 40 g/L. A diferença entre os experimentos pode estar relacionada a etapa de centrifugação. Nos experimentos com BAL não foi realizada a centrifugação do meio após a autoclave, diferentemente do meio de soro de tofu para a levedura. A precipitação das proteínas e posterior centrifugação pode, de alguma maneira, alterar a quantidade de açúcares presentes no meio. Outra explicação pode estar relacionada a problemas na quantificação dos açúcares.

4.6 CRESCIMENTO CELULAR *Lactobacillus plantarum*

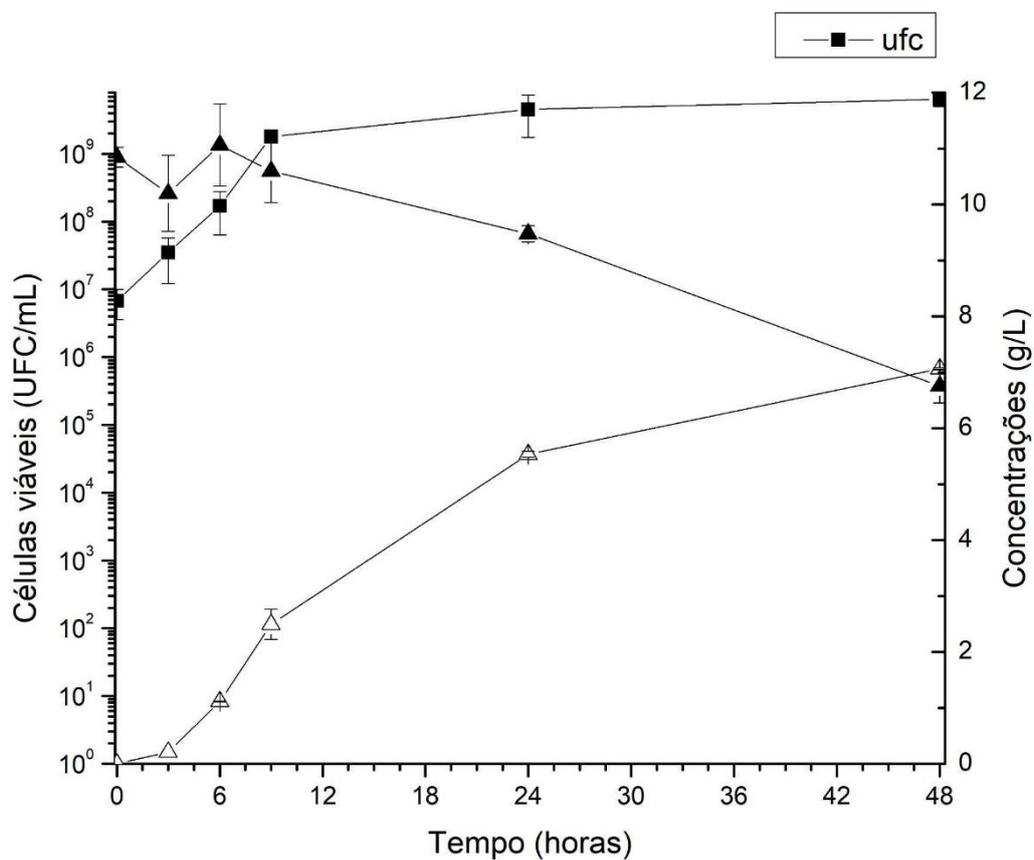
A análise do crescimento celular foi acompanhada através do método de plaqueamento em meio MRS sólido conforme descrito no tópico 3.5.1. Um exemplo do crescimento das colônias de *Lactobacillus plantarum* é apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Placa de meio MRS sólido, contendo colônias de *Lactobacillus plantarum*



A evolução do número de colônias durante as 48 horas de ensaio, pode ser acompanhada na Figura 11.

Figura 11 - Crescimento celular da bactéria *Lactobacillus plantarum* durante ensaio de fermentação em meio soro de Tofu. (-■-) UFC, (-▲) sacarose, (-△) Ác lático.



Com base nos resultados demonstrados na Figura 11, o soro de tofu apresenta-se como um meio viável para o crescimento do microrganismo. Observou-se que a partir de 3 horas houve um crescimento significativo de colônias. Este crescimento ocorreu justamente no tempo em que a bactéria apresentou um maior consumo de sacarose conforme demonstrado nas Figuras 9 e 11.

No tempo 48 horas, o *L. plantarum* ainda apresentava uma tendência de crescimento celular, visto que a sacarose presente no meio ainda não havia sido completamente consumida e, portanto, ainda havia fonte de carbono disponível no meio de cultura.

Segundo diferentes autores, os parâmetros de crescimento podem sofrer alterações devido a uma série de fatores, entre eles tem-se a variação no tamanho do inóculo que pode causar alterações na duração da fase lag, período variável onde não há aumento significativo da população, e na velocidade específica máxima de crescimento, dependendo do método de quantificação celular utilizado (Duffy et al., 1994; Gay; Cerf; Davey, 1996; Baranyi, 1998; Baranyi e Pin, 1999; Augustin; Rosso; Carlier, 2000).

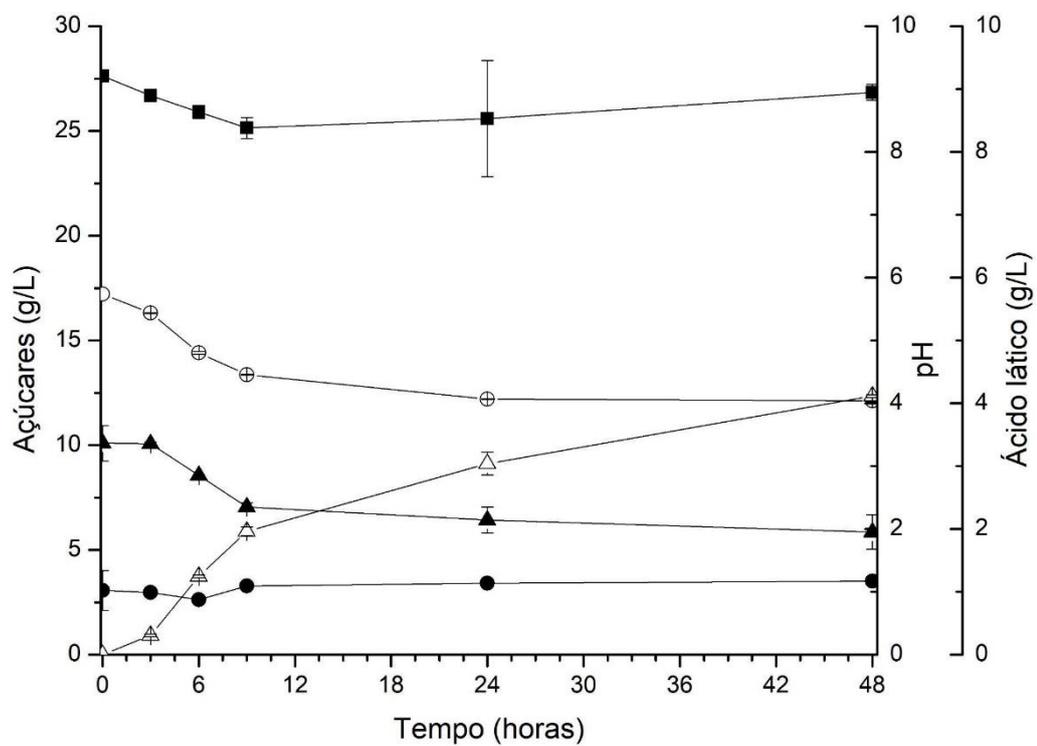
Smelt, Otten e Bos (2002) utilizaram o método de citometria de fluxo e verificaram que o tamanho do inóculo interfere na duração da fase lag de *L. plantarum*. Kaprelyants e Kell (1996) afirmaram que a duração da fase lag é inversamente proporcional ao tamanho do inóculo em alguns casos.

4.7 CINÉTICA *Lactobacillus fermentum*

O acompanhamento do cultivo da *L. fermentum* foi realizado da mesma forma que o descrito no item 4.5 para a *L. plantarum*. Alíquotas foram retiradas em intervalos determinados de tempo para que fosse possível estabelecer os parâmetros cinéticos do seu cultivo.

O ensaio durou 48 horas e os resultados da sua cinética são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Cinética do consumo de açúcares e produção de bioprodutos em soro de tofu com a bactéria *Lactobacillus fermentum*. (-■-) estaquiose, (-●-) rafinose, (-▲-) sacarose; (-○-) pH, (-△) Ác lático.



Conforme podemos observar na Figura 12, o *L. fermentum* apresentou uma produção significativa de ácido láctico (4,12 g/L) em 48 horas de cultivo. Produziu também, em menor quantidade, outros ácidos orgânicos, tais como ácido succínico e ácido acético.

Timbutam, Sriroth e Tokiwa (2006) estudaram o efeito de diferentes concentrações de caldo de cana (3 e 13%) utilizado como fonte de carbono. Os pesquisadores verificaram que quanto mais sacarose está presente no meio maior é a concentração de ácido láctico final. A produção máxima de ácido láctico alcançada por estes autores empregando *Lactobacillus sp.* linhagem FCP2, 150rpm, 40°C, foi de 104g/L de ácido láctico em caldo de cana a 13% (125g/L de sacarose, 8g/L de glicose e 6g/L de frutose).

Haully, Oliveira e Oliveira (2003) utilizaram melão de cana-de-açúcar 10% (m/V) enriquecido de extrato de levedura 2% (m/V) e peptona 4% (m/V) para a obtenção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em condições descontínuas. Os pesquisadores verificaram que o meio de cultivo utilizado produziu 30,5g/L de ácido láctico e que o meio MRS considerado referência produziu 32g/L. Nesta pesquisa, onde apenas o soro de tofu in natura foi utilizado como meio de cultivo, a obtenção de ácido láctico ficou bem abaixo desses valores, muito provavelmente pela incapacidade do *L. fermentum* de conseguir utilizar de forma efetiva os carboidratos presentes no meio, comparado ao melão de cana, onde possui açúcares mais facilmente assimiláveis

Como era esperado, por ser uma bactéria heterofermentativa, o *L. fermentum* foi capaz de produzir pequenas concentrações de etanol (Apêndice A.3), utilizando apenas o substrato presente no soro de tofu.

Tal grupo apresenta a característica de se comportar como heterofermentativa (produzindo acetato e etanol) quando em condições de limitação de açúcares (KANDLER & WEISS, 1986). Dessa forma, na fase final de crescimento, em um maior tempo de cultivo, com limitação de sacarose no meio, *L. fermentum* poderia ter dirigido o seu metabolismo para a produção de acetato e etanol, conjuntamente ao lactato, o que proporcionaria uma maior concentração final de etanol e ácido acético. Assim como nos cultivos citados anteriormente, é notável a diminuição do pH durante o tempo de ensaio, devido a produção de ácidos durante seu processo de fermentação.

Os parâmetros de consumo dos açúcares e os valores de rendimento e produtividade em relação à produção de ácido láctico durante o cultivo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de consumo de sacarose, rendimento e produtividade da produção de ácido láctico. Os cálculos foram realizados com pontos de 48 horas.

Meio de cultivo	Sacarose consumida (%)	Ác láctico (g/L)	Y_{PS} (g/g)	Q_P [g/(L.h)]
Soro de tofu	42,07	4,12	0,97	0,09

Assim como no item 4.5, para o cálculo de rendimento e produtividade foram usadas as equações 2 e 3 respectivamente, sendo o parâmetro P a quantidade de ácido láctico produzida durante a fermentação da *L. fermentum*.

A concentração de rafinose e estaquiose permaneceram inalteradas durante todo cultivo.

4.8 CRESCIMENTO CELULAR *Lactobacillus fermentum*

Assim como para a *K. marxianus* e para a *L. plantarum*, para o acompanhamento do crescimento celular foi usado o método SP-SDS, sendo todos os pontos retirados durante as 48 horas, plaqueados em meio MRS sólido e mantidos em estufa por 72 horas. Um exemplo do crescimento de colônias em placas é apresentado na Figura 13.

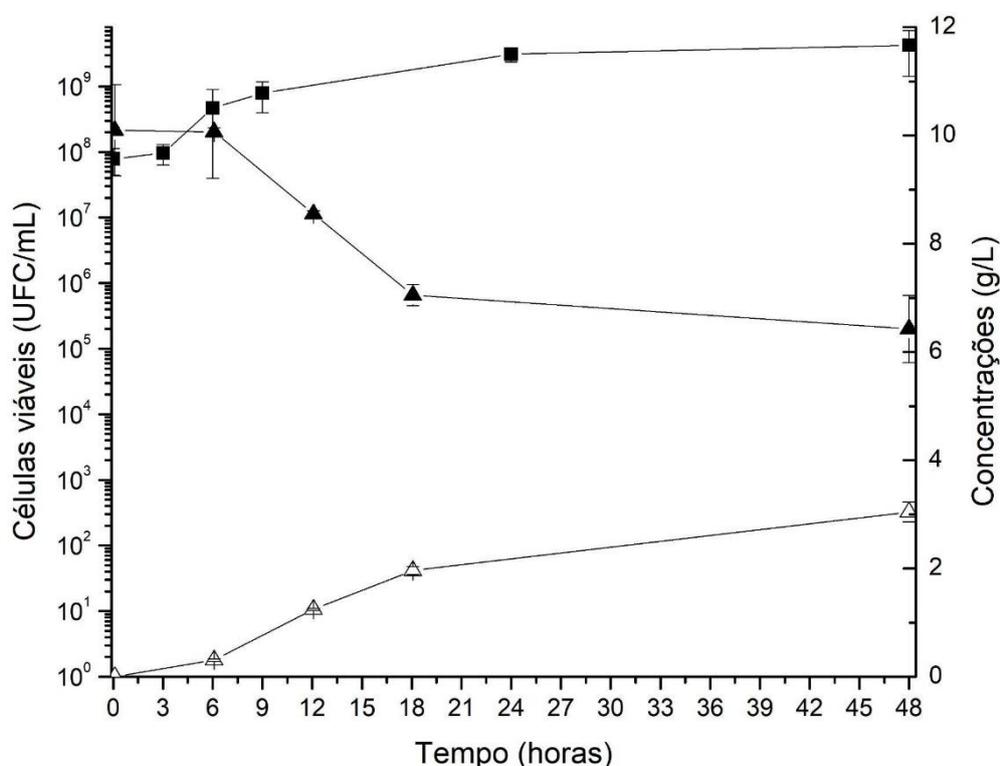
Como observado na Figura 13, houve um espalhamento na placa, o que pode ser explicado pela alta concentração de células nestas diluições, impossibilitando a contagem. Devido a isso que no método utilizado são usadas seis diluições a cada ponto, dessa forma é possível que a contagem seja realizada na diluição de melhor visualização.

Figura 13 - Placa de meio MRS sólido, contendo colônias de *Lactobacillus fermentum*



O desenvolvimento de colônias em função do tempo, juntamente com a produção de ácido láctico e o consumo de sacarose é apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Crescimento celular da bactéria *Lactobacillus fermentum* durante ensaio de fermentação em meio soro de Tofu. (-■-) UFC, (-▲) sacarose, (-△) Ác láctico.



De acordo com os resultados expostos na Figura 14, a *L. fermentum* apresentou um crescimento rápido e satisfatório, sendo entre 3 e 12 horas sua mais alta taxa de crescimento, encontrando-se na fase exponencial, momento em que também houve maior consumo de sacarose, conforme apresentado na Figura 12.

Apresentou ainda uma fase lag curta, entre o tempo 0 e 3 horas, o que demonstra uma boa e rápida adaptação ao meio soro de tofu.

Ainda, uma tendência de estabilização começa a aparecer entre o tempo de 24 e 48 horas. Se o tempo de cultivo fosse mais longo, acredita-se que esta tendência se acentuasse cada vez mais, conforme a sacarose presente no meio fosse se esgotando.

5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

L. plantarum mostrou-se capaz de produzir principalmente ácido láctico com bons valores de rendimento e alguns outros ácidos orgânicos em menor quantidade a partir do meio soro de tofu, consumindo parcialmente a sacarose e não apresentando alterações nas concentrações de rafinose e estaquiose. Apresentou ainda, uma boa taxa de crescimento celular durante seu cultivo.

L. fermentum foi capaz de produzir ácido láctico, porém com valores de rendimento mais baixos comparados ao *L. plantarum*. Ao mesmo tempo, pequenas concentrações de outros ácidos orgânicos e de etanol foram produzidas. Em relação aos açúcares, a sacarose presente no meio foi parcialmente consumida, enquanto os açúcares, rafinose e estaquiose não foram metabolizados.

Em relação a levedura *K. marxianus*, valores irrisórios de ácido láctico foram produzidos. A produção de etanol durante o cultivo no soro de tofu foi considerada satisfatória, com ótimos valores de rendimento e produtividade, quando comparados com outros métodos já solidificados dentro da indústria para a obtenção de bioetanol, como através da cana de açúcar. A sacarose foi totalmente metabolizada, no entanto os açúcares, rafinose e estaquiose não foram consumidos. Apresentou também uma elevada taxa de crescimento celular.

De uma maneira geral, foi possível responder todos os objetivos citados no início do trabalho. Cinco microrganismos tiveram sua produção de ácido láctico e etanol avaliada, selecionando-se os que apresentaram um maior potencial de produção dos compostos, para que assim a sua cinética fosse estudada. Avaliou-se ainda a cinética de crescimento dos três microrganismos selecionados. *L. plantarum*, *L. fermentum* e *K. marxianus* apresentaram ótimos resultados de produção de compostos de interesse e de crescimento celular, usando apenas soro de Tofu como fonte de carbono e energia.

Fazendo uma comparação entre os três microrganismos citados neste estudo, a levedura *K. marxianus* apresenta-se como o mais promissor em relação à produção de biocompostos através de vias biotecnológicas. Além de ter consumido toda a sacarose presente no soro de Tofu, teve uma boa taxa de crescimento celular e ainda apresentou uma

grande produção de etanol, destacando-se como alternativa para a produção em larga escala de combustível limpo e renovável. O bioetanol tem representado no Brasil importante papel econômico, social e ambiental, com estudos e políticas de sua expansão no país e para o resto do mundo, visando substituir a gasolina.

Para projetos futuros, é necessário conhecer melhor o mecanismo de fermentação desses microrganismos, para modificar o processo de modo que se consiga um consumo satisfatório dos outros açúcares presentes no meio, como rafinose e estaquiase. Uma ideia para isto, seria testar um maior tempo de cultivo. Sugere-se também um cultivo com soro de tofu modificado, suplementado de sacarose ou até mesmo outros dissacarídeos, para aumentar a produtividade dos bioprodutos de interesse. Além disso, pode-se realizar o mesmo tipo de ensaio, porém com outros tipos de microrganismos capazes de gerar ácido láctico, etanol ou outro bioproduto de valor comercial. Estratégias de co-cultivo também podem ser alternativas para obtenção de melhores resultados em bioprocessos utilizando soro de tofu como substrato.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 09 jan. 2002.

ANTONELLI, Jhonatas et al. Produção de biogás por digestão anaeróbia do soro de leite. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, pp. 463-467, 2016. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/16405>. Acesso em: 05 de agosto de 2022.

AZAMBUJA, Alceu Alves. **Fermentação de Lactobacillus plantarum em soro de tofu para produção de exopolissacarídeos**. 2014. 74 f. Orientador: Márcio José Rossi. TCC (Graduação) - Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/132763?show=full>. Acesso em: 05 de agosto de 2022.

BARBOSA, F. H. F. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de Bifidumbacterium bifidum BB12 e Bifidumbacterium bifidum longun BB46. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 1: 2, 2001. Disponível em: <http://joaootavio.com.br/bioterra/workspace/uploads/artigos/bacterias-5155dd6cb4f2c.pdf>. Acesso em: 06 de agosto de 2022.

BELEM, M. A. F. et al. Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of Kluyveromyces marxianus grown on whey. **J. Food Sci.** 62, p. 851–857, 1997. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15470.x>. Acesso em: 11 de agosto de 2022.

BENASSI, De Toledo, Alice. Seleção de cultivares de soja para produção de tofu, de acordo com as características físicas, químicas, nutricionais e sensoriais do produto. (2007). Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/915192/1/benassi.pdf>. Acesso em: 11 de agosto de 2022.

BINETTI, A. et al. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. **J. Appl. Microbiol.** 115:434–444, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23600736/>. Acesso em: 11 de agosto de 2022.

BOLLA, P. A., et al. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. **J. Dairy Res.** 78, p. 15–22, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20822567/>. Acesso em: 04 de agosto de 2022.

BOONTIM, N. et al. Production of L-Lactic Acid by Thermotolerant Lactic Acid Bacteria. **Chiang Mai Journal of Science**. v. 45, n. 1, p. 68-76, 2018. Disponível em: <http://cmuir.cmu.ac.th/handle/6653943832/58331>. Acesso em: 19 de setembro de 2022.

CAILLOT, Vanessa Alueth. **Avaliação do potencial de produção de biogás dos resíduos da suinocultura codigeridos com resíduos agricultura brasileira**. 2017. 84 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2386/1/PG_PPGEP_M_Cailot%2C%20Vannessa%20Alueth_2017.pdf. Acesso em: 26 de setembro de 2022.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. Campinas: Centro de Referência em Informação Ambiental, 2010. Disponível em: http://www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/mct_recursos_biologicos.pdf. Acesso em: 07 de setembro de 2022.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food Fermentation: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 50, p. 131-149, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160599000823>. Acesso em: 15 de setembro de 2022.

CARVALHO, Carolina; BESSA, Martha. As bactérias ácido láticas no contexto da biotecnologia. **MilkPoint -ILCT/EPAMIG**, 5 jan. 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/ilctepamig/as-bacterias-acido-laticas-no-contexto-da-biotecnologia-228500/>. Acesso em: 15 set. 2022.

CASSINI, T. S. (Coord). Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogás. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, 2003. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/images/apoio-e-financiamento/historico-de-programas/prosab/ProsabStulio.pdf>. Acesso em: 16 set. 2022.

CHUA, Jian-Yong; LIU, Shao-Quan. Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, pp. 24-32, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.016>. Acesso em: 15 set. 2022.

CHUA, Jian-Yong; LU, Yuyun; LIU, Shao-Quan. Evaluation of five commercial non-Saccharomyces yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage. **Food microbiology**, v. 76, p. 533–542, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.016>. Acesso em: 27 ago. 2022.

COELHO, L. F. et al. LACTIC ACID PRODUCTION BY NEW Lactobacillus plantarum LMISM6 GROWN IN MOLASSES: OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 27-36, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/tGGrHrWWGd9k7c9Y5MHhX6B/?lang=en>. Acesso em: 19 set. 2022.

COGHETTO, Chaline Caren. **IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 EM SUPORTE INORGÂNICO**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões—URI—Campus de Erechim, Erechim, RS, Brasil, junho de 2011. Disponível em: https://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2143.pdf. Acesso em: 16 set. 2022.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O.. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, 8, 487-490, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694698000739>. Acesso em: 22 ago. 2022.

CONCEIÇÃO, E. dos S. da; SILVA, M. da C.; VASCONCELOS, M. I. L. Benefícios da utilização de bifidobactérias e lactobacilos no tratamento da colite ulcerativa: uma revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 260–265, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/31849>. Acesso em: 20 set. 2022.

CUI, Z. et al. Breeding specialty soybeans for traditional and new soyfoods. In: LIU, K. (Ed.) Soybeans as functional foods and ingredients. **Champaign: AOCS Press**, p. 290-295. 2004. Disponível em: <https://publications.csiro.au/rpr/pub?list=BRO&pid=procite:e2c6e6c8-643c-4af4-a44f-48f2d019969d>. Acesso em: 16 set. 2022.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, Chicago, v.43, n.1, p.148-155, 1989.

DANIELS, Juliano **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TOFU DEFUMADO**. 2015. 95 f. Orientadora: Neusa Fátima Siebel. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, 2015. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1105/1/LD_PPGTAL_M_Daniels%2C%20Juliano_2015.pdf. Acesso em: 27 set. 2022.

DIAS et al. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir contra *Staphylococcus aureus*. In: **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, RS, 2018. Disponível em: <https://www2.ufrb.edu.br/kefirdoreconcavo/images/artigos/artigo04.pdf>. Acesso em: 26 set. 2022.

D'SOUZA, Aloysius L. et al. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 324, n. 7350: 1361, 2020. Disponível em: [doi:10.1136/bmj.324.7350.1361](https://doi.org/10.1136/bmj.324.7350.1361). Acesso em: 19 set. 2022.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja. **Soja: Histórico no Brasil**. 201?. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia#:~:text=No%20final%20da%20d%C3%A9cada%20de,ver%C3%A3o%2C%20em%20sucesso%C3%A3o%20ao%20trigo..> Acesso em: 27 set. 2022.

FABRE, C. E. et al. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnol. Lett.** 17:1207–1212, 1995. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00128387>. Acesso em: 16 set. 2022.

FARNWORTH, ER. 2005. Kefir: a complex probiotic. **Food Sci. Technol. Bull.** 2:1–17. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/241728299_Kefir_-_A_complex_probiotic. Acesso em: 16 set. 2022.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf Acesso em: 22 ago. 2022.

FONSECA, G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 79:339–354, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18427804/>. Acesso em: 27 ago. 2022.

FEI, Yongtao et al. Investigation on the safety of *Lactobacillus amylolyticus* L6 and its fermentation properties of tofu whey. **LWT**, v. 84, p 314-322, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.072>. Acesso em: 15 set. 2022.

FERREIRA, Iara et al. Evaluation of potentially probiotic yeasts and *Lactiplantibacillus plantarum* in co-culture for the elaboration of a functional plant-based fermented beverage. **Food research international**, v. 160, 111697, Ottawa, Ontario, Canadá, 2022. Disponível em: [doi:10.1016/j.foodres.2022.111697](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111697). Acesso em: 15 de set. 2022.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia de Segurança dos Alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5698538/mod_resource/content/1/Microbiologia%20da%20Seguranca%20dos%20Alimentos%20-%20Stephen%20J.pdf. Acesso em: 20 set. 2022.

FRANCO, B. D. G de M., & LANDGRAF, M.. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. 4, 48-60, 2008.

FRANÇA, R. C. et al. Reaproveitamento do Caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) para Cultivo de *Pichia pastoris*. In: **XIX CIC - XII ENPOS - II Mostra Científica**, 2010, Pelotas. Disponível em: https://www2.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CA/CA_01336.pdf. Acesso em: 13 ago. 2022.

FREIRE, T. T. et al. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, e513101119964, 2021 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19964>. Acesso em: 14 ago 2022.

GROSSMANN, Lutz; MCCLEMENTS, David Julian. The science of plant-based foods: Approaches to create nutritious and sustainable plant-based cheese analogs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, parte A, p. 207-229, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.004>. Acesso em: 14 ago. 2022.

HAULY, M.C. de O.; OLIVEIRA, A.R. de.; OLIVEIRA, A.S. de. Lactic acid production by *Lactobacillus curvatus* in sugarcane molasses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 133-142, 2003. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012054954>. Acesso em: 20 ago. 2022.

HOU, H.J.; CHANG, K.C.; SHIH, M.C. Yield and textural properties of soft tofu as affected by coagulation method. **J.Food Sci.**, v. 62, n. 4, p. 824-827, 2006. Disponível em:

<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15464.x>. Acesso em: 14 ago. 2022.

IAREMA, Bárbara Gomes. **Bioprocesso para a Produção de Alfa-Galactosidase Utilizando Vinhaça de Soja como Subproduto/Resíduo Industrial**. 2015. 168 f. Orientador: Luciana Porto de Souza Vandenberghe. Dissertação (Mestrado). Mestrado/Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/42130/R%20-%20D%20-%20BARBARA%20GOMES%20IAREMA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 13 ago. 2022.

KANDLER, C.; WEISS, N.. The Genus *Lactobacillus*. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.). Academic Press, London, pp: 1209, 1986. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/26782181>. Acesso em: 15 set. 2022.

KANDLER, C.; WEISS, N.. Regular, Non-Sporing Gram-Positive Rods. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.). Academic Press, London, pp: 1209, 1986. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/26782181>. Acesso em: 15 set. 2022.

KOHYAMA, Kaoru; SANO, Yoh; DOI, Etsushiro. Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (soybean curd). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1808-1812, 1995. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/231545502_Rheological_Characteristics_and_Gelation_Mechanism_of_Tofu_Soybean_Curd. Acesso em: 20 set. 2022.

KRISHNA, B. S. et al., Industrial production of lactic acid and its applications. **International Journal of Biotech Research**, v. 1, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/330292057_Industrial_production_of_lactic_acid_and_its_applications. Acesso em: 22 set. 2022.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEM, S. et al. **Handbook of probiotics**. Wiley, 1999.

LAUFFER, Otávio Ludtke. **Produção biotecnológica de ácido láctico a partir de diferentes fontes de carbono**. 2019. 49 f. Orientador: Daniele Misturini Rossi. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/231027>. Acesso em: 14 ago. 2022.

LI, Jinlong et al. A novel approach to improving the quality of bittern-solidified tofu by w/o controlled-release coagulant using the improved coagulant in tofu processing and product evaluation. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, n. 7, p.1801–1808, 2012. Disponível em: <https://kd.nsf.gov.cn/paperDownload/1000006435934.pdf>. Acesso em: 16 set. 2022.

LIMA, A.K.O; TAUBE JÚNIOR, P.S.. **Diversidade Microbiana da Amazônia 2015**, [S.l.]. Editora INPA. Disponível em: https://acta.inpa.gov.br/Livro-Diversidade-Microbiana-da-Amazonia/Industrial_LimaAKO.pdf. Acesso em: 16 set. 2022.

LIMA, C.D.L.C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**, v. 61, n. 1, pp. 266-272, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000100037>. Acesso em: 13 ago. 2022.

LINDGREN, S E; DOBROGOSZ, W J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS microbiology reviews**, v. 7, 1-2, p. 149-63, 1990). Disponível em: doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04885.x. Acesso em: 15 ago. 2022.

LINHA De Produção De Tofu. **EverSoon**, Yung Soon Lih Food Machine Co., Ltd., [S.l.], [S.d]. Disponível em: <https://www.yslfood.com/pt/category/Linha-de-Produo-de-Tofu/A0102.html>. Acesso em: 19 set. 2022.

MACCAFERRI, Simone et al. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 4, pp. 956-64, 2012. Disponível em: doi:10.1128/AEM.06385-11. Acesso em: 19 set. 2022.

MACHADO, Jonas; ROSSI, Daniele Misturini; AYUB, Marco Antônio Záchia. Avaliação do Cultivo de Bactérias Ácido Lácticas em Hidrolisados de Casca de Soja. In: **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada / V Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada**, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 27 a 29 de novembro de 2019. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/204609/001109691.pdf?sequence=1>. Acesso em: 15 set. 2022

MAN, J. C. De; ROGOSA, M.; ELISABETH SHARPE, M. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 23, 1, p. 130-135, abr. 1960. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>. Acesso em: 14 ago. 2022.

MANFRON, Melânia Palermo; OLIVEIRA, Antonio Joaquim de. APROVEITAMENTO DO SORO DE QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE METANO. **Ciência Rural [online]**, v. 21, n. 1, pp. 117-127. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781991000100012>. Acesso em: 15 set. 2022.

MIRANDA, Nayara Martins Zille de. **Caracterização probiótica de leveduras isoladas de queijo Minas artesanal**. 2020. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2482>. Acesso em: 22 set. 2022.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

MIRANDA, Nayara Martins Zille de. **Caracterização probiótica de leveduras isoladas de queijo Minas artesanal**. 2020. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de

Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2482>. Acesso em:

MOTTA, Gabriel Emiliano. **Potencial biotecnológico de bactérias ácido-láticas para a degradação do composto mutagênico 2-metil-1,4-dinitro-pirrol em produto cárneo**. 2020. 74 p. Orientador: Juliano De Dea Lindner. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/213963>. Acesso em: 19 set. 2022.

NAGPAL, R. et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology**, 334, 1-15, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22568660/>. Acesso em: 14 ago. 2022.

NETO, Pedro de Oliva et al. “Processo de obtenção de leveduras probióticas e enriquecimento nutricional de resíduos para benefício à saúde humana e animal.”, BR 10 2019 023026 6, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/205015>. Acesso em: 16 set. 2022.

NITZKE, Julio Alberto; BIEDRZYCKI, Aline. **Leveduras**. Como Fazer Pão - ICTA/UFRGS [Online], [S.d.]. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/fermentacao/levedura.htm#:~:text=As%20leveduras%20s%C3%A3o%20fungos%20geralmente,trocas%20com%20o%20meio%20ambiente>. Acesso em: 18 set. 2022.

NOH, E.J.; PARK, S.Y.; PAK, J.I.; HONG, S.T.; YUN, S.E. Coagulation of soymilk and quality of tofu as affected by freeze treatment of soybeans. **Food Chemistry**, London, v. 91, p. 715-721, 2005. Disponível em: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-de1cb598-6bb5-3a55-ab3a-26829c50422d>. Acesso em: 20 set. 2022.

NWAMBA, Marknoah Chinenye et al. Trends and Hassles In the Microbial Production of Lactic Acid From Lignocellulosic Biomass. **Environmental technology & innovation**, v. 21, pp. 101337. Disponível em: doi: 10.1016/j.eti.2020.101337. Acesso em: 16 ago. 2022.

O QUE SÃO Probióticos? **APSEN Farmacêutica**, 23 out. 2020. disponível em: <https://www.apsen.com.br/institucional/o-que-sao-probioticos/>. Acesso em: 19 set. 2022.

OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro de Souza. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba - SP**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005. Disponível em: doi:10.11606/D.11.2005.tde-18072005-164621. Acesso em: 18 set. 2022

PANDEY, A. et al.. Current Advances in Solid-State Fermentations. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2018.

PENNACHIA, C. et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **J. Appl. Microbiol**, 105:1919–1928, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19120638/>. Acesso em: 18 set. 2022.

PRABHAKARAN, Molamma P.; PERERA, Conrad O.; VALIYAVEETIL, Suresh. Effect of different coagulants on the isoflavone levels and physical properties of prepared firm tofu. **Food Chemistry**, v. 99, p. 492-499. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222119346_Effect_of_different_coagulants_on_the_isoflavone_levels_and_physical_properties_of_prepared_firm_tofu. Acesso em: 22 set. 2022.

PENÃS et al. Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 99, p. 569-573, 2006. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/697753>. Acesso em: 16 set. 2022.

PENHA, L. A. O. et al. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, PR, v. 25, n. 1, p. 91-102, 2007. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/view/8397/5846>. Acesso em: 18 set. 2022.

RAJOKA, M. I. et al. Kinetics of improved productivity of β -galactosidase by a cycloheximide-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnol. Lett.** 26:741–746, 2004. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:BILE.0000024089.52462.98>. Acesso em: 07 set. 2022.

RECH, Rosane. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. 1998. 88 f. Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, março de 1998. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/77952/000231755.pdf?sequence=1>. Acesso em: 20 set. 2022.

REIS, Ana Raquel. **Probióticos, potencialidades e desafios**. Orientadora: Maria Gil Ribeiro. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2019. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/8703/1/PPG_33443.pdf. Acesso em: 15 set. 2022.

RODRÍGUEZ, Lucero M. Zamora. **Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero**. 2003. 259 f. Orientador: Dolors Parés i Oliva. Tese (Doutorado) - Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia, Agroalimentària Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, 2003. Disponível em: <https://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/4892>. Acesso em: 23 set. 2022.

ROTTA, Isabela Sguilla et al. Bactérias do ácido láctico potencialmente probióticas isoladas de leite não pasteurizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 75, n. 3, p. 178-189, dez. 2020. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/820>. Acesso em: 13 ago. 2022.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas [online]**, v. 42, n. 1, pp. 1-16, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>. Acesso em: 15 set. 2022.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, 84, 197–215, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11164262/>. Acesso em: 20 ago. 2022.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.*, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12723641/> Acesso em: 22 ago. 2022.

SADEGHI, Alireza et al. Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 128, p. 278-295, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.018>. Acesso em: 13 ago. 2022.

SALMINEM, S.; & WRIGHT, V. A. **Lactic Acid Bacteria**, Marcel Dekker, 1993.

SANTOS, Alexandre Zanelli; LATANZE, Rodrigo. PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* A PARTIR DE PERMEADO DE SORO DE LEITE. In: **15º Congresso Nacional de Iniciação Científica CONIC SEMESP**, 2016, Ribeirão Preto. Disponível em: <https://www.conic-semesp.org.br/anais/files/2015/trabalho-1000021282.pdf>. Acesso em: 18 set. 2022.

SANTOS, Valdilene Canzart dos. **ENGENHARIA EVOLUTIVA DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 PARA FERMENTAÇÃO DE XILOSE**. 2011. 117 f. Orientador: Flávia Maria Lopes Passos. Doutorado (Tese) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2011. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/6579/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2022.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G.. **Yeast Biotechnology: diversity and applications: diversity and applications**. Springer, 2009.

SHURTLEFF, William; AYOAGI, Akiko. **Soy milk Industry & Market**, Volume 4. Soyfoods Center, 1984.

SHRUTHI, B. et al. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. **Biotechnology reports**, v. 34, e00716, Amsterdã, Holanda, 28 Feb. 2022. Disponível em: [doi:10.1016/j.btre.2022.e00716](https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716). Acesso em: 16 set. 2022.

SILVA, Guilherme Bergmann da. **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS E GERAÇÃO DE METANO A PARTIR DE RESÍDUO DE LEITE**. 2015. 18 f. Orientador: Cláudia Andréia Gräff.

Artigo (Técnico em Química) - Estágio Supervisionado do curso técnico em química do Centro Universitário Univates, Lajeado, novembro de 2015. Disponível em: <https://www.univates.br/tecnicos/media/artigos/Guilherme.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2022.

SILVA, Lucrécia de Jesus Melo da. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico do queijo São Jorge DOP**. 2011. 18 f. Orientador: Matos, José Estevam da Silveira matos; Maria da Graça Silveira. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Angra do Heroísmo: Universidade dos Açores, 2012. Disponível em: <https://repositorio.uac.pt/handle/10400.3/1343?mode=simple>. Acesso em: 15 set. 2022.

SILVIA BENEDETTI et al. PRODUÇÃO DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA ADICIONADA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA SOJA. In: **ANAIS DO SIMPÓSIO BRASILEIRO DE COMPOSTOS BIOATIVOS**, 2014. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2014. Disponível em: <https://proceedings.science/sbcb/papers/producao-de-bebida-lactea-fermentada-adicionada-de-compostos-bioativos-da-soja?lang=pt-br>. Acesso em: 07 set. 2022.

TABANELLI, G et al. Survival of the functional yeast *Kluyveromyces marxianus* B0399 in fermented milk with added sorbic acid. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 1, pp. 120-9, 2016. Disponível em: doi:10.3168/jds.2015-10084. Acesso em: 17 ago. 2022.

THI, Lê Nguyen et al. Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, edição 1, p. 67-75, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00109-0). Acesso em: 15 set. 2022.

THOMAS, Pious et al. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. **Biotechnology reports**, vol. 8, pp. 45-55, Amsterdã, 20 Ago. 2015. Disponível em: doi:10.1016/j.btre.2015.08.003. Acesso em: 20 set. 2022.

TIMBUNTAM, W.; SRIROTH, K.; TOKIWA, Y. Lactic acid production from sugar-cane by a newly isolated *Lactobacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 811-814, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-006-9003-0>. Acesso em: 14 set. 2022.

TOFALO, R., G. et al. The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. **Int. J. Food Microbiol**, 187, p. 41-49, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25038503/>. Acesso em: 07 set. 2022.

VENTURA, Ricardo. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. 2007. 91 f. Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94999>. Acesso em: 23 set. 2022.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, v. 22, n. 14, p. 1155-1169, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16240456/>. Acesso em:

WOO, K.S. et al. CHARACTERISTICS OF SUCROSE THERMAL DEGRADATION WITH HIGH TEMPERATURE AND HIGH PRESSURE. **FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY**, SEOUL, V. 18, P. 717-723, 2009. Disponível em: <https://koreascience.kr/article/JAKO200926158877468.pdf>. Acesso em: 20 set. 2022.

ZHU, Yan; WANG, Zimeng; ZHANG; Li. Optimization of Lactic Acid Fermentation Conditions for Fermented Tofu Whey Beverage with High-Isoflavone Aglycones. **LWT - Food Science and Technology** **111**, pp. 211-17, 1 ago. 2019. Disponível em: doi:10.1016/j.lwt.2019.05.021. Acesso em: 15 ago. 2022.

APÊNDICE A

Tempo (h)	Ác succínico (g/L)	Ác láctico (g/L)	Ác acético (g/L)	Ác propionico (g/L)	Ác cítrico (g/L)
0	0	0,17	0	0	0
3	0	0,18	0	0	0
6	0	0,25	0	0	0
9	0	0,35	0,24	0	0
18	0,30	0,47	0,51	1,05	1,99
24	0,285	0,52	0,49	1,43	1,69

A.1 – Demais compostos formados durante processo fermentativo da *K. marxianus*

Tempo (h)	Ác succínico (g/L)	Etanol (g/L)	Ác acético (g/L)	Ác propionico (g/L)	Ác cítrico (g/L)
0	0	0,14	0	0,62	0
3	0	0,14	0,10	0,62	0
6	0	0,14	0,12	0,62	0
9	0	0,14	0,21	0,63	0
24	0	0,14	0,74	0,70	0
48	0	0,14	1,42	0,74	0

A.2 – Demais compostos formados durante o processo fermentativo da *L. plantarum*

Tempo (h)	Ác succínico (g/L)	Etanol (g/L)	Ác acético (g/L)	Ác propionico (g/L)	Ác cítrico (g/L)
0	0	0,14	0	0,62	0
3	0	0,21	0,12	0,62	0
6	0	0,51	0,23	0,62	0
9	0,15	0,70	0,42	0,62	0
18	0,25	0,71	0,89	0,62	0
24	0,26	0,68	1,19	0,64	0

A.3 - Demais compostos formados durante o processo fermentativo da *L. fermentum*