

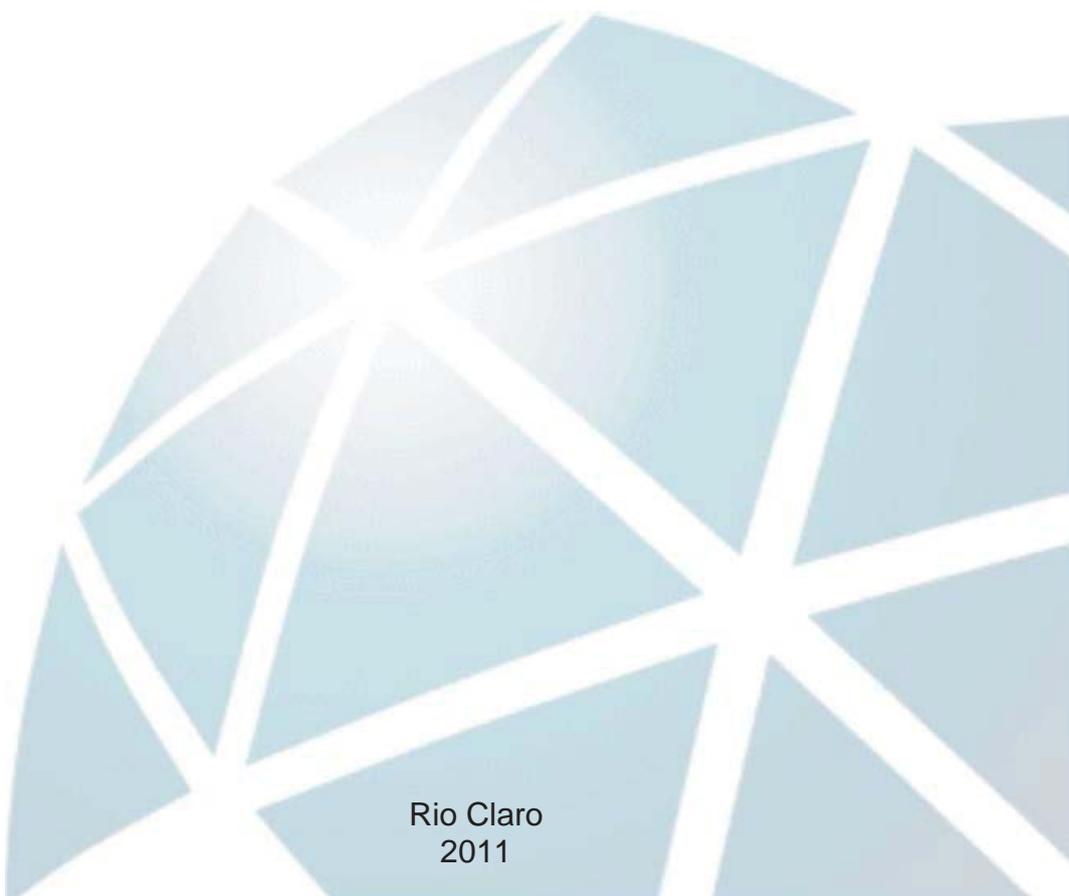
---

**Ciências Biológicas**

---

**MARCELA PIASSI BERNARDO**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS  
E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO  
LÁTICO**



Rio Claro  
2011

MARCELA PIASSI BERNARDO

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E OTIMIZAÇÃO DA  
PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

Orientador: Prof.Dr. Jonas Contiero

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de  
bacharel em Ciências Biológicas

Rio Claro  
2011

547.29 Bernardo, Marcela Piassi  
B523i Identificação de bactérias lácticas e otimização da produção  
de ácido láctico / Marcela Piassi Bernardo. - Rio Claro : [s.n.],  
2011  
61 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e  
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual  
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Jonas Contiero

1. Fermentação . 2. Lactobacillus. 3. Identificação  
bioquímica. 4. Planejamento experimental. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jonas Contiero pela orientação, paciência, amizade. Obrigada por todos os momentos dedicados a mim e a realização deste projeto.

À FAPESP pela bolsa de estudos.

À Dra. Luciana Fontes Coelho, a minha “Co” por excelência, por toda a paciência, dedicação, por toda a ajuda desprendida durante todos esses anos. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao Dr. Cristian, meu querido “Co”, por todo o suporte dado ao projeto.

Ao pessoal do laboratório (Fran, Fabrício, Mary e Sofia, Paula, Mariana, Kate, Natália, Batata, Vinicius, Roberta, Paola, Rodrigo, Paulo, Luciana e Cristian). Obrigada por todos os momentos de descontração, pela convivência do dia a dia, pela paciência que tiveram comigo, pelas inúmeras caronas, pelas conversas edificantes e pela amizade dada a mim. Obrigada, sem vocês este trabalho não teria sido tão legal de ser realizado.

À Carol e ao Prof. Dr. Mauricio Bacci Junior pela ajuda ao desenvolvimento deste trabalho.

À galera da minha sala por todos esses anos de convivência. A Vivian e a Noemi pelo maravilhoso primeiro ano de faculdade e por todas as histórias que guardarei para sempre.

Ao pessoal do Madá, pelas risadas infinitas, pelos momentos de lazer e pela amizade. À Jussara por me escutar falar do projeto e me ajudar a sua maneira, ao Denis por sempre ter uma palavra animadora, a Paulinha, Guarú, Vinícius, enfim, a todos, muito obrigada.

À minha mãe, sem a qual não teria a coragem de continuar em frente muitas vezes. Obrigada por toda a luta para que eu chegasse aqui, desde os momentos de vestibular. Obrigada por todo o apoio e incentivo. Nós sabemos o quanto tivemos que lutar para chegar ao final! Te amo.

Ao meu irmão, Vitor, por todo o carinho dado a mim.

A toda a minha família, que mesmo sem entender o meu trabalho sempre me incentivou e acreditou em mim.

A todos que estiveram comigo durante toda essa jornada e que contribuíram direta e indiretamente a realização deste trabalho.

“O que dá beleza ao deserto é que esconde um poço de água em qualquer parte”.

Saint-Exupéry

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1O Ácido lático.....	10
2.2 Aplicações do ácido lático.....	10
2.3 Micro-organismos produtores de ácido lático.....	12
2.3.1 <i>Streptococcus</i> .....	13
2.3.2 <i>Lactobacillus</i> .....	14
2.3.3 <i>Leuconostoc</i> .....	16
2.3.4 <i>Pediococcus</i> .....	17
2.3.5 <i>Lactococcus</i> .....	17
2.3.6 <i>Enterococcus</i> .....	18
2.3.7 Outras bactérias lácticas.....	19
2.4 Identificação bioquímica de bactérias lácticas.....	19
2.5 Identificação molecular de bactérias lácticas.....	20
2.6 Dificuldades encontradas na identificação.....	20
2.7 Produção de ácido lático por fermentação utilizando diferentes resíduos agroindustriais.....	21
2.7.1 Fontes de carbono.....	22
2.7.1.1 Manipueira.....	22
2.7.2 Fontes de nitrogênio.....	23
2.7.3 Temperatura.....	24
2.7.4 pH.....	25
2.7.5 Agitação.....	27
2.7.6 Tipos de fermentação .....	27
2.8 Técnicas de planejamento de experimentos e metodologia de superfície de resposta .....	28
2.8.1 Planejamento fatorial.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Identificação bioquímica do micro-organismo Y15C .....	31

3.1.1	Coloração de Gram.....	31
3.1.2	Crescimento em diferentes temperaturas, pH e concentração salina .....	31
3.1.3	Produção de CO <sub>2</sub> a partir de glicose .....	32
3.1.4	Análise do isômero produzido pelo isolado.....	32
3.1.5	Kit API 50 CHL e API 50 CH .....	32
3.2	Hidrólise da Manipueira.....	32
3.3	Planejamento tipo Plackett-Burman.....	33
3.4	Planejamento do tipo composto central e metodologia de superfície de resposta.....	34
3.5	Análise da produção de ácido láctico .....	34
3.6	Determinação da concentração de açúcares redutores (ART)..	35
3.7	Determinação de biomassa .....	35
3.8	Fermentação em batelada simples em reator .....	35
3.9	Fermentação batelada com alimentação com constante .....	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1	Resultados dos testes bioquímicos .....	37
4.2	Planejamento experimental Plackett-Burman .....	40
4.3	Planejamento composto central e superfície de resposta.....	42
4.4	Fermentação em batelada simples em reator .....	45
4.5	Fermentação em batelada alimentada com alimentação fluxo constante .....	47
5.	CONCLUSÕES .....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar o micro-organismo Y15C previamente isolado no laboratório de microbiologia industrial, da UNESP de Rio Claro, utilizando técnicas bioquímicas, além de otimizar a produção de ácido láctico por meio de fermentação batelada simples e batelada alimentada. Considerando o potencial do micro-organismo para a produção de D(-) ácido láctico, com 100% de pureza, isômero usado na síntese de polímeros empregados na produção de diversos materiais resistentes e biodegradáveis, foi feita a otimização do meio de cultura, tendo como fonte de carbono a manipueira. A manipueira por ser um resíduo do processamento da mandioca que contém grande quantidade de amido e quando hidrolisado pode ser uma fonte de carbono de baixo custo, quando utilizado pelo micro-organismo.

O isolado Y15C foi identificado como *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii*, por meio de testes bioquímicos. Em relação à otimização dos parâmetros de fermentação, usando planejamento experimental, observou-se que a adição de componentes ao meio de cultivo, assim como a variação da temperatura não aumentou significativamente a produção de ácido láctico. Desta forma optou-se por trabalhar com as menores concentrações de AMM (1,6 mL/L) e citrato (0,96 g/L) e maior temperatura (43,4°C).

Para que haja aumento na produção de ácido láctico podem ser realizados diversos tipos de fermentações, no caso deste trabalho foram comparados dois tipos de fermentação, batelada simples e batelada com alimentação constante. A maior concentração de ácido láctico (41,6 g/L) foi observada que quando utilizada fermentação do tipo de fermentação em batelada alimentada com alimentação de fluxo constante.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico é um ácido orgânico que apresenta um grande potencial químico podendo ser usado como agente de preservação, flavorizante e acidulante, usados na indústria alimentícia. Na indústria farmacêutica tem ampla aplicação, como na produção de cosméticos e pomada, já na da indústria química pode ser usada na produção de bases químicas.

A produção de ácido láctico em 2007 foi de 150000 toneladas (SAUER et al., 2008).

O ácido láctico pode ser polimerizado formando o polilactato (PLA), que é um polímero biodegradável, que substitui compostos a base de petróleo. Dessa forma, contribui com a redução de dióxido de carbono na atmosfera, pois não utiliza óleo nem combustíveis fósseis na sua composição.

Porém a maior aplicação do PLA tem sido na medicina, ou seja, na regeneração de tecidos, suturas cirúrgicas, fixação de fraturas, ligamentos e implantes, no reparo de cartilagens, menisco, reposição óssea e cirurgias orais, sendo empregados na forma de parafusos, pinos, grampos e placas. As grandes vantagens das próteses e implantes de PLA estão no fato desse composto ser altamente resistente, não causar rejeição e ser completamente reabsorvível, o que torna desnecessário cirurgias de revisão para retirada dos implantes.

Outro grande campo de interesse para o PLA é a manufatura de plásticos renováveis e biodegradáveis, a partir dos quais é possível manufaturar os mais diversos tipos de materiais, tais como embalagens de alimentos, utensílios plásticos variados, fibras e revestimentos, os quais podem substituir os produtos fabricados com matéria prima à base de petróleo (GROSS; KALRA, 2002; SAKAI et al., 2004).

No ambiente, ocorre à completa degradação, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Quando expostos a alta temperatura e umidade, funcionam como um termoplástico natural, ou seja, podem ser remodelados e reaproveitados para fabricação de novos materiais; além disso, por não apresentarem toxicidade, contribuem para a diminuição da poluição ambiental (AURAS et al., 2003; TUOMINEN, 2003).

O ácido láctico pode ser obtido tanto pela ação fermentativa de bactérias, fungos e leveduras quanto por síntese química. Porém, os processos fermentativos são mais vantajosos, pois são mais econômicos, não requerem a utilização de

temperaturas, pressões elevadas e catalisadores metálicos, tem baixo consumo de energia, assim como o custo da matéria prima é baixo, é possível utilizar matéria-prima renovável. Na produção fermentativa de ácido láctico é possível a obtenção dos isômeros ópticos, sendo que algumas bactérias são capazes de produzir um dos isômeros preferencialmente (PONDEY et al., 2001; SILVA e MANCILHA, 1991) enquanto que na síntese química do ácido láctico sempre há produção de uma mistura racêmica.

Produção fermentativa de ácido láctico oferece ótima vantagem na obtenção de estereoisômeros opticamente puros (L(+) ou D(-) ácido láctico) e também D,L ácido láctico, dependendo da cepa selecionada para fermentação. A pureza enantiomérica do ácido láctico é fator crucial nas propriedades físicas do PLA. A polimerização de uma mistura racêmica de L(+) ou D(-) ácido láctico, geralmente, leva à síntese de poli-DL-ácido láctico (PDLLA), que é amorfa. O grau de cristalinidade e, muitas outras propriedades importantes, são controladas pela razão dos enantiômeros D e L usados (SODEGARD e STOLT, 2002).

Uma vez que na natureza é escassa a presença de bactérias homofermentativas produtoras de altas concentrações de ácido láctico D(-) e L(+), é de grande importância o isolamento e seleção de bactérias lácticas que se enquadrem nesse perfil, assim como o desenvolvimento de processos fermentativos que garantam uma boa produção deste produto com o menor custo (COELHO, 2011).

O objetivo principal deste projeto foi caracterizar a cepa isolada no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, a qual produz preferencialmente o isômero D(-) e através de processos fermentativos otimizar a produção desse isômero.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O ácido láctico

O ácido láctico foi descoberto em meados do século XVIII por um químico sueco chamado Carl Wilhelm Scheele, ao pesquisar o coalho no soro do leite.

O ácido láctico é uma molécula de cadeia carbônica contendo um ou mais grupos carboxílicos, sendo produzido industrialmente principalmente por micro-organismos, sendo que é o terceiro maior ácido orgânico produzido por via bacteriana, perdendo somente para o ácido cítrico e acético (VICTORELLI, 2011).

Este ácido ocorre naturalmente nas formas enantioméricas levógira (l) e destrógira (d). A síntese dos enantiômeros D e L é determinada pela presença da enzima L-lactato desidrogenase (LLDH) e D-lactato desidrogenase (DLHD) respectivamente, que realiza a reação final de redução do ácido pirúvico a ácido láctico na via glicolítica (GARVIE, 1980; MADIGAN, 2010).

As bactérias lácticas (BLs) podem ser agrupadas de acordo com a proporção dos isômeros produzidos, assim, aquelas que produzem mais de 75% do isômero L(+) lactato, são referidas como do tipo L; as que produzem mais que 75% do isômero D(-) lactato, são referidas como tipo D; e aquelas que produzem os dois isômeros em proporções intermediárias são classificadas como tipo D,L (KANDLER, 1983; MANOME et al., 1998; VIANA et al., 2005; CURRY; CROW, 2003).

A pureza enantiomérica do ácido láctico é fator crucial nas propriedades físicas do PLA .

### 2.2 Aplicações do ácido láctico

O consumo mundial de ácido láctico é estimado em 40.000 ton/ano e em torno de 85% da demanda mundial de ácido láctico é para uso na indústria alimentícia.

Por ser um composto não volátil e inodoro, é usado principalmente como acidulante, flavorizante, agente controlador de pH ou inibidor de esporos de bactérias anaeróbias, como o *Clostridium botulinum* (U.S patent 4,888,191) (Milkowski A.L. et al., 1989).

A partir do monômero do ácido láctico, o polímero pode ser sintetizado, podendo ser classificado em quatro categorias: polímeros biodegradáveis; químicos

oxigenados (propileno, glicol, acrilato); solventes químicos “verdes” e regulador do crescimento de plantas (DATTA et al., 1995).

Os polímeros do ácido láctico são termoplásticos biodegradáveis. Seu tempo de vida útil é curto, podendo ser totalmente degradado no meio ambiente em condições de aerobiose ou anaerobiose, sendo essa ação facilitada quando exposto a alta temperatura e umidade (AURAS et al., 2003; TUOMINEN; JUKKA, 2003).

Segundo Sakata et al., (2004), o PLLA, o poli-ácido glicólico (PGA), o poli ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) e o poli p-dioxanona (PDS), têm sido aplicados em suturas cirúrgicas e aprovados para uso em humanos, pela “Food and Drug Administration”.

Neste sentido, Gollwitzer et al., (2005), analisaram as características imunológicas e mecânicas na interação do PDLLA com o tecido humano, para avaliar as limitações do polímero para aplicações clínicas futuras. Os resultados provaram que o PDLLA não exerce efeitos imunossupressivos ou indução de proliferação de células T, fornecendo boa estabilidade mecânica e adesão em implantes ortopédicos, demonstrando excelente elasticidade, com uma alongação de 8%.

No processo de síntese do PLA, duas moléculas de ácido láctico passam pelo processo de esterificação e ciclização catalítica para fazer um éster de dilactídeo cíclico. Esse processo de dimerização gera água, que pode ser separada antes da polimerização, devido a uma queda significativa na polaridade. PLA de alta massa molar é produzido a partir do éster dilactídeo, pela abertura do anel de polimerização, usando um catalisador (octoato de estanho). Este mecanismo não gera molécula de água adicional e, portanto, é possível obter uma vasta gama de massas molares (COELHO, 2011).

PLLA é um polímero semicristalino que possui alta rigidez e baixa flexibilidade, essa propriedade pode levar a fabricação de produtos com aplicações nas áreas médicas, como a ortopédica (pinos), cardiovasculares (enxertos), ortodônticos e suturas. O PLLA tem ponto de fusão entre 175-178°C e se degrada lentamente (JOHN et al, 2007).

Diferentes proporções dos dois isômeros podem ser misturadas para se obter um PLA com diferentes propriedades. A temperatura de fusão do PLLA pode ser aumentada em 50°C e sua temperatura de deflexão térmica pode ser aumentada em aproximadamente 60°C à até 190°C, pela mistura física com o polímero PDLA,

podendo formar um estéreocomplexo altamente regular com cristalinidade aumentada. A estabilidade de temperatura é maximizada quando uma mistura 50:50 é usada, mas mesmo em baixas concentrações de 3 a 10% de PDLA, ainda há uma melhora substancial. Neste último caso, PDLA atua como agente de nucleação, aumentando assim a velocidade de cristalização. Entretanto, devido à maior cristalinidade do PDLA, a sua biodegradação é mais lenta do que para o PLA (COELHO, 2011).

### 2.3 Micro-organismos produtores de ácido láctico

O ácido láctico pode ser produzido por bactérias, por algumas leveduras e por alguns fungos filamentosos. Os fungos filamentosos (*Rhizopus*) ainda são pouco utilizados para a produção de ácido láctico, pois o processo necessita de biorreatores, com alta taxa de aeração, pois são obrigatoriamente aeróbios. Além disso, a eficiência dos processos produtivos utilizando esses micro-organismos é baixa, devido à menor taxa de reação causada pela limitação à transferência de massa (PARK et al., 1998) e à formação de bioprodutos como ácido fumárico e etanol (TAY e YANG, 2002).

A maior produção de ácido láctico por micro-organismos se dá por via bacteriana.

Sendo os principais gêneros mais comuns: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (ERCOLINI et al., 2001; JAY, 2000; HOLZAPFEL et al., 2001; STILES e HOLZAPFEL, 1997), pertencendo ao filo Firmicutes. Já no Filo Actinobacteria estão bactérias como *Aerococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium* (SNEATH e HOLT, 2001) e também *Bifidobacterium* (GIBSON e FULLER, 2000; HOLZAPFEL et al., 2001).

As bactérias lácticas são caracterizadas por serem Gram positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos. Podem ter formas de bastão ou cocos. Quanto as características bioquímicas são catalase, oxidase e benzidina negativas, não reduzem nitrato a nitrito, são gelatinase negativas e são incapazes de utilizar lactato (CARR et al., 2002). Dependendo do metabolismo do microrganismo, este pode ser classificado de acordo com a fonte de carbono em bactérias

homofermentativas, como *Lactococcus* e *Streptococcus*, que tem rendimento de duas moléculas de lactato a partir de uma molécula de glicose. De forma que ocorre a degradação anaeróbica da glicose para produzir o ácido láctico. A glicólise é uma das inúmeras vias catabólicas conhecidas genericamente como fermentações anaeróbias, através das quais muitos organismos extraem energia química de vários combustíveis orgânicos, na ausência do oxigênio molecular (LEHNINGER et al., 2002).

Podem ser também bactérias heterofermentativas (*Leuconostoc* e *Weissella*) seguindo a rota do fosfogliconato fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e CO<sub>2</sub> em quantidades equimolares (LEHNINGER et al., 2002, CAPLICE; FITZGERALD, 1999; JAY, 2000; KUIPERS et al., 2000).

As bactérias lácticas têm capacidade biossintética limitada, que confere a dependência de meio nutricional complexo, com vitaminas e aminoácidos para o crescimento (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Os principais aminoácidos requeridos para a fermentação láctica são a Leucina, Isoleucina e Valina (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997), que estão presentes no soro de queijo e na água de maceração de milho, fontes alternativas comumente utilizadas na produção de ácido láctico.

### 2.3.1 *Streptococcus*

*Streptococcus* esta entre as primeiras bactérias reconhecidas pelos microbiologistas, devido seu envolvimento em um grande número de doenças humanas e de animais. *Streptococcus* foi o nome genérico usado pela primeira vez para descrever bactérias que formam correntes de cocos, associadas a infecções em feridas. Os estreptococos apresentam complexas exigências nutricionais e necessitam de uma boa oferta de carboidratos e proteínas, incluindo os tecidos e trato intestinal dos animais, leite, laticínios, material vegetal e outros alimentos (STILES et al., 1997). São classificados em *Streptococcus* patogênicos e *Streptococcus* oral.

*S. thermophilus* é uma exceção neste gênero, pois é um organismo importante na fabricação de iogurte e queijo. Cresce em 45 °C e até a 50 °C, mas não a 15°C e é relativamente resistente ao calor. *S. thermophilus* foi, assim, classificado no gênero *Streptococcus* e foi reclassificado como pertencente ao grupo dos streptococcus orais, é considerado uma subespécie de *S. salivarius* (FARROW;

COLLINS, 1984). Ele é utilizado juntamente com *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. lactis* e *Lb. helveticus*, a uma temperatura ótima de incubação acima de 40°C, na fabricação de iogurte e leites fermentados relacionados, bem como em queijos do tipo suíço e italiano. *S. thermophilus* e *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* têm uma relação especial de desenvolvimento associativo, em que a estirpe de *Streptococcus* produz ácido fórmico, que promove o crescimento de *Lactobacillus*, que em troca, fornece compostos que conferem sabor, como o acetaldeído e realizam atividade proteolítica, que mantêm a estirpe de *Streptococcus* crescendo no leite (STILES et al., 1997).

### **2.3.2 Lactobacillus**

A divisão clássica de Orla Jensen, (1919) para o gênero *Lactobacillus* foi baseada nas suas características fermentativas (Tabela 1): 1) Homofermentativo obrigatório; 2) Heterfermentativo facultativo; 3) Heterofermentativo obrigatório.

Esta divisão esta adequada aos interesses dos microbiologistas de alimentos. Vários *Lactobacillus* dos grupos 1 e 2 e alguns do grupo 3 são utilizados em alimentos fermentados,mas o grupo 3 também está comumente associado com a deterioração dos alimentos.

Os *Lactobacillus* são descritos como um grupo heterogêneo de bastonetes Gram positivos, não formadores de esporos, mesófilos ou termófilos, catalase negativos, apresentam forma de bastonetes, são anaeróbios ou aerotolerantes (STILES et al., 1997, HUANG; TANG, 2007, SNEATH et al., 2001). Além disso, apresentam capacidade biossintética limitada e dependência de meio nutricional complexo, com vitaminas e aminoácidos para o crescimento (STILES; HOLZAPFEL, 1997).

Esses micro-organismos crescem em diferentes habitats, tais como plantas, solo, água, esgoto, esterco e alimentos fermentados (leite, carne e vegetais), cereais, silagem, alimentos deteriorados, cerveja, frutas e grãos, peixes, resíduos da indústrias de processamento de açúcar, leite, carnes, bebidas fermentadas e a cavidade oral e o trato intestinal de seres humanos. Eles são acidófilos e portanto reduzem o pH dos alimentos contendo carboidratos fermentáveis em torno de 4,0 e como resultado, muitas vezes inibem o crescimento ou matam outras bactérias. É geralmente aceito que os *Lactobacillus* crescem até um pH máximo de 7,2, apesar

de existirem exceções com relação ao substrato e a cepa. *Lactobacillus* são usados como culturas iniciadoras em muitas variedades de queijo, alimentos vegetais fermentados, carnes fermentadas, vinho e cerveja, pão e silagem. O atual estado da taxonomia de *Lactobacillus* baseada na subdivisão clássica fenotípica esta mostrada na Tabela 1.

O grupo 1 inclui os *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios que fermentam glicose em exclusivamente ácido láctico e não fermentam pentoses ou gluconato. Representam as termobactérias de Orla-Jensen e importantes espécies associadas à indústria de alimentos: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* e *Lb. helveticus*, assim como *Lb. kefiranofaciens*.

O grupo 2 inclui os *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos, fermentam hexoses em ácido láctico e podem produzir gás a partir de gluconato, mas não a partir de glicose. Eles também fermentam pentose por fosfocetolase induzível para produzir ácido láctico e acético. Importantes espécies neste grupo são o *Lb. casei* e *Lb. plantarum*, estão associados com muitos habitat, incluindo produtos lácteos, silagem, boca e intestino humano e esgoto. *Lb. plantarum* é utilizado como “starter” em alguns embutidos fermentados e produtos de cereais, cresce em vegetais fermentados e produtos de carne e está relacionado à deterioração em citros, sucos, vinho e queijos. Um terceiro subgrupo do grupo 2 de *Lactobacillus* inclui o *Lb. curvatus* e *Lb. sake* que tem importante associação com alimentos.

O grupo 3 inclui os heterofermentativos obrigatórios que fermentam hexose em ácido láctico, ácido acético e ou etanol e dióxido de carbono. A produção de gás a partir de glicose é uma característica dessas bactérias. A maioria dos *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios estão associados com fermentações de alimentos, sendo que o *Lb. sanfrancisco* converte maltose em ácido láctico, ácido acético e em compostos flavorizantes, dando aroma ao pão de massa azeda. Entretanto, alguns, como o *Lb. bifementans* podem causar deterioração de alimentos, provocando rachaduras em queijo Gouda e Edam, devido a produção de gás. Outros como o *Lb. brevis* causa deterioração em frutas cítricas, vinho e cerveja, *Lb. fructivorans*, *Lb. brevis* e *Lb. buchneri* causam deterioração em maionese (DAKIN e RADWELL, 1971).

Tabela 1: Divisão dos *Lactobacillus* de acordo com seu metabolismo

	Homofermentativo	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo estrito
Aldolase	+	+	-
Fosfocetolase	-	+	+
Formação de CO <sub>2</sub>	-	+	+
Fermentação de pentoses	-	+	+
Micro-organismos	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. delbrückii</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. reuteri</i>

### 2.3.3 *Leuconostoc*

São heterofermentativos e produzem D(-) ácido láctico a partir de glicose. *Leuconostoc* é o gênero predominante entre as BLs em plantas, sendo o *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* o principal isolado (MUNDT, 1970). Em tecido vegetal danificado eles ocorrem em número relativamente baixo, mas em planta madura e durante a colheita e ensilagem seus números aumentam (DAESCHEL et al., 1987). Em alimentos fermentados de origem vegetal, é geralmente, o primeiro organismo a crescer e é seguido pelos *Lactobacillus* mais tolerantes.

Cepas de *Leuconostoc* de vinho que crescem em meio ácido foram classificadas como *Leuc. oenos* (GARVIE, 1967). São representadas por estirpes que são tipicamente acidófilas e crescem em mostos de uvas e vinhos em pH de 3,5 e não são inibidas por 10 % (v/v) de etanol. Eles são responsáveis pela fermentação malolática de vinhos e cidras, em que L-malato é convertido a L(+) lactato e CO<sub>2</sub>, por outro lado, D(-) lactato é produzido a partir de glicose por todos *Leuconostoc spp.*

#### 2.3.4 *Pediococcus*

Devido a sua associação com a deterioração da cerveja, *Pediococcus* estavam entre as primeiras bactérias a serem estudadas por Louis Pauster. A formação de tétrade e cocos serviu como características fundamentais para o seu reconhecimento, além disso, são homofermentativos e com exceção do *P. dextrinicus* que produz L(+) ácido láctico, todas as espécies produzem D,L lactato a partir de glicose (STILES et al., 1997).

*Pediococcus* são mais freqüentemente encontrados em baixo número, junto com *Leuconostoc* e *Lactobacillus* em plantas e vários alimentos e como agentes de deterioração em bebidas alcoólicas como a cerveja, além disso, são importantes como bactérias “starter” em fermentações de salsicha. Alguns como *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* produzem bacteriocinas. Exigem carboidrato fermentável para o crescimento e crescem pouco em meios que contenham lactose. A fermentação da glicose segue a via de Embden-Meyerhof com D,L ou L(-) lactato como produto final.

O piruvato pode ser desviado para outros produtos finais como diacetil e acetoína, que são muitas vezes produzidos por *P. damnosus*, enquanto *P. pentosaceus* produz quantidades equimolares de lactato e acetato a partir de pentoses (FUKUI et al., 1957). Algumas espécies apresentam tolerâncias a temperaturas extremas, assim como a pH e NaCl extremos, um exemplo é a *P. acidilactici* que cresce a 50°C, *P. damnosus* e *P. parvulus* são ácido tolerantes e crescem em temperatura baixa. *P. damnosus* produz diacetil, mas sob condições de limitação de crescimento( ausência de fonte de carbono, fonte de nitrogênio e fatores de crescimento) produzem acetoína e diacetil.

#### 2.3.5 *Lactococcus*

*Lactococcus* são Gram positivo, as células se apresentam no formato de cocos, produzem L(+) ácido láctico a partir de lactose quando em temperatura entre 20 e 30°C após 10 à 20h. Tem necessidades nutricionais complexas, apresenta temperatura ótima de crescimento a 30°C, não crescendo a 45°C (HOLT et al., 1994). São anaeróbios, mas são capazes de crescer na presença de oxigênio parcialmente, devido à presença de certas enzimas que metabolizam oxigênio, como

superóxido desmutase ou NADH oxidases. Como resultado da microaerofilia, não requer ambiente completamente livre de oxigênio, o que facilita a aplicação industrial dessa espécie em larga escala (WOOD e HOLZAPFEL, 1995). Muitos estudos de engenharia genética foram feitos utilizando bactérias dessa espécie.

Dois fatores principais têm contribuído para o rápido progresso: (1) a presença de funções tecnologicamente importantes no plasmídeo, como por exemplo, utilização de lactose, degradação da caseína, produção de bacteriocina, resistência à bacteriófago, utilização de citrato. (2) Ocorrência de mecanismos de transferência de genes naturalmente sob a forma de conjugação e transdução. Desde 1982, pesquisas genéticas e bioquímicas com *Lactococcus* têm uma alta prioridade dentro de muitos programas de pesquisa da União Européia (WOOD e HOLZAPFEL, 1995).

### **2.3.6 *Enterococcus***

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* são Gram-positivos, apresentam células na forma de cocos, dispostas separadamente, em par, ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, apresentam metabolismo homofermentativo, sendo o L(+) ácido láctico o produto predominante obtido a partir de glicose. Apresentam complexo requerimento nutricional, necessitam de muitas vitaminas, biotina, pirodoxina, riboflavina, pantotenato e muitos aminoácidos, têm habilidade de crescer a 10°C e a 45°C, além de crescer em meio com 6,5% de NaCl e a pH 9,6 (SCHILLINGER; LÜCKE, 1987; WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Além disso, são importantes na microbiologia de alimentos e clínica. São micro-organismos ubíquos, mas seu habitat predominante é no trato gastrointestinal de humanos e animais. Eles ocorrem como contaminantes naturais de carnes. *Enterococcus* são, também, importantes na produção de vários alimentos fermentados tais como queijo e salsicha, pois são utilizados como inoculo iniciador.

Também, podem ser utilizados como probióticos e produzem bacteriocinas (HOLZAPFEL et al., 2004).

### **2.3.7 Outras Bactérias lácticas**

Os *Carnobacterium* produzem L(+) ácido láctico e apresentam células na forma de bacilos, são Gram +, se assemelham aos *Lactobacillus*, com a diferença de que

não crescem em meio acetato. Os *Tetragenococcus* requerem NaCl para crescer e crescem em 18% (m/v) de NaCl, produzem L(+) ácido láctico, cocos formadores de téttrade. Os *Vagococcus* se caracterizam por ter representantes no meio aquático, não formam esporos, podem ocorrer em pares, pequenas redes ou mesmo sozinhos, produzem L(+) ácido láctico a partir da glicose (HOLT et al., 1994).

#### **2.4 Identificação bioquímica de bactérias lácticas**

As culturas são identificadas de acordo com sua morfologia, fisiologia e características bioquímicas. Para isso são usados os testes de caracterização bioquímica como: coloração de Gram; produção de catalase; citocromo oxidase; hidrogênio peroxidase; crescimento a 15° e 45°C; produção de ácidos a partir de carboidratos (L- arabinose, celobiose, D-frutose, D-galactose, esculina, lactose, maltose, melizitose, melibiose, manitol, D-manose, rafinose, ramnose, D-ribose, salicina, sorbitol, sacarose, trealose e D-xilose) em meio de crescimento Man Rogosa Sharpe (MRS) com vermelho de clorofenol como indicador; produção de ácido e gás a partir de 1% (m/v) glicose (meio de crescimento MRS sem extrato de carne); vermelho de metil e Voges-Proskauer em meio MRVP; teste H&L em meio O/F; produção de amônia a partir de arginina; redução de nitrato em meio de nitrato; produção de indol em meio de triptona e crescimento em ágar acetato (Nair; SurenDran, 2005).

De acordo com o HOLT et al., (1994) os principais testes bioquímicos a serem realizados, após a coloração de Gram, para identificar cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos são: arranjo das células; mobilidade; crescimento a 10°C e 45°C, a pH 9.6; crescimento com 6,5% NaCl e 40% bile; reação de catalase; presença de citocromo; produção de ácidos a partir de carboidratos; posição do peptideoglicano; presença de ácido teióico nas parede celular e conteúdo G+C do DNA.

#### **2.5 Identificação molecular das bactérias lácticas**

Na caracterização molecular são determinadas a composição de bases do DNA e o seqüenciamento de DNA ribossomal 16S. O DNA sofre o processo de extração e purificação. ENNAHAR et al., (2003) determinaram a composição das

bases de DNA através de cromatografia líquida de alta eficiência. Para a amplificação do DNA ribossomal 16S, foi realizado o processo de PCR. Após a realização do seqüenciamento do DNA, são buscados alinhamentos da seqüência e inferência filogenética com a biblioteca de dados GenBank.

## **2.6 Dificuldades encontradas na identificação de bactérias lácticas**

Tradicionalmente bactérias lácticas (BL) eram classificadas com base em suas propriedades fenotípicas, como sua morfologia, modo de fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração óptica do ácido láctico e fermentação de vários carboidratos (TSAKALIDOU et al., 1994). Infelizmente, métodos fenotípicos tem inibições inerentes, como a falta de reprodutibilidade e a ambigüidade de algumas técnicas (em resposta a grande plasticidade de crescimento bacteriano) além do baixo poder discriminatório (MOHANIA et al., 2008).

A identificação fenotípica de BL isoladas é particularmente difícil porque requer, em muitos casos, a determinação de propriedades bacterianas além daqueles disponíveis em testes de fermentação comum (TANNOCK et al., 1999). Atualmente, o foco para identificação mudou de fenotípica para genotípica. Este método de identificação é mais sensível e os resultados se mostraram mais confiáveis. (LICK 2003, CALLON et al., 2004).

Primeiramente, os genes 16S rRNA são muito bem conservados o que resulta em um poder de resolução limitado (ACHENBACH et al., 2001). Em segundo lugar, 16S rRNA é um marcador universal que diferencia espécies de bactérias, pois cada espécie tem diferentes números de cópias desse gene. A maioria dos marcadores universais é bem conservada e eles têm funções semelhantes em todas as bactérias. A vantagem de se usar genes universais é que eles possuem um número mais consistente de cópias o que leva a uma melhor representação quantitativa sobre o número de espécies bacterianas (MOHANIA et al., 2008).

É importante ressaltar que pesquisadores encontram dificuldades de identificar a espécie das linhagens de isolados apenas baseados nos resultados moleculares (DEVRIESE et al., 1993). Logo, uma identificação deve combinar métodos convencionais, baseados nas características microbiológicas e bioquímicas e também em métodos genotípicos (EHRMANN et al., 2005)

## 2.7 Produção de ácido láctico por fermentação utilizando diferentes resíduos agroindustriais.

A eficiência de um processo de fermentação pode ser medida pela concentração de ácido láctico, pelo rendimento e pela produtividade (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Para otimizar a produção de ácido láctico, alguns parâmetros devem ser considerados durante a fermentação, como concentração e fonte de nutrientes, oxigênio e dióxido de carbono, pressão osmótica, variação do pH, o “stress” provocado pela velocidade de agitação sobre as células e a temperatura de cultivo (BOUDRANT et al., 2005).

Em seu estudo, Naveena et al., (2005) fizeram uma varredura dos parâmetros nutricionais e físicos para a produção de L(+) ácido láctico. Utilizando a fermentação em estado sólido para *Lactobacillus amylophilus* GV6, os autores relataram qual o efeito da influencia da peptona, extrato de levedura, citrato de amônio, extrato de carne, água de maceração de milho (AMM), hidrolisado de caseína, pH, biomassa do inóculo, período de incubação, tampão carbonato de cálcio, o surfactante “Tween 80”, os minerais  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $NaH_2PO_4$ , e o acetato de sódio na produção de ácido láctico. De acordo com esses pesquisadores, o extrato de levedura, a peptona, o citrato de amônio, o  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , e o surfactante “Tween 80” melhoraram a produção de ácido láctico quando do aumento de seus níveis no meio de cultivo. Nos casos de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , acetato de sódio, AMM, extrato de carne, hidrolisado de caseína, pH, carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ), período de incubação e  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  foram considerados parâmetros não significativos.

Liew et al., (2005) utilizaram técnicas estatísticas para otimizar a produção da biomassa por *Lactobacillus rhamnosus*, variando as concentrações de extrato de levedura, glicose e vitaminas em diferentes valores de pH, estudando os efeitos individuais ou de interação desses parâmetros a fim de alcançar uma condição ótima. As condições ótimas de crescimento para *Lactobacillus rhamnosus* foram pH 6,9, solução de vitamina a 1,28% (v/v), glicose a 5% (m/v) e extrato de levedura a 6% (m/v).

### 2.7.1 Fontes de carbono

A fonte de carbono para produção de ácido láctico pode ser o açúcar em forma pura como glicose, sacarose e lactose, entretanto, esses açúcares são muito caros.

Dessa forma, diferentes produtos alimentícios e agroindustriais ou resíduos representam alternativas mais baratas do que açúcares refinados para produção de ácido láctico, tais como melaço, soro de queijo, bagaço de cana, melaço de beterraba (GOKSUNGUR; GUVENC, 1999; KOTZAMANIDIS et al., 2002), amido de batata, tapioca e trigo (ANURADHA et al., 1999; JOHN et al., 2006).

#### 2.7.1.1 Manipueira

A manipueira é o líquido resultante da prensagem da massa ralada para produção de farinha e do processo de extração e purificação da fécula de mandioca.

É o resíduo mais problemático, por possuir elevada carga poluente e efeito tóxico devido à liberação do cianeto, causando sérios problemas ao meio ambiente quando lançada em cursos d'água (CEREDA, 2001).

Este resíduo é rico em carboidrato, este gerado em grande quantidade durante a produção de farinha de mandioca. A mandioca está entre os seis principais produtos da agricultura (trigo, arroz, milho, batata, aveia e mandioca) com uma estimativa de produção mundial de 160 milhões de toneladas por ano (FAO, 2005). A produção de 1 t de farinha de mandioca gera 300 L de manipueira, conseqüentemente, o tratamento e a disposição da manipueira representam um alto custo na produção industrial de farinha de mandioca, assim como um problema ambiental. Desse modo, há uma grande necessidade de uma melhor gestão dos resíduos, sendo que sua utilização como matéria-prima nos processos biotecnológicos é uma alternativa viável que pode contribuir para uma redução nos custos de produção, diminuição dos impactos ambientais, além de aumentar o valor econômico do resíduo.

Existem relatos na literatura da utilização da manipueira para produção de surfactina por *Bacillus subtilis* (NITSCHKE; PASTORE, 2006), óleos essenciais por *Fusarium oysporum* (MAROSTICA; PASTORE, 2007.), ácido cítrico por *Aspergillus niger* (LEONEL; CEREDA, 1995), além de polihidroxialcanoato e rhamnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* (COSTA et al., 2009).

Há muitos trabalhos literários que reportam a utilização do bagaço de mandioca na produção de ácido láctico (XIAODONG et al., 1997; ROJAN et al., 2008), mas não foram encontrados trabalhos sobre a produção de ácido láctico usando água de manipueira como substrato (COELHO, 2011).

### 2.7.2 Fontes de nitrogênio

O requerimento nutricional por bactérias lácticas é alto, principalmente, com relação às fontes de nitrogênio complexas (CHOPIN, 1993; PRITCHARD; COOLBEAR, 1993). Os meios de cultivo são usualmente suplementados com extrato de levedura, autolisado de levedura ou peptona. Em muitos estudos, extrato de levedura é considerado como nutriente essencial para *Lactobacillus* para se obter eficiente produção de ácido láctico (AESCHLIMANN et al., 1990; AMRANE, 2005; ARASARATNAM et al., 1996). Poucas fontes de nitrogênio revelaram-se tão boas na promoção do processo fermentativo (HUJANEN; LINKO, 1996). Diminuição da suplementação de nitrogênio no meio de cultura pode resultar em um aumento no comprimento da fase lag da cultura, correspondendo a uma adaptação celular ao novo meio (AMRANE, 2003).

A importância do extrato de levedura pode ser explicada pelo fato de que contém quantidades críticas de vitaminas e elementos traços essenciais para a biossíntese de ácido láctico. Kotzamanidis et al., (2002) investigaram o efeito do extrato de levedura na fermentação de ácido láctico a partir de melaço e reportaram que a fermentação de ácido láctico foi consideravelmente estimulada pelo aumento de extrato de levedura, assim como as células viáveis e a utilização de açúcar, todos aumentaram com o acréscimo da concentração de extrato de levedura de 1 a 5 % (m/v), enquanto altas concentrações diminuem a produção, indicando que essas concentrações de extrato de levedura devem ser tóxicas. Máxima concentração de ácido láctico (90 g/L), de número de células viáveis ( $0.8 \cdot 10^5$  U.F.C/mL) e de utilização de açúcar (93 %) foram obtidos em meio suplementado com 5 % (m/v) de extrato de levedura. Esses resultados estão em contraste com os obtidos por

Goksungur e Guvenc, (1997) que estudaram o efeito do extrato de levedura na produção de ácido láctico a partir de melaço de beterraba por *Lb.delbrueckii* IFO 3202

e obtiveram uma concentração máxima de ácido lático (60 g/L) em meio suplementado com 1 % (m/v) de extrato de levedura.

Muitos fatores podem ser possíveis para essas diferenças, Kotzamanidis et al., (2002) ressaltaram que a estirpe do micro-organismo, a composição química do substrato, o sistema de fermentação, e geralmente as condições empregadas durante a fermentação estão entre os principais fatores relacionados a assimilação diferenciada de nutrientes pelo micro-organismo. Em geral, os meios utilizados para o crescimento de bactérias lácticas não são economicamente atrativos, devido ao requerimento de nutrientes de custo elevado, como o extrato de levedura e a peptona (BUSTOS et al., 2004). Uma alternativa é a utilização de AMM, proteína de levedura cervejeira, dentre outras para otimizar o processo.

Bustos et al., (2004) avaliaram a produção de D(-) ácido lático, a partir da glicose por *Lactobacillus coryniformis*, utilizando AMM. Os pesquisadores definiram que para atingir a máxima concentração de ácido lático 58,9 g/L, foi necessário usar baixas concentrações de AMM (5 g/L), altas de peptona (10 g/L) e valores intermediários de extrato de levedura (3 g/L) em 96 horas de fermentação.

Entretanto, para atingir a produção máxima e econômica seriam necessários 5 g/L de AMM como única fonte de nitrogênio, em um tempo de fermentação de 44 horas.

### 2.7.3 Temperatura

A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento das bactérias lácticas. Existe uma temperatura ótima em que a taxa de crescimento é maior e depende das características do micro-organismo utilizado, assim como das condições do ambiente. Quando a temperatura do meio é acima ou abaixo da requerida para um crescimento ótimo, a atividade microbiana é substancialmente reduzida e o organismo pode morrer (PELEG, 1995; ROSSO et al., 1995). A temperatura ótima para crescimento varia de acordo com o gênero do micro-organismo, entre 20° e 45°C (DICKS et al., 1995; WOOD; HOLZAPFEL, 1995). A maioria dos *Lactobacillus* é mesófilo, entretanto, *Lb. bulgaricus* e *Lb. delbrueckii* podem ser agrupados na categoria dos termófilos. Em fermentações utilizando *Lb. delbrueckii* e *Lb. bulgaricus*, temperatura de 45°C ou maior deve ser mantida (BUCHTA, 1983). Para *Lb. helveticus* e *Lb. acidophilus* pode ser usada

temperatura entre 37 – 45°C. Entretanto, para outras bactérias, como *Lb. casei*, temperatura de 28 – 35°C é preferida.

#### 2.7.4 pH

Para uma fermentação rápida e completa, o pH ótimo deve estar entre 5,5 – 6,0, em alguns casos entre 6,0 – 6,5, dependendo do micro-organismo usado. *Lb. helveticus* quando foi utilizado em cultivo em batelada e alta produtividade de ácido láctico foi obtida com pH 5,5 (NORTON et al., 1993). Já Wee et al., (2004) ao avaliarem a eficiência da fermentação, por *Enterococcus faecalis*, observaram que a maior produtividade de L(+) ácido láctico (4 g/Lh) foi obtida com pH 7,0 e o maior rendimento (93,6 %) com o pH 6,0.

Miura et al., (2003) demonstraram que o *Rhizopus* sp. produziu a máxima concentração de ácido láctico (93 g/L) quando o pH do meio de cultivo encontrava-se entre 6 e 6,5. A fermentação é fortemente inibida por pH baixo e cessa em pH com valor abaixo de 4,5 (PANESAR et al., 2007).

O meio de fermentação pode influenciar significativamente a manutenção do pH. Dumbrepatil et al., (2008) observaram que o decréscimo do pH em fermentações que utilizavam melação como substrato não foi significativa (de 6,0 para 5,3), após 48 horas de fermentação, e atribuíram esse fato a uma provável ação tampão do melação. Já em meio de fermentação composto por sacarose foi observado um decréscimo drástico do pH de 6,8 para 4,5. Desta forma, o meio de produção a partir de melação poderia ser uma vantagem por manter o pH do meio de fermentação acima de 5,3, em que a eficiência dos processos produtivos é maior.

O pH é um dos principais fatores que influenciam a produção de ácido láctico, pois a atividade catalítica das enzimas e a atividade metabólica dos micro-organismos dependem do pH extra celular (SILVA; MANCILHA, 1991). Desta forma, a concentração do íon hidrogênio durante a fermentação influencia o crescimento microbiano e a taxa de formação do produto. O pH influencia pelo menos dois aspectos das células microbianas, o funcionamento da enzima e o transporte de nutrientes dentro da célula. Isto pode limitar a atividade das enzimas metabólicas responsáveis pela síntese de novo protoplasma. Os valores de pH também afetam a síntese de RNA e de proteínas (KLOVRYCHEV et al., 1979).

Ácidos fracos, como por exemplo, o ácido láctico inibe o crescimento bacteriano, porque com a queda do pH externo, o ácido é protonado logo que é exportado para fora das bactérias, descarregado, ele se difunde de volta para a célula e dissocia-se devido ao pH superior intracelular. A célula então tem que usar ATP para bombear os prótons para fora, ocorrendo a perda de energia, que causa a parada do crescimento e conseqüentemente a morte das bactérias. Além disso, ocorre autólise das células em alta concentração de ácido láctico (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 1997; KASHKET, 1987).

Mussatto et al., (2008), utilizando meio MRS suplementado com cevada hidrolisada e controle de pH, atingiu uma produção máxima de 35,54 g/L de ácido láctico, enquanto que o mesmo meio sem controle de pH atingiu 13,02 g/L, além da menor produção de ácido láctico, ocorreu, também, menor consumo de substrato e menor crescimento celular na fermentação realizada sem controle de pH.

Assim, o ácido láctico produzido durante a fermentação tem que ser constantemente neutralizado. Para controlar o pH durante a fermentação são utilizados alguns agentes neutralizantes, como carbonato de cálcio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio, adicionados ao meio de fermentação. Entre esses agentes, o carbonato de cálcio tem sido amplamente utilizado nas pesquisas com frascos agitados e em reator (HUANG et al., 2003; YIN et al., 1997, YU et al., 2008, YEN, 2010). O hidróxido de sódio e o carbonato (LONGACRE et al., 1997, TAY e YANG, 2002), bem como o hidróxido de amônio (MARTAK et al., 2003, MIURA et al., 2003, MIURA et al., 2004), também, têm sido utilizado. Martak et al., (2003) relataram que o  $\text{CaCO}_3$  pode ser substituído por 25% de amônia, sem efeitos negativos sobre a produtividade de ácido láctico. Portanto, o excesso de consumo de  $\text{CaCO}_3$ , assim como a cristalização de lactato de cálcio pode ser evitado. No entanto, existem alguns problemas associados com a adição de carbonato de cálcio e outros agentes de neutralização para o controle de pH. O ácido láctico possui um valor de pKa de 3,86 a 30°C, assim, lactato em vez de ácido láctico é formado em um pH elevado, o que resultará em um aumento dos custos de purificação, devido a necessidade de recuperação do ácido láctico (YANG et al., 1995). Além disso, quando o carbonato de cálcio é utilizado, o sulfato de cálcio pode ser produzido no processo de reconversão do lactato a ácido láctico, o que pode causar consideráveis problemas ambientais, além de custos extras.

### 2.7.5 Agitação

Kotzamanidis et al., (2002) estudaram a produção de ácido láctico, a partir de melaço, por *Lb. delbrueckii*, em frascos de Erlenmeyer, sob agitação orbital e sem agitação.

As culturas crescidas sem agitação e as que cresceram com agitação produziram a mesma quantidade de ácido láctico (45 g/L) após 24 horas e 18 horas respectivamente. O menor tempo de fermentação da cultura crescida sob agitação, provavelmente, é devido a melhor difusão do substrato dentro das células, melhorando a transferência de massa com respeito ao substrato e a formação de produto. A concentração de biomassa diminuiu após as primeiras 6 horas de fermentação, enquanto ao mesmo tempo a produção de ácido láctico aumentou. Isto significa que não existe uma relação paralela entre a biomassa e a concentração de ácido láctico.

O número de células viáveis foi maior no cultivo sem agitação comparada com o experimento sob agitação. *Lactobacillus delbrueckii* é um micro-organismo anaeróbio. Conseqüentemente, cresce melhor em cultivos estáticos onde as condições de fermentação são anaeróbias. O número máximo de células viáveis ( $0,8 \times 10^8$  U.F.C/mL) foi observado em cultivo estático após 6 horas de fermentação. Quando a concentração máxima de ácido láctico foi obtida em cultivo estático e sob agitação, 97% do açúcar foram convertidos em ácido láctico. Conseqüentemente, ambos os cultivos foram considerados satisfatórios para a produção de ácido láctico a partir de melaço por *Lb. delbrueckii*. Entretanto, no sistema sob agitação, a produtividade de ácido láctico foi maior quando comparada com o cultivo estático.

### 2.7.6 Tipos de fermentação

O ácido láctico tem sido produzido por vários tipos de fermentações, tais como fermentação em estado sólido (SSF) ou semi-sólido, fermentação submersa, fermentação contínua com sacarificação simultânea, processos contínuos com recirculação celular, descontínuos, fermentação por batelada, batelada alimentada entre outros (HOFVENDAHL e HAGERDAI, 2000; NARAYANAN et al., 2004).

A maioria dos processos acima apresentados adiciona toda a fonte de carbono de uma só vez, sendo que a produção de ácido láctico pode diminuir, devido à inibição causada por altas concentrações de glicose.

Para evitar esse problema, várias medidas estão sendo tomadas pelos pesquisadores, uma das medidas seria pelo processo em batelada, utilizando amido no meio de cultivo, em que enzimas são adicionadas de forma controlada ao meio de fermentação, assim a glicose será fornecida aos poucos, a partir da hidrólise do amido, sem causar inibição pelo substrato. Outra forma, seria a utilização de bactérias lácticas geneticamente modificadas, que conseguem degradar o amido, sendo desnecessário a utilização de enzimas. Outro método promissor seria a utilização de batelada alimentada, com diferentes métodos de alimentação.

Ding e Tianwei, (2006) estudaram vários métodos de alimentação: constante, intermitente e exponencial, em processo de batelada alimentada, com o objetivo de aumentar o rendimento de L(+) ácido láctico por *L. casei* LA-04-1. A máxima produção de ácido láctico (210 g/L) e a máxima produção de L(+) ácido láctico (180 g/L) foram obtidas em batelada alimentada exponencial com adição de solução de glicose (850 g/L) e extrato de levedura (1% m/V), a máxima concentração celular (4,30 g/L) foi obtida após 70,5 h de fermentação, o rendimento e a produtividade de L(+) ácido láctico foram 90,3% e 2,14 g/Lh, respectivamente.

Zhang et al (2010) propuseram um método de alimentação baseado no controle de pH, em que a fonte de carbono e a base são acidionadas simultaneamente. Assim, a concentração da fonte de carbono pode ser controlada até um nível esperado através do ajuste do valor de pH. Nestas condições conseguiram manter a taxa de glicose residual entre 4,1- 4,9g/L e uma máxima concentração de ácido láctico em torno de 96,3 g/L.

## **2.8 Técnicas de planejamentos de experimentos e metodologia da superfície de resposta**

Quando se deseja avaliar apenas o efeito de um fator nas respostas, recomenda-se utilizar a técnica de planejamento de experimentos completamente aleatorizados, descritas por Oliveira, (1999); Werkema e Aguiar, (1996); Montgomery, (1991). Por outro lado, quando se torna importante investigar o efeito provocado nas respostas dos experimentos por dois ou mais fatores de controle e, cada um deles com dois ou mais níveis, Juran et al., (1951) e Montgomery, (1991) recomendam o uso de técnicas clássicas de planejamento, como por exemplo:

técnicas de planejamento fatorial completo, fatorial fracionado ou experimentos com pontos centrais.

Nos processos de produção industrial existem vários fatores e níveis de controle, que influenciam as características de qualidade dos produtos e um problema comum encontrado ao se realizar experimentos, é a necessidade de estudar simultaneamente o efeito desses fatores com diferentes níveis de controle. Neste caso, observa-se que o número de testes requerido para a experimentação tende a crescer à medida que a quantidade de fatores aumenta. Isso torna os experimentos industriais inviáveis, porque os custos e o tempo de execução são elevados. Antony et al., (1998); Coleman e Montgomery, (1993); Montgomery, (1991), Steinberg e Hunter, (1984) sugerem que a solução desses problemas pode ser alcançada com mais facilidade quando os experimentos são planejados e as respostas analisadas com métodos ou técnicas estatísticas.

De acordo com Rodrigues e Lemma, (2005), a escolha da melhor estratégia do planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes ou fatores que desejamos estudar e do conhecimento inicial que temos sobre o processo. Quando o número de fatores é muito grande, é mais conveniente escolher primeiro um fatorial fracionado que reduz o número de ensaios. Desta forma, todo o tempo e recurso para o desenvolvimento da pesquisa não são gastos diretamente num primeiro planejamento, isso porque muitas vezes estamos longe das condições ótimas. Portanto, a análise dos efeitos como informação inicial pode nos dirigir seqüencialmente, através de novos fatoriais fracionados até se chegar ao completo, atingindo-se as condições desejadas.

Uma estratégia sequencial para se atingir as condições otimizadas foi sugerida por Rodrigues e Lemma, (2005) e foi dividida em três etapas. Na primeira etapa, sugerem a seleção de variáveis, por meio de fatorial fracionado ou de Plackett Burman (PB), esta etapa é realizada quando se tem muitos fatores, pouco conhecimento do processo, e se está longe das condições desejadas. Na segunda etapa é realizada a otimização por meio de um fatorial completo, quando se deseja construir modelos preditivos, a partir de poucos fatores, dentro de uma região ótima.

Na terceira etapa, é realizada a validação das condições otimizadas, quando se deseja confirmar experimentalmente os resultados obtidos pela análise de superfície de resposta, neste caso as condições já estão otimizadas e definidas.

É muito importante que, após definidas as condições otimizadas pela análise de superfície de resposta, realizemos ensaios experimentais nestas condições, para validação experimental dos resultados.

### **2.8.1 Planejamento fatorial**

O planejamento fatorial é indicado para a fase inicial do procedimento experimental quando há necessidade de se definir os fatores mais importantes e estudar os efeitos sobre a variável resposta escolhida. Ainda, “é um modelo de efeitos fixos, isto é, a análise dos efeitos provocados pelos fatores não pode ser transferida para outros níveis que não os analisados no planejamento” (BUTTON, 2001).

Segundo Juran et al., (1951), um experimento fatorial com  $k$  fatores, cada um deles com dois níveis, são denominados de experimento fatorial  $2^k$ . O processo experimental dessa técnica consiste em realizar testes com cada uma das combinações da matriz experimental, para em seguida, determinar e interpretar os efeitos principais e de interação dos fatores investigados e assim, poder identificar as melhores condições experimentais do produto ou processo de fabricação.

As principais vantagens da técnica fatorial  $2^k$  é que através da análise dos experimentos pode-se indicar as principais tendências e determinar uma direção promissora para as experimentações subseqüentes (OLIVEIRA, 1999; MONTGOMERY, 1991).

As limitações atribuídas à técnica de fatorial  $2^k$  são apresentadas a seguir (OLIVEIRA, 1999; MONTGOMERY, 1991; ABRAHAM et al., 1999):

- Com esse tipo de técnica de planejamento de experimento não é possível obter informações dos fatores em níveis intermediários;
- Em alguns experimentos não é possível realizar réplicas, porque na maioria das vezes os custos de experimentação são elevados, com isso os erros experimentais não podem ser estimados (ANDERSON, 1957);
- Não é suficiente avaliar os efeitos significativos apenas sob o ponto de vista estatístico, mas torna-se necessário avaliá-los também em termos práticos;
- Torna-se inviável utilizar a técnica quando existe um número grande de fatores;

- Ao utilizar essa técnica existe o risco de construir e planejar experimentos super dimensionados, uma vez que, são considerados vários fatores para realizar os testes.

Uma das soluções encontradas para as limitações apresentadas anteriormente, é construir e planejar experimentos industriais utilizando-se a técnica de experimentos fatoriais fracionados 2k-p (MONTGOMERY, 1991; COCHRAN e COX, 1957).

Ao realizar experimentos industriais, é comum verificar a necessidade de estudar o efeito de um ou mais fatores de controle ao mesmo tempo (ABRAHAM et al., 1999). A aplicação das técnicas de planejamento de experimentos fatoriais fracionados 2k-p, mostra-se como uma das soluções para esse tipo de problema. Montgomery, (1991) ressalta que, com essas técnicas é possível analisar os efeitos sobre uma resposta de interesse, de k fatores com dois níveis cada um. Em 2k-p combinações de testes, realizando-se apenas uma parte (metade do experimento quanto p é igual e um, ou um quarto do experimento quando p é igual a dois), do experimento sem comprometer significativamente a precisão das conclusões decorrentes da análise de resultados. Simultaneamente, os custos e o tempo de duração dos ensaios são significativamente reduzidos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Identificação bioquímica do micro-organismo Y15C**

##### **3.1.1 Coloração de Gram**

O isolado foi submetido a crescimento em meio MRS sólido em tubo invertido. Após 24h de incubação a 35°C realizou-se esfregaço em lâmina e ao método de coloração propriamente dito. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico comum. Foi analisada a forma, se era Gram positiva ou negativas, arranjo e formação de esporos.

##### **3.1.2 Crescimento em diferentes temperaturas, pH e concentração salina**

Verificou-se o crescimento do microrganismo a 45°C e 10°C após 3 dias e crescimento a 10°C após 10 dias, além do crescimento em pH 9,6 e 4,4 e em 6.5%

e 18% de NaCl após 3 dias. Em todos os testes utilizou-se o meio MRS e 10% de inóculo crescido a 35 °C, por 24 h.

### **3.1.3 Produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose**

A cepa foi submetida a fermentação para crescimento em tubos de ensaio contendo 5mL de meio de cultura MRS líquido a 35°C por 24 horas. Após este período, 500 µL foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio MRS líquido com tubos de Durham invertidos. Estes foram incubados por 24h a 35°C. A produção de CO<sub>2</sub> é aprisionada pelos tubos de Durham.

### **3.1.4 Análise do isômero produzido pelo isolado**

Também como forma de identificação foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência equipada com detector UV a 254nm, coluna chirex 3126 Phenomenex (150 X 4,6) eluída com 1mM de Sulfato de Cobre II em solução aquosa como fase móvel, fluxo de 1 mL/min a temperatura de 30°C.

### **3.1.5 Kit API 50 CHL e API 50 CH**

Os kits API 50 CH e API 50 CHL (API system, Bio-Merieux, France) foram usados de acordo com as instruções do fabricante.

## **3.2 Hidrólise da Manipueira**

Foram adicionados 10% de ácido clorídrico concentrado à solução de manipueira. Essa solução foi aquecida por 30 minutos na temperatura de ebulição, para a hidrólise do amido presente.

Após isso, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e ajustou-se o pH para 6.4-6.5, usando hidróxido de sódio concentrado.

### 3.3 Planejamento do tipo Plackett–Burman

O propósito deste planejamento foi identificar os componentes do meio de cultura que tem efeito significativo na produção de ácido láctico, utilizando água de manipueira como fonte de carbono. Dezesete experimentos foram gerados a partir de 9 fatores: Temperatura, AMM (água de maceração de milho), fosfato de potássio, sulfato de manganês, sulfato de magnésio, Tween 80, citrato, acetato e cisteína. O planejamento experimental Plackett-Burman (PB) foi baseado no modelo de primeira ordem sem interações entre os fatores. As variáveis e níveis utilizados no planejamento se encontram na Tabela 2.

O experimento foi conduzido em Erlenmeyers de 250 mL, com 20 mL de meio de cultura e sob as condições de 40°C, 150 rpm e pH 6,4-6,5. Amostras de 1 mL foram retiradas do caldo de fermentação após 48 horas de cultivo e analisou-se a produção de ácido láctico. Cada frasco continha 60% da fonte de carbono de carbonato de cálcio. O inoculo foi de 10% com 24h de cultivo.

Tabela 2: Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman

Variáveis	Códigos	Níveis	
		-1	+1
Temperatura	X <sub>1</sub>	28°C	42°C
AMM(mL/L)	X <sub>2</sub>	0	15
Fosfato de potássio(g/L)	X <sub>3</sub>	0	2
Sulfato de manganês(g/L)	X <sub>4</sub>	0	0,05
Sulfato de magnésio(g/L)	X <sub>5</sub>	0	0,1
Tween 80(mL/L)	X <sub>6</sub>	0	1
Citrato(g/L)	X <sub>7</sub>	0	2
Acetato(g/L)	X <sub>8</sub>	0	5
Cisteína(g/L)	X <sub>9</sub>	0	0,3

### 3.4 Planejamento composto central (PCC) e metodologia da superfície de resposta

Para avaliar a influência das variáveis, temperatura, citrato e água de maceração de milho (AMM) na produção de ácido láctico, optou-se por um planejamento fatorial composto central com quatro réplicas no ponto central, totalizando 17 experimentos. Esse experimento foi realizado em duplicata.

As variáveis independentes foram codificadas segundo a equação 1.0:

Equação geral:  $X_n = \frac{(X - X_0)}{2}$

$$\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}$$

Equação 1.0

Onde:  $X_n$  é o valor da variável no experimento na forma codificada;

$X$  é o valor real da variável a ser calculada;

$X_0$  é o valor real da variável no ponto central;

$X_{+1}$  é o valor real da variável no nível superior;

$X_{-1}$  é o valor real da variável no nível inferior.

$$X_1 = \frac{(AMM - 10)}{5}$$

Equação 2.0

$$X_2 = \frac{(Citrato - 6)}{3}$$

Equação 3.0

$$X_3 = \frac{(Temperatura - 35)}{5}$$

Equação 4.0

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 3

Tabela 3: Níveis utilizados durante o Planejamento composto central (PCC)

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
AMM (mL/L)	$X_1$	1,6	5	10	15	18,4
Citrato (g/L)	$X_2$	0,96	3	6	9	11,04
Temperatura(°C)	$X_3$	26,6	30	35	40	43,4

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio de fermentação, com 60% da fonte de carbono de carbonato de cálcio, a 150 rpm. Os frascos foram inoculados com 10 % de inóculo com 24h de crescimento.

### **3.5 Análise da produção de ácido láctico**

A análise da produção de ácido láctico foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), equipada com detector Ultra-violeta a 210 nm. Foi utilizado uma coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm), da Phenomenex, eluída com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 65°C.

### **3.6 Determinação da concentração de açúcares redutores( ART)**

Os açúcares redutores foram quantificados através da cromatografia de alta eficiência (CLAE) equipada com índice de refração. A coluna utilizada foi a Rezex RMN carboidrato Na<sup>+</sup> (300 x 7,8 mm) da Phenomenex, eluída com água como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 40°C.

### **3.7 Determinação da biomassa**

A biomassa foi obtida através do método de densidade óptica a 650nm.

### **3.8 Fermentação por batelada simples em biorreator**

Com as condições obtidas através do planejamento experimental composto central, realizou-se uma fermentação em reator contendo 2 litros de manipueira hidrolisada (pH ajustado para 7,5) com concentração de 23,2 g/L de ART. Foram adicionadas, a manipueira, as menores concentrações de AMM (1,6mL/L) e de citrato (0,96g/L). A temperatura foi de 43,4°C e a agitação foi de 150 rpm. Foi adicionado 10% de inóculo, com 24h de crescimento. O pH foi mantido entre 6.3-6.1 e controlado com NaOH 10M. Foram retiradas amostras de 20 mL a cada 3 horas até 12 horas de fermentação e após isso, retirou-se amostra a cada 12h, a fermentação teve duração de 48 horas (Figura 1). As amostras retiradas foram centrifugadas a 10000rpm, por 10min e o sobrenadante usado para a determinação

da produção de ácido lático e consumo de açúcar. O pellet foi lavado duas vezes e usado para determinação de biomassa.



Figura 1: Fermentação batelada simples em biorreator

### 3.9 Fermentação em batelada com alimentação com fluxo constante

Foram usadas basicamente as mesmas condições para o meio de cultura inicial, ou seja, foi usado 2 litros de água de manipueira hidrolisada com pH ajustado para 7,5, porém com concentração inicial de ART de 31,7g/L. Foi adicionado 1,6mL/L AMM e 0,96g/L de citrato, temperatura 43,4°C e agitação 150 rpm, pH controlado entre 6.3-6.1 com NaOH 10M. O inoculo foi de 10% com 24h de crescimento. A alimentação continha 850g/L de glicose e 3%(v/v) de AMM. O fluxo utilizado para a alimentação foi de 0,20mL/min

Amostras de 20 ml foram retiradas. O tempo total de fermentação foi de 48 horas, sendo que o tempo de alimentação foi de 12 horas começando a partir da

fase exponencial de crescimento, às 6 horas de fermentação (Figura 2). As amostras retiradas foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para a determinação da produção de ácido lático e consumo de açúcar e o pellet foi lavado duas vezes e usado para determinação de biomassa.



Figura 2: Fermentação batelada com alimentação constante

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados dos testes bioquímicos

A cepa Y15C foi isolado de leite fermentado.

Os resultados para todos os testes bioquímicos realizados se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos testes bioquímicos

Testes Bioquímicos	Gram	pH 4.4	pH 9.6	10°C	45°C	NaCl 6.5%	NaCl 18%	CO <sub>2</sub>
Y15C	Bastonetes +	+	-	-	+	+	-	-

+ : Apresentou crescimento - : Não apresentou crescimento

O isolado Y15C se apresentou como bastonetes Gram positivo, como pode ser observado na Figura 3.

Além disso, a cepa não apresentou crescimento a pH 9.6, 18%NaCl e a 10°C.

De modo semelhante não apresentou produção de gás carbônico a partir de glicose. Dessa forma, apresenta perfil homofermentativo, quando as hexoses são

convertidas quase exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof, sendo que 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico.

O isolado apresentou crescimento a pH 4.4, 45°C e a 6.5% NaCl.

A análise feita pela cromatografia líquida de alta eficiência mostra que o isolado é capaz de sintetizar o D(-) ácido láctico com 100% pureza em meio MRS (Tabela 5).

Com esses resultados apresentados foi possível chegar ao gênero da bactéria láctica, por meio do Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Holt *et al* 1994) que é pertencente a *Lactobacillus*.

Tabela 5: Produção dos isômeros de ácido láctico por Y15C

Isolado	%L(+) ácido láctico	%D(-) ácido láctico	Total
Y15C	0	100	100

Os Kits API 50 CHL e 50CH (Figura 4) revelaram uma identificação com perfil duvidoso, porém como se sabia anteriormente que o isolado em questão apresenta crescimento a 45°C, ficou claro, através da identificação bioquímica, que o isolado Y15C trata-se do micro-organismo *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*. A Tabela 6 mostra o resultado obtido através do software da empresa BioMérieux.

Cho et al. (2006) realizando isolamento de bactérias lácticas de uma comida típica coreana (Jeotgal) encontraram na identificação bioquímica os gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ou *Weissella*.

Sujaya et al.. (2001) isolando bactérias lácticas a partir de *Ragi tape* encontraram cocos homofermentativos, que foram identificados como sendo do gênero *Enterococcus* e de *Pediococcus*, bastonetes homofermentativos, sendo o principal gênero encontrado *Lactobacillus*.

Yanagida et al., (2005) isolaram bactérias lácticas do solo de vinhedos e encontraram predominantemente o gênero *Enterococcus*, seguido de *Lactobacillus*. *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* junto com *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* são usados na produção de iogurte. Por apresentar propriedades proteolíticas, *L. delbrueckii* subsp, *bulgaricus* está também presente como “starter” usado na produção de vários tipos de queijos.

De acordo com Huang et al., (2006) *Lactobacillus delbrueckii* é um dos micro-organismos mais usados na produção de iogurtes e de produtos derivados do leite

Fica evidente que o gênero *Lactobacillus* é muitas vezes encontrado quando há o isolamento de bactérias lácticas e que a espécie *Lactobacillus delbrueckii* é encontrada em produtos lácteos, o que vai de encontro ao nosso trabalho, uma vez que o isolado Y15C foi isolado de iogurte. Identificação molecular está em processamento para confirmação da identificação bioquímica.

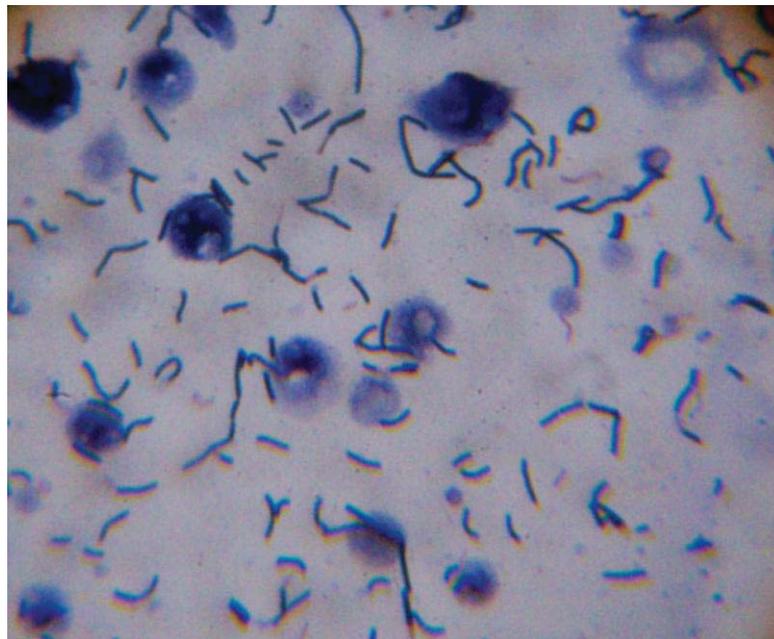


Figura 3: Coloração de Gram com o isolado Y15C

Tabela 6: Resultado do Kit API 50 CH

Taxons significativos	% ID	T	Teste(s) por aproximação			
<i>Lactobacillus curvatus</i> ssp <i>curvatus</i>	55.4	0.58	GAL100%	MAN 12%	MAL 94%	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>delbrueckii</i>	23.7	0.47	RIB 24%	MAN 0%	ESC 24%	MAL 75%
			SAC 87%			
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	20.2	0.48	GAL 75%	AMY 83%	MAL100%	LAC 75%
			GEN 83%			
Teste(s) complementar(es)	15°C	45°C				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>delbrueckii</i>	-	+				
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-				
<i>Lactobacillus curvatus</i> ssp <i>curvatus</i>	+	-				



Figura 4: Kit API 50CH antes e após 48 horas de reação

#### 4.2 Planejamento experimental Plackett-Burman

A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento experimental PB (valores reais e codificados) das variáveis estudadas ( $X_1$ = Temperatura,  $X_2$ = AMM,  $X_3$ =fosfato de potássio,  $X_4$ =sulfato de manganês,  $X_5$ =sulfato de magnésio,  $X_6$ =Tween 80,  $X_7$ = Citrato de amônio,  $X_8$ = Acetato de sódio,  $X_9$ = Cisteína) adicionadas a água de manipueira, além da resposta para a produção de ácido láctico.

Tabela 7: Matriz do planejamento experimental PB

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	AL(g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	16,95
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	14,25
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	9,75
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	10,60
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	27,45
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	11,10
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	25,40
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	9,30
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	20,60
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	32,95
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	8,75
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	11,65
13	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	20,20

Observa-se, a partir do gráfico de pareto ( Figura 5), que nenhum dos fatores analisados teve influência significativa na produção de ácido láctico.

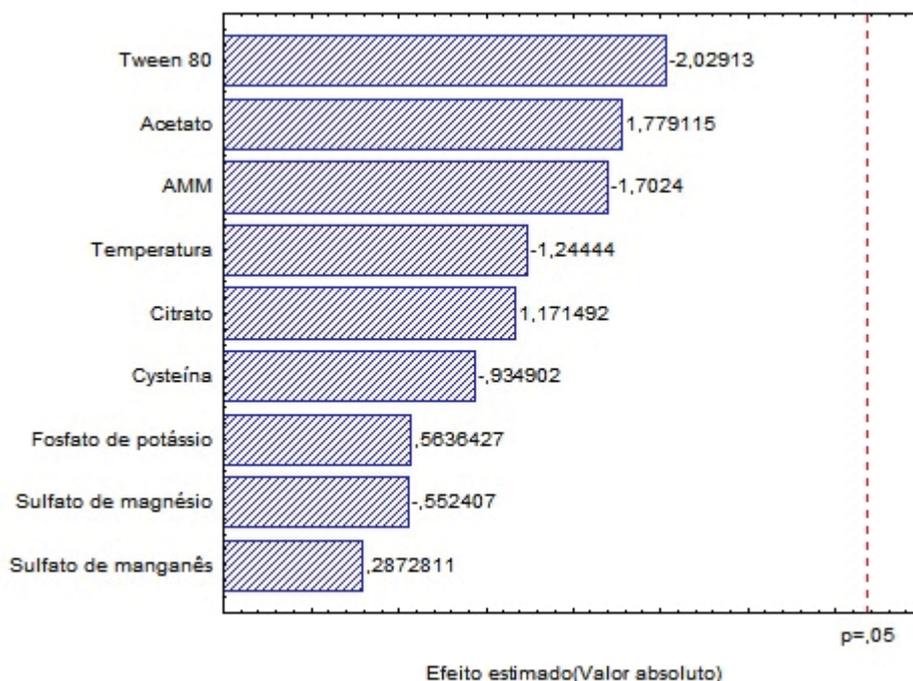


Figura 5: Gráfico de Pareto

### 4.3 Planejamento composto central e Superfície de Resposta

Observou-se (Figura 5), que nenhuma das variáveis apresentou significância para a produção de ácido lático nas concentrações usadas durante o Plackett-Burman (PB). Isto indica que somente a própria manipueira pode ser suficiente para a produção do ácido lático. No entanto, entre outros fatores, a temperatura é um fator de grande importância na fermentação de ácido lático, por este motivo ela foi usada como uma variável no planejamento composto central (PCC) no intuito de que fosse encontrada uma temperatura tal em que houvesse maior produção do ácido em questão.

Nas concentrações usadas no PB, o citrato e a AMM não foram significativos, porém por se tratarem respectivamente de uma fonte de carbono e fonte de nitrogênio foi de suma importância que se realizasse um experimento onde outras concentrações pudessem ser testadas e verificada a influência, ou não, destes fatores na produção de ácido lático.

A Tabela 8 apresenta os valores reais e codificados do planejamento experimental delineamento composto central (DCC) das variáveis estudadas, bem como a produção de ácido lático.

Tabela 8: Valores reais e codificados para o DCC

Experimentos	Variáveis independentes			Resposta
	X1	X2	X3	Ácido lático
1	5 (-1)	3 (-1)	30 (-1)	34,9
2	5(-1)	3 (-1)	40 (1)	46,75
3	5 (-1)	9 (1)	30 (-1)	41,79
4	5 (-1)	9 (1)	40 (1)	60
5	15 (1)	3 (-1)	30 (-1)	45
6	15 (1)	3 (-1)	40 (1)	53,85
7	15 (1)	9 (1)	30 (-1)	32,7
8	15 (1)	9 (1)	40 (1)	51,8
9	1,6 (-1.68)	6 (0)	35 (0)	28,25
10	18,4 (1.68)	6 (0)	35 (0)	10,2
11	10 (0)	0,96 (-1.68)	35 (0)	17,5
12	10 (0)	11,04(1.68)	35 (0)	17
13	10 (0)	6 (0)	26,6 (-1.68)	30,35
14	10 (0)	6 (0)	43,4(1.68)	47,3
15	10 (0)	6 (0)	35 (0)	28
16	10 (0)	6 (0)	35 (0)	26,85
17	10 (0)	6 (0)	35 (0)	22,05

X1= água de maceração de milho (AMM) X2= citrato X3= temperatura

A seguinte equação geral foi obtida após realização da regressão múltipla

$$AL = 24,29 - 2,22 X_1 + 0,36 X_2 + 6,33 X_3 + 2,34 X_1X_1 - 4,31 X_1X_2 - 0,26 X_1X_3 + 1,64 X_2X_2 + 2,07 X_2X_3 + 9,27 X_3X_3 \quad (\text{Equação 5})$$

onde  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são os valores codificados de AMM, citrato e temperatura, respectivamente. A equação geral fornece os valores que seriam esperados, no caso, para a produção de ácido láctico. Esta equação será útil no momento de se realizar o gráfico de superfície de resposta.

Também foi feita a análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Análise de variância

Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc.	p>F
Regressão	1786,790	9	198,5323	0,919071	0,557685
Residual	1512,099	7	216,0142		
Falta de ajuste	1492,177	5	298,4355	29,96	0,03
Erro puro	19,92	2	9,96		
Total	3298,889	16			

R= 0,7359 R<sup>2</sup>=0,5416

A ANOVA do modelo de regressão quadrático demonstrou que o modelo não é significativo, como é evidente pelo teste de Fischer, teste-F (Fcalc(9,7)=0,91907 < Ft(9,7)= 3,68 e tem um valor de probabilidade alto ( p < 0,5576). Já o valor de R<sup>2</sup> mostra que 54,16% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação modelo.

A Figura 6 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência.

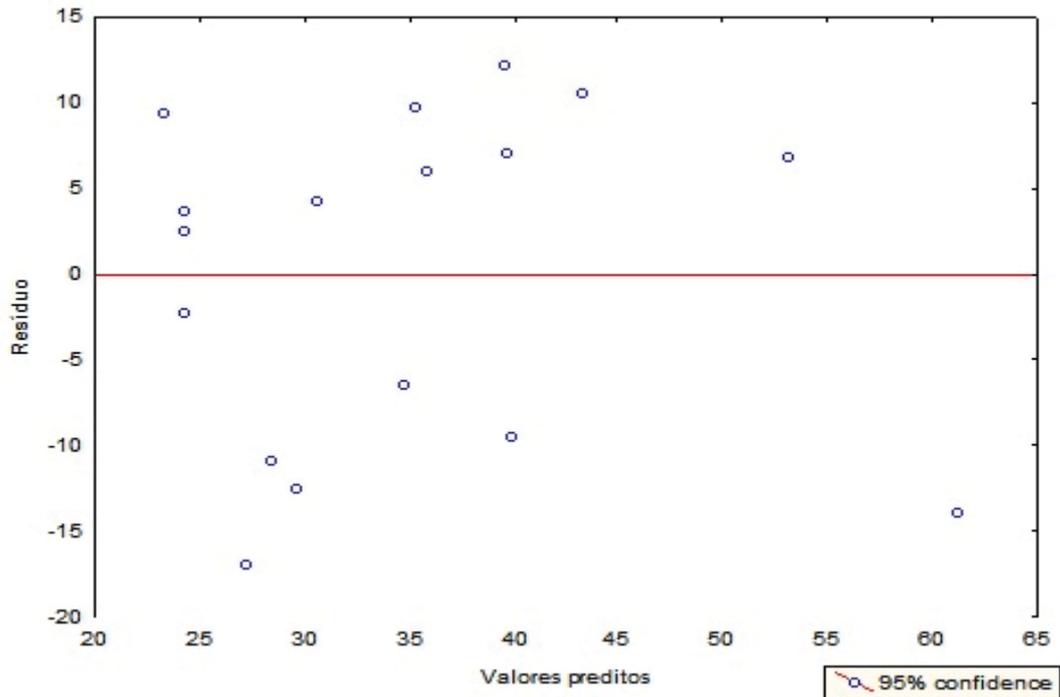


Figura 6: Valores de resíduo contra valores preditos

Como exposto anteriormente, através da equação completa ( Equação 5) é possível a construção da superfície de resposta. Este gráfico auxilia na localização da região ótima de cada variável para a produção máxima de ácido láctico. Além de que é possível observar como as variáveis testadas se relacionam (Figura 7).

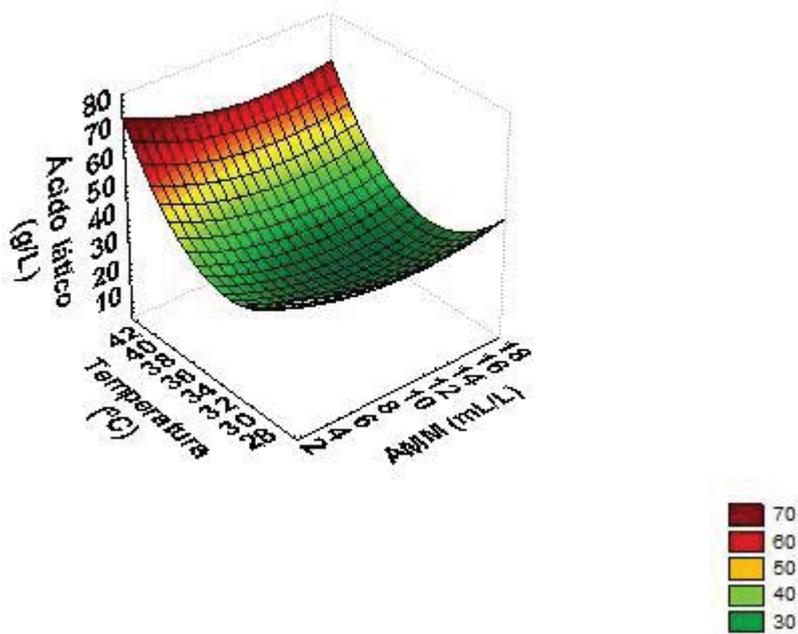


Figura 7: Gráfico de superfície de resposta

Através da análise da Figura 7 é possível notar que valores intermediários de ambas as variáveis levam a menor produção de ácido lático e que valores extremos levam a maior produção. Sendo assim, conclui-se que a presença de uma maior ou menor concentração de AMM e citrato ou uma maior ou menor temperatura leva a uma mesma resposta, que é a maior produção de ácido lático. Não há significância destas variáveis durante o processo fermentativo.

Dessa forma, durante o processo de fermentação em batelada alimentada optou-se pela utilização dos menores valores das variáveis AMM e citrato (1,6 ml/L e 0,96 g/L), por levar a menores custos de produção e pela maior temperatura (43,4°C), pois assim alguma possível contaminação pode ser evitada. Apesar de nenhuma variável ser significativa durante o planejamento experimental foi conseguido concentrações relativamente altas de ácido lático, o que pode indicar que somente a água de manipueira seja suficiente para a produção de ácido lático.

No presente trabalho, embora nenhuma variável tenha sido significativa, foi obtido uma produção de 53,85 g/L. Coelho et al., (2010) conseguiram com *Lactobacillus rhamnosus* e manipueira como fonte de carbono através do planejamento experimental uma máxima produção de ácido lático de 41,82g/L após 48h de fermentação. Tiveram como variáveis significativas Tween 80 e água de maceração de milho.

#### **4.4 Fermentação batelada simples em reator**

Nas amostras obtidas a partir da fermentação foram feitas análises de biomassa, consumo de açúcar e produção de ácido lático.

Em relação a biomassa pode-se observar que a fase exponencial de micro-organismo está entre 3 e 6 horas de fermentação (Gráfico 1). A biomassa foi obtida através da curva de crescimento do micro-organismo que tem como equação:

$$\text{Concentração} = 0,372 * \text{ABS} + 0,005 \quad (\text{Equação 6.0})$$

Quanto ao consumo de açúcar podemos notar que há um maior consumo da fonte de carbono na mesma faixa (de 3 a 6 horas) em que houve um aumento do crescimento.

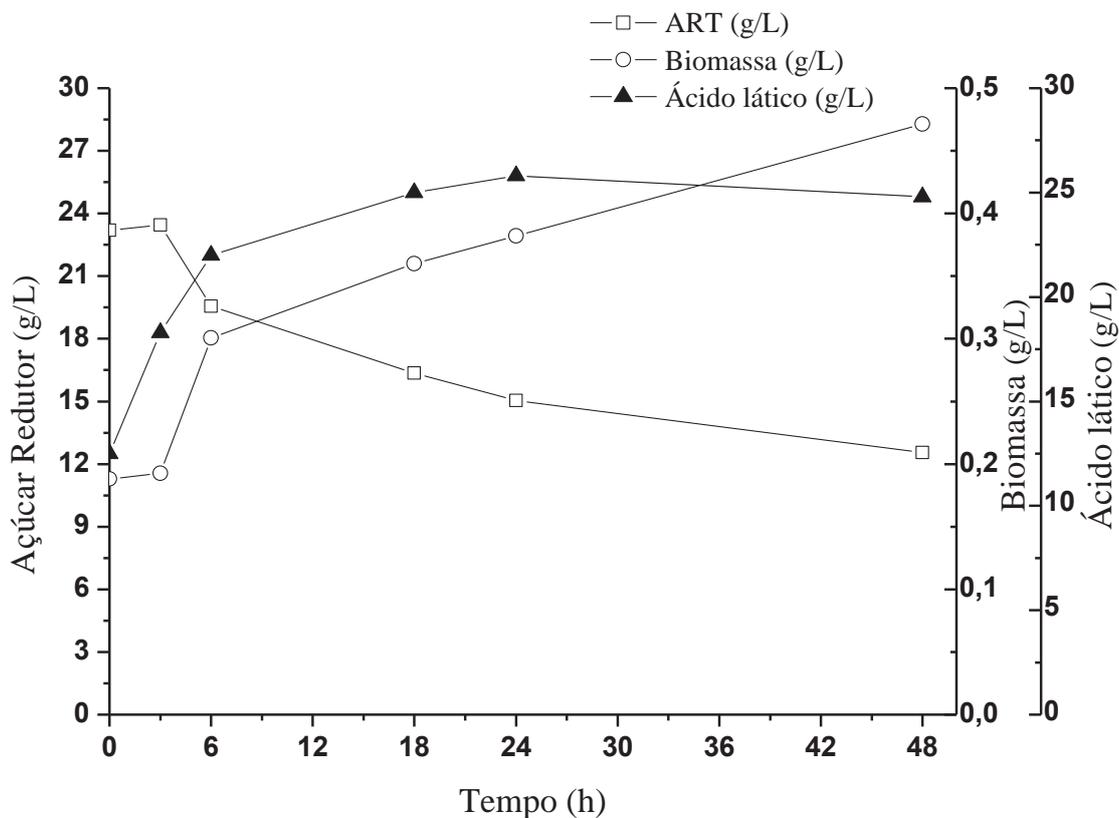


Gráfico 1: Concentrações de substrato, produto e biomassa em função do tempo de fermentação.

É possível observar que até 6 horas de cultivo houve um grande consumo do açúcar, levando a um grande crescimento do micro-organismo, conseqüentemente a grande produção de ácido láctico. A maior concentração de ácido láctico conseguida foi de 25,8g/L, tendo como concentração inicial de açúcar 23,2 g/L. A concentração inicial de ácido láctico é de 12,5 g/L. É provável que este ácido láctico seja proveniente da própria manipueira, uma vez que se trata de um resíduo e também de um meio complexo.

Tashiro et al (2011)., partindo de 20g/L de glicose, tendo como micro-organismo o *Lactobacillus delbrueckii* teve sua maior taxa de crescimento entre 6h e 9h e que também coincidiu com a maior queda na quantidade de açúcares no meio. De Lima et al (2010), trabalhando com *Lactobacillus rhamnosus* teve o maior crescimento com controle de pH( 6,7) entre 8-12h. Nesta faixa, também, houve significativo decréscimo na concentração da fonte carbono.

Os resultados encontrados estão de acordo com as fases esperadas do crescimento microbiano. Observa-se a fase lag, a fase de adaptação ao meio de cultura, de 0 a 3 horas e então o micro-organismo entra na sua fase exponencial.

Esta fase é influenciada pelas condições ambientais (MADIGAN, 2010), que no caso desta fermentação foram as ideais ao micro-organismo, isso é um dos fatores que contribuem para o maior crescimento nesta faixa.

De maneira lógica é possível concluir que durante a fase de maior crescimento do micro-organismo deve haver maior consumo de açúcar, para realização das atividades metabólicas e para o próprio crescimento, o que foi verificado na fermentação em questão.

#### 4.5 Fermentação em batelada com alimentação com fluxo constante

De modo semelhante a fermentação anterior foram feitas análise da produção de ácido láctico, consumo de açúcar e crescimento da biomassa. Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 2 a seguir:

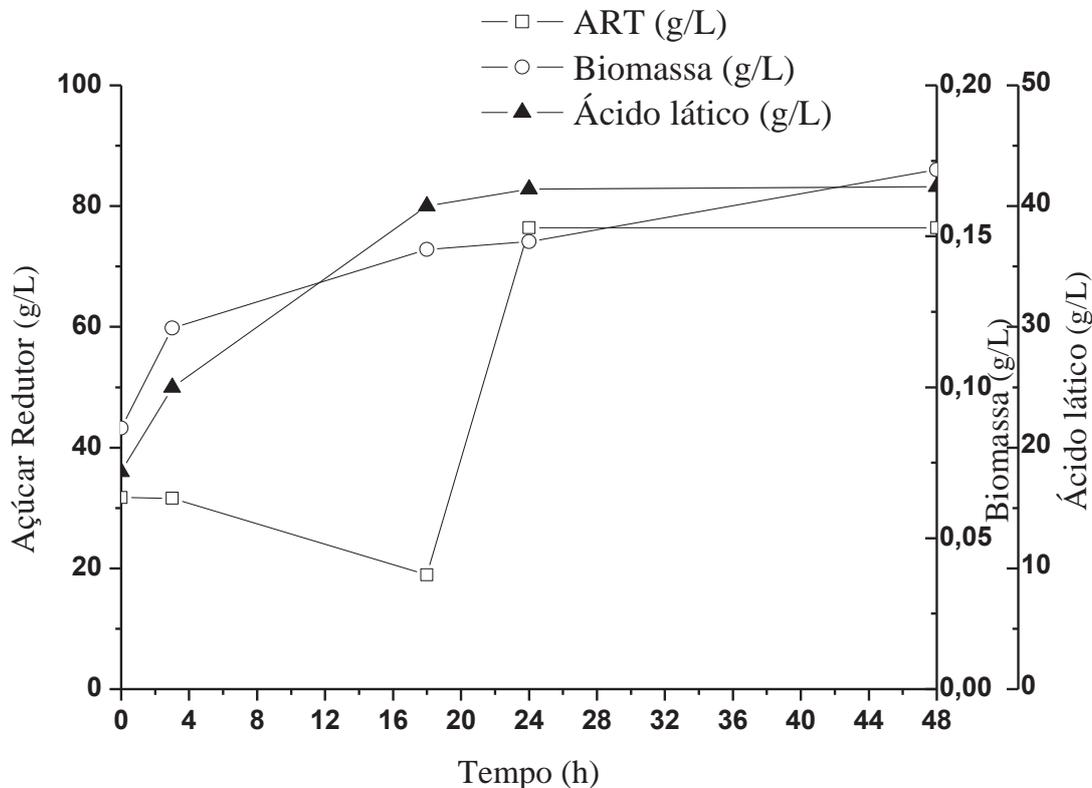


Gráfico 2: Concentrações de substrato, produto e biomassa em função do tempo de fermentação.

Como pode ser visto, a partir de 6 horas foi adicionada a alimentação, que continha 850g/L de glicose e 3% de AMM. Há uma fase com pouco crescimento, pois o micro-organismo está se adaptando ao novo meio. A formação de ácido láctico é parcialmente ligada ao crescimento do micro-organismo, isto pode ser observado comparando-se as curvas de biomassa e ácido láctico. A produção de ácido láctico acompanha o crescimento da biomassa.

Neste tipo de fermentação foi conseguida uma maior concentração de ácido láctico quando comparada com a primeira fermentação em batelada simples, chegando a concentrações de 41,6 g/L. Bai et al., (2003) utilizando *Lactobacillus lactis* em um meio de cultura composto por glicose encontrou que os resultados na fermentação em batelada alimentada foram semelhantes aqueles da fermentação do tipo batelada simples quando se tratava da concentração de açúcar residual e da concentração do ácido láctico. Porém em relação a produtividade e crescimento estes foram 82% e 64% maiores do que na fermentação em batelada.

Li et al., (2010) trabalhando com *Lactobacillus rhamnosus* quando usaram retroalimentação glicose na fermentação do tipo batelada alimentada conseguiram uma produção de 170g/L de ácido láctico.

Wang et al., (2010) partindo de uma concentração de 222,5g/L de mandioca na forma de pó obtiveram uma concentração de 175,4g/L de L(+) ácido láctico numa fermentação em batelada de sacarificação simultânea (SSF). Pelo fato da mandioca estar em pó foi possível aumentar a concentração de açúcar, diferente da água de manipueira, usada neste trabalho, que não há métodos para aumentar a concentração de açúcar inicial.

Xiaodong et al., (1997) usou como fonte de carbono diversos resíduos da agroindústria, como amido de milho, amido de mandioca, amido de trigo, amido de arroz e fécula de batata. Constataram que uma menor produção de ácido láctico ( 4,8 g/L) se ocorre durante o uso de amido de mandioca. Por outro lado quando foi adicionada uma fonte extra de nitrogênio ao meio, a peptona, *Lactobacillus amylovorus* apresentou o melhor crescimento e uma melhor produção de ácido láctico, 7,7g/L.

Isto indica que o uso de resíduos para a produção de ácido láctico é possível, no entanto é necessário que haja uma otimização do meio de cultivo, com o objetivo

de verificar a necessidade de adicionar nutrientes ou não para uma melhor produção do ácido.

## 5. CONCLUSÕES

- ◆ A metodologia do planejamento delineamento composto central, apresentou-se como uma ferramenta muito útil e aplicável para determinar o comportamento das variáveis independentes sobre a síntese de ácido láctico, evitando análises excessivas e apresentando informações generalizadas sobre a influência dos parâmetros independentes no processo;
- ◆ A linhagem de *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii* Y15C apresentou potencial para produzir ácido láctico na forma isomérica D(-);
- ◆ Foi possível aumentar a produção de ácido láctico usando como fonte de carbono um resíduo agroindustrial, a água de manipueira;
- ◆ Utilizando água de manipueira hidrolisada, como substrato, o *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii* Y15C foi capaz de produzir 25,8 g/L de ácido láctico em batelada simples e 41,6 g/L de ácido láctico em batelada alimentada. Esta última demonstrou ser o método mais adequado para a produção de ácido láctico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, B.; CHIPMAN, H.; VIJAYAN, K. Some risks in the construction and analysis of supersaturated designs. **Technometrics**, v.41, p.135-141, 1999.

ACHENBACH LA, CAREY AJ, MADIGAN MT. Photosynthesis and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. **Appl Environ Microbiol.** v.67 p.2922–2926, 2001.

AESCHLIMANN, A.; DI STASI, L.; VON STOCKAR, U. Continuous production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus* in two chemostats in series. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, 926-932, 1990.

AMRANE, A. Seed culture and its effect on the growth and lactic acid production of *Lactobacillus helveticus*, **Journal of General and Applied Microbiology**, v.49, p. 21–27, 2003.

AMRANE, A. Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 345–352, 2005.

ANDERSON, R.L. Complete factorials, fractional factorials and confounding. CHEW, V. Experimental design in industry. New York, John Wiley eSons, Inc.p.59-107, 1957.

ANTONY, J.; KATE, M.; FRANGO, A. A strategic methodology to the use of advanced statistical quality improvement techniques. **The TQM magazine**, v.10, p.169-176, 1998.

ANURADHA, R.; SURESH, A.K.; VENKATESH, K.V., Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. **Process Biochemistry**, v. 35, p.367–375, 1999.

ARASARATNAM, V..; SENTHURAN, A.; BALASUBRAMANIAM, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p. 482–486, 1996.

AURAS, R.A.; HARTE, B.; SELKE, S. Poly (lactide): moisture sorption characteristics and storage consequences. In: ANTEC 2003 THE 61 ST **Annual Technical Conference of the Society of Plastics Engineers**, n.61, p.4-8, 2003.

BAI,D.M, WEI,Q, YAN,ZH, ZHAO,X.M, LI,X.G, XU,S.M. Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid. **Biotechnology Letters.** v 25 p. 1833–1835, 2003.

BARNSTORF, S. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants. **Journal of Orthopaedic Research**, v.23,p.802–809, 2005.

BOUDRANT, J.; MENSCHUTINA, N.V.; SLOROHODOV, A.V.; GUSEVA, E.V.; FICK, M. Mathematical modeling of cell suspension in high cell density conditions: Application to Lactic acid fermentation using *Lactobacillus casei* in membrane bioreactor. **Process Biochemistry**. v.40, p. 1641-1647, 2005.

BUCHTA, K. Lactic acid. In: H.J. Rhem and G. Reed, Editors, Biotechnology. Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources, V.C.H., Weinheim. v.3 p. 409–417, 1983.

BUSTOS, G.; MOLDES, A.B.; ALONSO, J.L.; VAZQUEZ, M. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryneformis* using response surface methodology. **Food Microbiology**, v.21, p. 143-148, 2004.

BUTTON, S.T.. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultado. São Paulo. Universidade Estadual de Campinas. /Apostila, 2001.

CALLON C, MILLET L, MONTEL MC. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. **J Dairy Res**. v71 p231–244, 2004

CAPLICE, E., G.F. FITZGERALD. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**v 50.p 131-149, 1999

CARR,F.J;CHILL,D.;MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology** v. 28, 281–370, 2002.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: \_\_\_\_\_.(Coord.). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4. cap. 1, p.13-37. (Serie Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas), 2001.

CHO, G. S.; KI DO H. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Traditional Jeotgal Product in Korea. **Ocean Science Journal**, v. 41 No. 2, p 113-119, 2006.

CHOPIN, A. Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 21–38, 1993.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. Experimental designs. 2.ed. London, John Wiley, 1997.

COELHO, L F. Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico. Tese de doutorado, 2011. Universidade Estadual Paulista campus Rio Claro

COELHO,L.F, De Lima,C.J.B, Bernardo,M.P. Alvarez, G.L.M, Contiero, J. Improvement of L(+)-lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. **J Sci Food Agric**, v.90, p.1944–1950, 2010

COLEMAN, D.E.; MONTGOMERY, D.C. A systematic approach to planning for a designed industrial experiment. **Technometrics**, v.35, p.1-12, 1993.

COSTA, S.G.V.A.O.; LEPINE, F.; MILOT, S.; DEZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.1063–1072, 2009.

CURRY, B.; CROW, V. *Lactobacillus casei* group. In H. Roginski, J. W. Fuquay, eP.F. Fox (Eds.). Encyclopedia of dairy sciences, v.3, p. 1488–1493. London: Academic Press, 2003.

DAESCHEL, M.A.; ANDERSON, R.E.; FLEMING, H.P. Microbial ecology of fermenting plant materials. **FEMS Microbiology Reviews**, v.46, p. 357-367, 1987.

DAKIN, J.C.; RADWELL, J.Y. Lactobacilli causing spoilage of acetic acid preserves. **Journal of Applied Bacteriology**, v.34, p.541-545, 1971.

DATTA, R.; TSAI, S.P; BONSIGNOR, P.; MOON, S.; FRANK, J. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology**, v.16,p.221-231, 1995

DE LIMA,C.J.B, COELHO, L.F, DA SILVA, G.P. ALVAREZ, G.L.M., Contiero, J. L(+) Lactic Acid Production by New *Lactobacillus rhamnosus* B 103. **J Microbial Biochem Technol.** v.2 p. 064-069, 2010.

DEVRIESE, L. A., POT, B.;COLLINS, M. D. A review: Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species group. **J. Appl. Bacteriol.** v. 75, 399–408, 1993

DICKS, L.M.T.; DELLAGLIO, F.; COLLINS, M.D. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.395–397, 1995.

DING, S.; TIANWEI, T. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. **Process Biochemistry**, v.41, p.1451-1454, 2006.

DUMBREPATIL, A.; ADSUL, M.; CHAUDHARI, S.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 74, n. 1, p. 333–335, 2008.

EHRMANN, M.A., VOGEL, R.F. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science and Technology.** v 16, p 31–42, 2005

ENNAHAR,S; CAI, Y; FUJITA, Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16s ribosomal dna analysis. **Applied And Environmental Microbiology.** v. 69 p. 444–451, 2003.

ERCOLINI, D., G. MOSCHETTI, G. BLAIOTTA, S. COPPOLA. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. **Curr. Microbiol.** v 42,p 199-202, 2001.

FAO. Food agricultural organization—statistical—database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2005.

FARROW, J.A.E.; COLLINS, M.D. DNA base composition, DNA-DNA homology and longchain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. **Journal of General Microbiology**, v.130, p. 357-362, 1984.

FUKUI, S.; OI, A.; OBAYASHI, A.; KITAHARA, K. Studies on the pentose metabolism by microorganisms. A new type-lactic acid fermentation of pentoses by lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.3, p. 258-268, 1957.

GARVIE, E.I. *Leuconostoc oenos* sp. nov. **Journal of General Microbiology**, v.48, 431-438, 1967.

GIBSON, G.R., R. FULLER. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and probiotics for human use. **J. Nutr.** v. 130, p 391S- 395S, 2000.

GOKSUNGUR, Y.; GUVENC, U. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.69, p.399–404, 1997.

GOKSUNGUR, Y.; GUVENC, U. Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.74, p.131–136, 1999.

GOLLWITZER, H.; THOMAS, P.; DIEHL, P.; STEINHAUSER, E.; SUMMER, B.; GROSS, R.A.; KALRA, B. Biodegradable polymers for the environment. **Science**, v.297, p.803-807, 2002.

HOFVENAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*, **Enzyme and Microbial Technology**. v. 20, p. 301–307, 1997.

HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH PHA, STALEY JT, WILLIAMS ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn. William and Wilkins, MD, pp 527-564, 1994.

HOLZAPFEL, H.W.; FRANZ, C.M.A.P (2004). The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and safety issues. In S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (p. 199–247). New York: Marcel Dekker, Inc.

HOLZAPFEL, W.H., P. HABERER, R. GEISEN, J. BJÖRKROTH, U. SCHILLINGER. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.** v 73, p 365S-373S, 2001

HUANG W-C; TANG, I. C. Bacterial and yeast cultures – process characteristics, products, and applications. In. YANG, S.T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. p185-223, 2007.

HUANG, L.P.; JIN, B.; LANT, P.; ZHOU, J. Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p.899–906, 2003.

HUANG L, LU Z, YUAN Y, LÜ F, BIE X. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v.33 p.55-61, 2006.

HUJANEN, M.; LINKO, Y. Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)- lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**,v.45, p.307–313, 1996.

JAY, J.M. Fermentation and fermented dairy products,. In **Modern Food Microbiology**, 6th edition. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, USA, p. 113-130, 2000.

JOHN, R.P; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Simultaneous saccharification and L(+)- lactic acid fermentation of protease-treated wheat bran using mixed culture of lactobacilli.**Biotechnology Letters**, v. 28, p.1823–1826, 2006.

JURAN, J.M.; GRZYNA, J.R.; F.M.; BINGHAM JR., R.S. Quality control handbook. 3. Ed. New York, McGraw-Hill. Cap. 27, p.1-49, 1951.

KANDLER, O.; WEISS, N. *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 1209-1234, 1986.

KASHKET, E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 233–244, 1987.

KLOVRYCHEV, M. F.; KOROLEV, P. N.; BULGAKOVA, V. G. Effect of copper ions and unfavourable pH on protein and RNA synthesis of *Candida utilis*. **Microbiology**, v.47, p.357–361, 1979.

KOTZAMANIDIS, C.; ROUKAS, T.; SKARACIS, G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 441–448, 2002.

KUIPERS, O.P., G. BUIST, J. KOK. Current strategies for improving food bacteria. **Res. Microbiol**. 151, 815-822, 2000.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principios de Bioquímica, 3a ed. Sarvier, 2002.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Citric acid production by *Aspergillus niger* from “Manipueira”, a manioc liquid residue. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 299-304, 1995.

LICK S. Typing systems for lactobacilli. **Milchwissenschaft**. v58 p 256– 260, 2003.

LIEW, S.L.; ARIFF, A.B.; RAHA, A.R.; HO, Y.W. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p.137–142,2005.

LONGACRE, A., REIMERS, J.M., GANNON, J.E., WRIGHT, B.E. Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields, **Fungal Genetics and Biology**, v.21, p. 30–39, 1997.

MADIGAN, MICHEL T.; MARTINKO, JOHN M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. . Microbiologia de BROCK, 12a ed., 2010.

MANOME, A.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. The ratio of L-form to Dform of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 44, p. 371-374, 1998.

MAROSTICA, M.R JR.; PASTORE, G.M. Production of R-(+)-\_terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava wastewater as medium. **Food Chemistry**, v.101, p.345–350, 2007.

MARTAK, J., SCHLOSSER, S., SABOLOVA, E., KRISTOFIKOVA, L., ROSENBERG, M. Fermentation for lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1573–1583, 2003.

MIURA S., DWIARTI L., ARIMURA T., HOSHINO M., TIEJUN L., OKABE M. Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, p.19–23, 2004.

MIURA, S.; ARIMURA, T.; HOSHINO, M.; KOJIMA, M.; DWIARTI, L.; OKABE, M., Optimization and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK- 96-1196 in airlift bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p.65–69, 2003.

MOHANIA D., NAGPAL R., KUMAR M., BHARDWAJ A., YADAV M., JAIN S., MAROTTA F., SINGH V, PARKASH O., YADAV H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**. v 9; p 190–198, 2008.

MONTGOMERY, D.C Diseno y analisis de experimentos. Trad. por Jaime Delgado Saldivar. Mexico, Iberoamerica, 1991.

MUNDT, J.O. Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 33, p. 550-553, 1970

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MANCILHA, I.M., ROBERTO, I.C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p.437–444, 2008.

NAIR, P.S., SURENDRAN, P.K. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. **Journal Of Culture Collections**.v. 4,p. 48-52, 2005.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A.L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.7, n.2, p.167-179, 2004.

NAVEENA, B.J.; ALTAF, Md.; BHADRIAH, K.; REDDY,G. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **ioresource Technology**, v.96, p. 485-490, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v.97, p.336–341, 2006.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J.C. Effect of pH on the morphology of *Lactobacillus helveticus* in free-cell batch and immobilized-cell continuous fermentation for lactic acid production from whey permeate. **Food Biotechnology**, v.7, p.235–251, 1993.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Rev. Microbiol.** v. 28, n.1, p.25-31, 1997.

OLIVEIRA, L.C. (1999). Uso integrado do metodo QFD e de tecnicas estatisticas de planejamento e analise de experimentos na etapa do projeto do produto e do processo. Belo Horizonte, 270p. Dissertacao (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

ORLA-JENSEN. S. (1919) The Lactic Acid Bacteria. Fred Host and Son. Copenhagen.

PANESAR, P.S; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v.105, p. 1–14, 2007.

PARK, E. Y.; KOSAKAI, Y.; OKABE, M. Efficient production of L(+) lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. **Biotechnology Progress**, v.14, p. 699–704, 1998.

PELEG, M. A model of temperature effects on the microbial populations from growth to lethality. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.68, p.83–89, 1995.

PONDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAN, P. Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. **Asiatech Publishers**, New Delhi, 2001

PRITCHARD, G.; COOLBEAR, T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.179–206, 1993.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1a. Ed. – Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROJAN, P.J.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. L(+)-Lactic acid recovery from cassava bagasse based fermented medium using anion exchange resins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, 2008.

ROSSO, L.; LOBRY, J.R.; BAJARD, S.; FLANDROIS, J.P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.610–616, 1995.

SAKAI, K.; TANIGUCHI, M.; MIURA, S.; OHARA, H.; MATSUMOTO, T.; SHIRAI, Y. Making plastics from garbage – a novel process for poly-L-lactate production from municipal food waste. **Journal of Industrial Ecology**, v.7, p. 63-73, 2004.

SAKATA, M.M.; RINCON, M.C.A. do; DUEK, E.A.R. Estudos da interação polímero/cartilagem/osso utilizando Poli (ácido láctico – co – ácido glicólico) e Poli (p-Dioxanona) em condilo femoral de coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.24, n.3, p.176-180, 2004.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends Biotechnol.** v.26, n.2, p. 100-108. 2008.

SCHILLINGER, U., LUCKE, F.K. Identification of Lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, v. 4, p. 199-208, 1987.

SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Aproveitamento de agroindustriais: ácido láctico uma alternativa. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.25, n.1, p.37-40, 1991

SNEATH, P.H.A., J.G. HOLT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edition. Vol 1, p. 64. A Waverly Company, **Williams & Wilkins**, Springer-Verlag, NY, USA, 2001

SODEGARD, A., STOLT, E M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, v.27, p.1123–1163, 2002

STEINBERG, M.D.; HUNTER, W.G. Experimental design: review and comment. **Technometrics**, v.26, n.2, p.71-130, 1984.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 36, p 1-29, 1997.

SUJAYA, N.; AMACHI, S.; YOKOTA, A.; ASANO, K.; TOMITA, F. Identification and characterization of lactic acid bacteria in *ragi tape*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 17 p. 349-357, 2001

TANNOCK GW, TILSALA-TIMISJARVI A, RODTONG S, NG J, MUNRO K, ALATOSSAVA T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Appl Environ Microbiol** 1999; v65 p 4264–7.

TAY, A., YANG, S.T. Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor, **Biotechnology and Bioengineering**, v.80, p. 1–12, 2002.

TSAKALIDOU, E.; MANOLOPOULOU, E.; KABARAKI, E. The combined use of wholecell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, v.17, p. 444–58, 1994.

TSUGE, T., TANAKA, K., ISHIZAKI, A. Development of a novel method for feeding a mixture of L -lactic acid and acetic acid in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for poly-D -3-hydroxybutyrate production. **A Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.91, p. 545–550, 2001.

TUOMINEN, JUKKA. Chain linked lactic acid polymers: Polymerization and biodegradation studies. Finlandia, ed. Polymer Technology Publication Series, 2003

U.S patent 4,888,191 (Dec. 19, 1989) R.J. Anders, J.G. Cervený and A.L. Milkowski (to Oscar matuer foods Corp., U.S.A.) Lactic acid and lactates, Product Lulletin, Purac, Inc., Arlington Heights, IL (1989).

Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 333–335, 2008.

VIANA, R.; YEBRA, M. J.; GALAN, J. L.; MONEDERO, V.; PEREZ-MARTINEZ, G. Pleiotropic effects of lactate dehydrogenase inactivation in *Lactobacillus casei*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, p. 641-649, 2005

VICTORELLI, R. **Produção de l-ácido láctico a partir de células bacterianas imobilizadas**. Dissertação de mestrado, 2011. Universidade Estadual Paulista campus Rio Claro.

WANG, L., et al. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2010.05.018, 2010

WEE, Y.J.; KIM, J.N.; YUN, J.S.; RYN, H.W. Utilization of sugar molasses for economical L(+) lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.568-573, 2004.

WERKEMA, M.C.C.; AGUIAR, S. Planejamento e análise de experimentos: como identificar as principais variáveis influentes em um processo. Belo Horizonte, Fundação Christiano Ottoni. V.8, 1996.

WOOD, B.J.B., HOLZAPFEL, W.H. The genera of lactic acid bacteria (1st ed.). Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995.

XIAODONG, W.; XUAN, G.; RAKSHIT, S.K. Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. **Biotechnology Letters**, v.19, n.9, p.841-843, 1997.

YANAGIDA, F.; CHEN, Y.; SHINOHARA, T. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from soils in vineyards. **J. Gen. Appl. Microbiol** v.51 p 313–318, 2005.

YANG W.C., ZHONG, J.L. TSAO, G.T. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system, **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 51, p. 57–71, 1995.

YEN, H.W.; CHEN, T.J.; PAN, W.C.; WU, H.J. Effects of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p. 437–441, 2010.

YIN, P.M., NISHINA, N., KOSAKAI, Y., YAHIRO, K., PARK, Y., OKABE, M. Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an airlift bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p.249–253, 1997.

YU, L.; LEI, T.; REN, X.; PEI, X.; FENG, X. Response surface optimization of L(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, 496-502, 2008.

YUKIHIRO TASHIRO, Y. KANEKO W. SUN, Y. SHIBATA, K. INOKUMA, K. ZENDO, T. SONOMOTO, K. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.89 p. 1741–1750, 2011.

ZHANG, Y, CONG, W, SHI, S Y. Application of a pH Feedback-Controlled Substrate Feeding Method in Lactic Acid Production. **Appl Biochem Biotechnol** v. 162 p.2149–2156, 2010

ZHENG LI, LU, J, ZHAO, L, XIAO, K, TAN, T. Improvement of L-Lactic Acid Production under Glucose Feedback Controlled Culture by *Lactobacillus rhamnosus*. **Appl Biochem Biotechnol** . v. 162. P. 1762–1767, 2010