
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**Produção e purificação de L(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*
utilizando processo de batelada alimentada**

MARCELA PIASSI BERNARDO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas-Microbiologia Aplicada.

Rio Claro, 2014

MARCELA PIASSI BERNARDO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L(+) ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus rhamnosus* UTILIZANDO PROCESSO DE BATELADA ALIMENTADA.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientação: Dra. Luciana Fontes Coelho

Rio Claro

2014

547.29 Bernardo, Marcela Piassi
B523p Produção e purificação de L(+) ácido lático por
Lactobacillus rhamnosus utilizando processo de batelada
alimentada / Marcela Piassi Bernardo. - Rio Claro, 2014
76 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Coorientador: Luciana Fontes Coelho

1. Fermentação. 2. Resíduo agroindustrial. 3. Celite. I.
Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

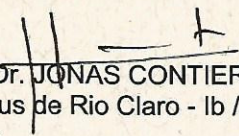
TÍTULO: Produção e purificação de L(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* utilizando processo de batelada alimentada

AUTORA: MARCELA PIASSI BERNARDO

ORIENTADOR: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA FONTES COELHO

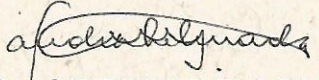
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Campus de Rio Claro - Ib / Instituto de Biociências de Rio Claro


Profa. Dra. EDWIL APARECIDA DE LUCCA GATTAS

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas


Profa. Dra. SANDRA HELENA DA CRUZ

Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Usp

Data da realização: 21 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jonas Contiero pela orientação e paciência. Obrigada por todos os momentos dedicados a mim e a realização deste projeto. Depois de 5 anos de orientação realmente só tenho a agradecer a oportunidade de me tornar uma pesquisadora e de aprender um pouco sobre esse mundo onde nem tudo é fácil, onde tudo exige muito esforço, mas que no final a satisfação é muito grande. “ Não se preocupe com o problema, se ocupe do problema” não é isso?! Obrigada Jonas!

À FAPESP pela bolsa de estudos.

Às minhas “Co’s” Dra. Luciana Fontes Coelho e Dra. Daiane Cristina Sass por toda a paciência, dedicação, por toda a ajuda desprendida durante todo esse tempo. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por me corrigir, por mostrar os caminhos, por tornar essa caminhada possível e também mais agradável. Vocês estarão comigo sempre!

Ao pessoal do laboratório (Rô, Mariana, Paola, Susan, Lú, Kate, Vinicius, Daiane, Natália e Batata). Obrigada por todos os momentos de descontração, pela convivência do dia a dia, pela paciência que tiveram comigo, pelas conversas edificantes e pela amizade dada a mim. Obrigada, sem vocês este trabalho não teria sido tão prazeroso de ser realizado.

Ao pessoal do Madá, pelas risadas infinitas, pelos momentos de lazer e pela amizade. Ao Denis por sempre me escutar e incentivar (acredito tenha aprendido um pouco sobre ácido láctico!), a Paulinha, Giovana, Pulga, Fernanda, Natália, Xuxa enfim, a todos, muito obrigada.

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado (inclusive no congresso!), que meu deu forças para continuar quando as coisas estavam complicadas. Por me apoiar em todas as decisões tomadas. Obrigada! Te amo!

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

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

RESUMO

O presente trabalho apresenta um estudo sobre a produção de L(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* B 103 utilizando diversas estratégias fermentativas com o objetivo de aumentar a produção. Foram também realizados estudos sobre o processo de purificação do ácido em questão. Foi utilizado o meio otimizado, essencialmente composto por resíduos da agroindústria: 60,00 g/L de lactose de soro de queijo (90,00 g/L de açúcares redutores totais), 45,00 mL/L de água de maceração de milho, 1,00 mL/L de Tween 80 e 0,075 g/L de sulfato de manganês.

Foram realizados 4 tipos de fermentações em batelada: batelada simples, batelada alimentada por fluxo constante, batelada alimentada por pulso e batelada alimentada por pH-stat. Foram estudados os parâmetros cinéticos, de produção e produtividade. A fermentação com melhores resultados foi a batelada alimentada por pH stat, quando o meio de alimentação foi composto exclusivamente por resíduos da agroindústria (soro de queijo e água de maceração de milho). A produção foi de 143,70 g/L e a produtividade, para ácido láctico, em 24, 48 e 96 horas foram 2,70; 2,25 e 1,49 g/L/h respectivamente. Para a fermentação em batelada a produção foi de 57,00 g/L, para a batelada alimentada por pulso foi de 98,90 g/L e para a batelada alimentada com fluxo constante foi de 80,45 g/L.

Para a extração e purificação do ácido láctico foram realizados estudos utilizando carvão ativado, troca iônica, nanofiltração e filtração à vácuo utilizando carvão ativado e celite. A dupla filtração à vácuo utilizando carvão ativado e celite apresentou melhor recuperação de ácido láctico (71%), relação açúcares redutores/ácido láctico de 0,5% e 100% de remoção de proteínas.

Palavras chave: Produção de ácido láctico. Resíduo agroindustrial. Purificação. Celite.

ABSTRACT

This work presents study of production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* B 103 using different fermentative strategies with the aim of increase the production by fed batch fermentation. The study about the purification process of the lactic acid was also made. Optimized medium used was essentially composed of agribusiness residues: 60,00 g/L of lactose from whey (90,00 g/L of total reducing sugars), 45,00 mL/L of corn steep liquor, 1,00 mL/L of Tween 80 and 0,075 g/L of manganese sulfate.

Four different kinds of batch fermentation were made: simple batch, constant feed rate fed-batch, pulse fed-batch and pH stat. The kinetic parameters of production and productivity were investigated during this study too. The best fermentation was the pH stat with feed medium containing only whey and corn steep liquor. The production was 143,70 g/L and the productivity for lactic acid in 24, 48 and 96 hours were 2,70; 2,25 and 1,49 g/L/h respectively. For the batch process the production was 57,00 g/L, for pulse fed-batch was 98,90 g/L and for constant feed fed-batch was 80,45 g/L.

For extraction and purification of lactic acid different process were studied too: activated carbon, ion exchange, ultrafiltration, nanofiltration and vacuum filtration using activated carbon and celite. The double vacuum filtration using activated carbon and celite was the best process with recovery of lactic acid of 71%, lactic acid and reducing sugars relation of 0,5% and 100% of protein remotion.

Key Word: Lactic Acid Production. Residues of agribusiness. Purification. Celite.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Micro-organismos produtores de ácido láctico	10
2.1.1 <i>Lactobacillus</i>	11
2.2 Resíduos utilizados para produção de ácido láctico.....	13
2.2.1 Soro de queijo	14
2.2.2 Água de maceração de milho.....	15
2.3 Estratégias fermentativas.....	16
2.4 Extração e purificação do ácido láctico.....	18
2.5 Aplicações do ácido láctico.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Micro-organismo	22
4.2 Substratos	23
4.3 Fermentações	23
4.3.1 Produção de L(+) ácido láctico por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> B103	23
4.3.1.1 Batelada alimentada por fluxo constante.....	24
4.3.1.2 Batelada alimentada por pulso.....	24
4.3.1.3 Batelada alimentada por pH stat.....	24
4.4 Cinética dos processos fermentativos e parâmetros estequiométricos	25
4.5 Purificação e recuperação do ácido láctico do caldo de fermentação	25
4.5.1 Carvão ativado	25
4.5.1.1 Determinação da concentração de carvão ativado.....	25
4.5.1.2 Análise estatística	26
4.5.1.3 Purificação utilizando carvão ativado.....	28
4.5.1.4 Purificação utilizando carvão ativado e celite	29
4.5.2 Troca iônica	29
4.5.2.1 Preparação das resinas	29
4.5.2.2 Capacidade de adsorção das resinas	29
4.5.2.3 Recuperação do ácido láctico	30
4.5.2.4 Coluna de troca iônica	30

4.5.3 Nanofiltração	31
4.6 Metodologia analítica	32
4.6.1 Quantificação do ácido lático	32
4.6.2 Determinação da concentração de açúcares redutores e proteínas	32
4.6.3 Determinação da concentração celular	32
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Cinética de crescimento.....	32
5.2 Fermentação em batelada	33
5.3 Batelada alimentada	34
5.3.1 Batelada alimentada por pulso.....	34
5.3.2 Batelada alimentada por fluxo constante	36
5.3.3 Batelada alimentada por pH stat.....	37
5.3.3.1 Meio de alimentação: lactose (reagente puro) + AMM + NaOH 5N.....	38
5.3.3.2 Meio de alimentação: soro de queijo + AMM +NaOH 10N.....	39
5.3.3.3 Meio de alimentação: soro de queijo + AMM+NaOH 5N.....	40
5.3.3.4 Meio de alimentação: somente soro de queijo e AMM.....	40
5.4 Comparação da produtividade e produção entre as fermentações.....	42
5.5 Comparação entre os fatores de conversão das fermentações.....	44
5.6 Planejamento do composto central e superfície de resposta.....	45
5.7 Purificação utilizando carvão ativado.....	50
5.8 Purificação utilizando carvão ativado e celite	51
5.9 Troca iônica	52
5.9.1 Capacidade das resinas IRA 67 e IRA 400	52
5.9.2 Teste do eluente	59
5.9.3 Recuperação e purificação do ácido lático utilizando coluna de troca iônica	60
5.9.4 Nanofiltração	61
5.9.5 Rendimento do processo global de purificação	62
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) é um ácido orgânico amplamente empregado em diversos setores da indústria. Na indústria farmacêutica, o ácido láctico pode ser utilizado como matéria prima na produção de cosméticos, formulação de pomadas e loções; na indústria química pode ser empregado na produção de bases químicas e solventes orgânicos e na indústria alimentícia atua como acidulantes, flavorizantes, aromatizantes e emulsificantes (WEE et al., 2004; ALTAF et al., 2005).

Outro grande campo de interesse do ácido láctico está na produção de plásticos renováveis e biodegradáveis a partir do ácido polilático (PLA), tais como embalagens de alimentos e utensílios plásticos variados, os quais podem substituir os produtos fabricados com matéria prima à base de petróleo (DATTA et al., 1995). Além disso, os biopolímeros de PLA por serem assimiláveis pelo corpo humano podem ser empregados na medicina, na regeneração de tecidos, suturas, fixações de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, fixação de ligamentos e implantes (SAKATA et al., 2004).

O ácido láctico tem em sua estrutura um carbono assimétrico, chamado de carbono quiral. Este carbono confere a molécula a propriedade de desviar o plano da luz polarizada, tanto para a esquerda [isômero levógiro L(+)] quanto para a direita [isômero dextrógiro D(-)] (ZHOU et al., 2003) (Figura 1). Os polímeros produzidos a partir de ácido láctico D(-) e L(+) têm mostrado propriedades físico-mecânicas comparáveis aos plásticos produzidos a partir de reservas fósseis de energia, porém com elevadas taxas de biodegradabilidade. O ácido láctico pode ser obtido tanto pela ação fermentativa de bactérias, fungos e leveduras quanto por síntese química. A síntese química do ácido láctico sempre produz uma mistura racêmica, já a produção fermentativa de ácido láctico permite a obtenção dos isômeros L(+) e D(-) ácido láctico separadamente e também de DL ácido láctico. A produção dos diferentes isômeros se dá em função da espécie de micro-organismo selecionada para fermentação. A pureza óptica do ácido láctico é o fator crucial nas propriedades físicas do PLA (SODEGARD e STOLT, 2002).

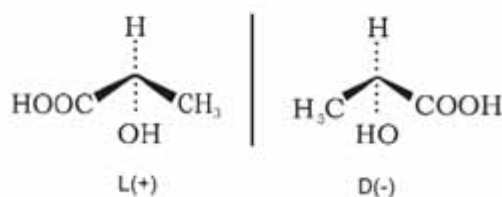


Figura 1: Estrutura do ácido láctico e seus isômeros

Os processos fermentativos são mais vantajosos por serem mais econômicos (SILVA e MANCILHA, 1991). Aproximadamente 90% do total do ácido lático produzido no mundo é obtido por fermentação utilizando bactérias (ZHOU et al., 2006).

Diversos subprodutos e matérias-primas da agroindústria têm sido empregados para a produção de ácido lático, em função da alta disponibilidade e baixo custo, por exemplo, bagaço, melão e caldo de cana de açúcar (DE LIMA et al., 2009; DE LIMA et al., 2010a; COELHO et al., 2011b), soro de queijo (DE LIMA et al., 2010b), manipueira (COELHO et al., 2010) além da água de maceração de milho (AMM) e do autolisado de levedura.

Para otimizar a produção de ácido lático, alguns parâmetros devem ser considerados durante a fermentação, tais como: concentração de nutrientes, pressão parcial de oxigênio e dióxido de carbono, pressão osmótica, variação do pH, o “stress” provocado pela agitação sobre as células, além da temperatura de cultivo, do tempo de fermentação e do tipo de fermentação, contínuo ou por batelada (BOUDRANT et al., 2005).

A produção de ácido lático pode ser inibida em função de altas concentrações da fonte de carbono. Para evitar esse problema, diferentes medidas vêm sendo adotadas: adição de enzimas ao meio de fermentação em batelada, proporcionando a quebra da fonte de carbono e produção de ácido lático simultaneamente; Modificações das bactérias lácticas através da ação de engenharia genética tornando-as capazes de quebrar a fonte de carbono em seus monômeros. E por fim, uso de processos em batelada alimentada, com diferentes métodos de alimentação tem se apresentado como uma excelente opção de solução para este problema (ZHANG et al., 2010).

Terminado o processo fermentativo inicia-se o processo de purificação do ácido lático. A primeira etapa é separar as células do caldo fermentado. Após a centrifugação o meio de fermentação ainda apresenta muitas impurezas no sobrenadante, por exemplo, íons (sódio, sulfato), proteínas e açúcares. Como sequência ao processo de obtenção do ácido lático, resinas trocadoras de íons podem ser usadas com o objetivo de remover essas impurezas. Desde que haja a presença de íons lactato, este pode ser adsorvido em resinas trocadoras de ânions, para que o ácido lático seja recuperado. Existem outros métodos de recuperação como a extração (SUN et al., 2006), eletrodialise (MADZINGAIDZO et al., 2002). Entretanto, todas as técnicas precisam de maiores esforços na otimização para que a grande demanda de produção de ácido lático seja atendida (WU et al., 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 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, uma vez que esses micro-organismos são obrigatoriamente aeróbios. Além disso, a eficiência dos processos produtivos utilizando fungos 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 que os 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), pertencem ao Filo Firmicutes. Já no Filo Actinobacteria estão agrupadas bactérias como *Aerococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium* (SNEATH e HOLT, 2001) e também *Bifidobacterium* (GIBSON e FULLER, 2000; HOLZAPFEL et al., 2001).

Bactérias lácticas são caracterizadas basicamente por serem Gram positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos. Podem ter formas de bastão ou cocos. Quanto às 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 micro-organismo, este pode ser classificado de acordo com a fonte de carbono em bactérias homofermentativas, como *Lactococcus* e *Streptococcus*, que tem rendimento teórico 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 também ser classificadas como bactérias heterofermentativas (*Leuconostoc* e *Weissella*) seguindo a rota do fosfogliconato fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e gás carbônico em quantidades equimolares (LEHNINGER et al., 2002, CAPLICE e FITZGERALD, 1999; JAY, 2000; KUIPERS et al., 2000).

As bactérias lácticas têm capacidade biossintética limitada que confere dependência de meio nutricional complexo, com vitaminas e aminoácidos para o crescimento (STILES e HOLZAPFEL, 1997). Os principais aminoácidos requeridos para a fermentação láctica são a leucina, isoleucina e valina (OLIVA-NETO e 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.

2.1.1 *Lactobacillus*

A divisão clássica de Orla-Jensen (1919) para o gênero *Lactobacillus* foi baseada nas características fermentativas desses micro-organismos (Tabela 1):

1) Homofermentativo obrigatório 2) Heterofermentativo facultativo 3) Heterofermentativo obrigatório.

Esta divisão está 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, que apresentam forma de bastonetes, são anaeróbios ou aerotolerantes (STILES e HOLZAPFEL, 1997; HUANG e TANG, 2007; SNEATH e HOLT, 2001). Além disso, apresentam limitada capacidade biossintética e dependência de meio nutricional complexo com vitaminas e aminoácidos para o crescimento (STILES e 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 indústria de processamento de açúcar, leite, carnes, bebidas fermentadas e a cavidade oral e o trato intestinal de seres humanos. Eles são acidófilos, portanto reduzem o pH dos alimentos contendo carboidratos fermentescíveis em torno de 4,00 e como resultado, muitas vezes inibem o crescimento ou matam outras bactérias. É geralmente aceito que os *Lactobacillus* crescem até um pH máximo de 7,20, 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 está mostrada na Tabela 1 (ORLA-JENSEN, 1919).

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, que fermentam hexoses em ácido láctico e podem produzir gás a partir de gluconato, mas não a partir de glicose. Eles também fermentam pentose por fosfoacetolase induzível para produzir ácido láctico e acético. Importantes espécies neste grupo são o *Lb. casei* e *Lb. plantarum* que estão associados com muitos habitats, incluindo produtos lácteos, silagem, boca e intestino humano e esgoto. *Lb. plantarum* é utilizado como “starter” em alguns produtos 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*, causam 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 (ORLA-JENSEN, 1919)

Características	Homofermentativo	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo estrito
Aldolase	+	+	-
Fosfoacetolase	-	+	+
Formação de CO ₂	-	+	+
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>

2.2 Resíduos utilizados para produção de ácido láctico

Bactérias lácticas têm necessidade de nutrição complexa, devido a capacidade limitante de sintetizar seus próprios fatores de crescimento, como vitaminas do complexo B e aminoácidos. Elas necessitam de alguns elementos para crescimento, como fontes de carbono e nitrogênio, na forma de carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais

Há vários fatores que estimulam o crescimento e que tem efeito positivo na taxa de produção de ácido láctico. Misturas de aminoácidos, peptídeos e amidas geralmente estimulam o crescimento e resultam em taxas de crescimento maiores do que aquelas obtidas a partir de aminoácidos livres. Ácidos graxos também influenciam o crescimento dessas bactérias e o sal mais importante na fermentação láctica é o fosfato. Íons amônio não podem ser usados como fonte única de nitrogênio, mas eles exercem influência no metabolismo de alguns aminoácidos (NIEL e HAHN-HÄGERDAL, 1999).

Minerais não parecem ser essenciais para o crescimento de bactérias lácticas, logo a quantidade encontrada em meios complexos comerciais é suficiente. Temperatura e pH são fatores importantes que influenciam o crescimento e a produção de ácido láctico (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Em geral, as características desejáveis para uma bactéria láctica industrial são: habilidade de crescer rapidamente e converter completamente matérias primas de baixo custo em ácido láctico, com o mínimo requerimento nutricional e prover altas concentrações de um dos isômeros ópticos, sem formação de co-produtos (WEE et al., 2006).

Para tornar possível a produção biotecnológica de ácido láctico se faz urgente a utilização de matérias primas de baixo custo, pois a produção de polímeros e outros produtos industriais requerem grandes quantidades de ácido láctico, que deve apresentar preços reduzidos.

A matéria prima ideal para a produção de ácido láctico deve possuir algumas características básicas: ser de baixo custo, possuir baixos níveis de contaminantes, permitir alta taxa de produção e rendimento de ácido láctico, não proporcionar a formação de co-produtos, tornar possível a fermentação, com pouco ou nenhum pré-tratamento e ser disponível durante o ano todo (VICKROY, 1985). Quando materiais refinados são usados para produção de ácido láctico os custos do processo de purificação do produto podem ser significativamente reduzidos. Entretanto, o processo continua economicamente inviável, pois carboidratos refinados possuem custos excessivamente altos o que aumenta expressivamente os custos de produção. Portanto grandes esforços são feitos no sentido de se encontrar substratos economicamente viáveis para a produção de ácido láctico (WEE et al., 2006).

2.2.1 Soro de queijo

O soro de queijo é o maior resíduo gerado na produção de queijo. As características do soro de queijo dependem da qualidade do leite usado (cabra, vaca, ovelha e búfala) o qual depende da raça, alimentação, saúde e estágio de lactação do animal.

A maioria das fábricas de queijo acumulavam seus efluentes em pequenos lagos ou despejavam diretamente em rios, lagos e oceanos sem nenhum pré-tratamento. Uma vez nesses ambientes o soro de queijo pode causar excesso de consumo de oxigênio, impermeabilização, eutrofização e aumento da toxicidade (PRAZERES et al., 2012).

O volume de efluentes produzidos aumenta conforme se aumenta a produção de queijo. Assim, para produção de um 1,00 Kg de queijo são necessários 10,00 Kg de leite e serão originados 9,00 Kg de soro de queijo. Em 1995, foram produzidos $40,70 \times 10^6$ ton de soro de queijo sendo que metade foi produzida nos EUA (TEJAYADI e CHERYAN, 1995). Por ser considerado um resíduo o preço do litro de soro de queijo “in natura” na indústria chega ser R\$ 0,01 (LIZIEIRI e DE CAMPOS, 2006).

São considerados três tipos de tratamentos para o efluente da produção de queijo. O primeiro é baseado na aplicação de tecnologias. Estas tecnologias são introduzidas para recuperar componentes valiosos do efluente, como proteínas e lactose. Cada litro de soro de queijo contém, em média, 50,00 g de lactose, 10,00 g de proteínas com alto valor nutricional, 0,12 g de gorduras e 0,11 g de sais minerais (DOMINGUES et al., 1999).

O segundo tratamento constitui a aplicação de técnicas físico-químicas, como floculação, ozonização, precipitação térmica e isoeletrica, precipitação termocálcica, precipitação ácida e alcalina e oxidação eletroquímica (PRAZERES et al., 2012).

A terceira opção constitui na aplicação de tratamentos biológicos. A hidrólise da lactose e proteínas leva a formação de monossacarídeos de lactose (glicose e galactose), peptídeos e/ou aminoácidos. O soro passa pelo processo de ultrafiltração, onde o permeado terá baixo conteúdo de proteínas e elevada concentração de lactose e sais minerais.

Os micro-organismos mais comuns usados para a produção de ácido láctico, a partir de soro são *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*.

Produzir ácido láctico a partir de soro de queijo sem adição de suplementos limita sua aplicação industrial por causa da baixa produtividade. A suplementação de nutrientes é um fator chave para a eficiência do processo. Por exemplo, manganês constitui um fator limitante do crescimento para *L. casei*, uma vez que este nutriente atua no metabolismo da enzima lactato desidrogenase (PRAZERES et al., 2012).

O nutriente comumente adicionado para produção de ácido láctico é o extrato de levedura, mas este pode contribuir significativamente para o aumento dos custos de produção. Uma alternativa ao extrato de levedura é a água de maceração de milho (AMM). Como deriva do milho, 85% do conteúdo de nitrogênio é composto de proteínas, peptídeos e aminoácidos (WEE et al., 2006).

2.2.2 Água de maceração de milho

Água de maceração de milho (AMM) é uma excelente fonte de nitrogênio para a maioria dos micro-organismos devido a sua alta concentração de aminoácidos, polipeptídeos com consideráveis concentrações de vitaminas do complexo B (CARDINAL e HEDRICK, 1948).

AMM é um produto do processamento do amido de milho, que tem sido usado com sucesso para a produção de ácido láctico (WEE et al., 2006). O milho após ter sido descascado é mergulhado em água e então fracionado nos seus principais componentes por processos de flotação: o milho é primeiramente embebido, ou mergulhado, em tanques abertos a 45-52°C por 40-48 horas. Durante esta fase, os materiais solúveis são dissolvidos, o milho é amolecido e a estrutura é enfraquecida e quebrada, o que facilita a moagem e também a separação dos seus componentes.

Anteriormente a entrada da água nos tanques, ácido sulfúrico é adicionado para evitar a contaminação e para auxiliar na extração de compostos solúveis.

A água utilizada nos processos é reutilizada. De forma que a água utilizada no primeiro tanque é a mesma utilizada no segundo tanque, o que faz com que a água se torne mais concentrada com o decorrer do tempo.

Após o procedimento de imersão e moagem dos grãos de milho a água é retirada e concentrada para que o teor em sólidos seja de aproximadamente 50%. Este concentrado, a água de maceração de milho, pode então ser combinado com glúten e materiais fibrosos e vendido como ração animal, ou utilizado para fins microbiológicos.

Essencialmente, água de maceração de milho é composta por solúveis de milho concentrado, o qual foram extraídos durante o processo de maceração em pH 4, temperatura de 45 a 52 °C, na presença de ácido sulfúrico.

A AMM é uma alternativa barata (4 a 6 centavos de dólar por litro de AMM) em relação a materiais como extrato de levedura e peptona. Mais de 95% do total de nitrogênio da AMM estão na forma aminoácidos: alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, histidina, iso-leucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina e valina. Mais do que um quarto do nitrogênio está presente na forma de alanina (LIGGETT e KOFFLER, 1984).

2.3 Estratégias fermentativas

Muitos estudos mostram o potencial para produção de ácido lático em escala industrial através de processos fermentativos utilizando bactérias lácticas (BAI et al., 2003; ABDEL-RAHMAN et al., 2013; CHENG et al., 2007). Alguns desses processos são as fermentações em batelada, batelada alimentada, contínua e batelada repetida. A escolha do melhor processo depende das propriedades cinéticas de cada cepa microbiana, do substrato utilizado e de aspectos econômicos do processo.

A fermentação em batelada apresenta algumas desvantagens, por exemplo, o produto final da fermentação pode inibir a continuidade do processo, ou seja, a produção de ácido lático durante a fermentação pode interferir no crescimento celular. Além disso, a concentração inicial de nutrientes pode limitar o aumento de massa celular e a produtividade de ácido lático. Altas concentrações da fonte de carbono, teoricamente, levariam a maiores concentrações de ácido lático. No entanto, estudos comprovam que altas concentrações da fonte de carbono e de nitrogênio inibem o crescimento dos micro-organismos (COELHO et al., 2011b).

Como forma de evitar essas formas de inibição da produção, métodos alternativos têm sido estudados. O processo em batelada repetida envolve a repetição de ciclos de fermentação

por re-inoculação de parte ou de todas as células do processo fermentativo para um próximo meio de fermentação em batelada. Em comparação com a fermentação em batelada, este processo tem sido usado para aumentar a produtividade de ácido láctico. Vantagens do processo em batelada repetida ainda incluem redução do tempo de lavagem e esterilização do fermentador e redução no tempo de produção do inoculo. Há redução global de tempo e trabalho (ABDEL-RAHMAN et al., 2013).

A fermentação contínua tem promovido altas taxas de produtividade quando comparadas aos outros processos fermentativos, além de permitir a continuidade do processo por maior período de tempo (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Um dos processos mais promissores para o crescimento celular e produção de metabólitos é a fermentação em batelada alimentada que permite suprimento de nutrientes durante o cultivo. Neste processo os níveis de nutrientes devem ser adequadamente controlados. A vantagem desse processo é a possibilidade de controle, por alimentação, dos níveis de nutrientes que podem inibir o crescimento celular (SOLETTO et al., 2008). Neste tipo de fermentação há adição de substrato sem remoção do meio de fermentação. Geralmente os resultados são superiores ao processo contínuo e ao processo de batelada simples, sendo especialmente benéfico quando a mudança na concentração dos nutrientes afeta a produtividade e biomassa do produto desejado (DING e TAN, 2006).

Como estratégias de alimentação existem a fermentação em batelada alimentada constante, intermitente, exponencial e por pH stat.

Através da alimentação constante Bai et al (2004) mantiveram a concentração residual de glicose entre 5,00 e 10,00 g/L, porém não observaram alterações na produção de ácido láctico quando foram comparadas as fermentações em batelada alimentada com fluxo constante e batelada. Mu et al (2009) conseguiram aumentar a produção do ácido 3-fenillactico através do processo em batelada alimentada por pulso.

Mass et al (2008) reportaram um novo processo de alimentação em que o substrato alcalino era adicionado automaticamente no meio de fermentação, ajustando o valor de pH durante a produção de ácido láctico. Um método similar foi usado por Zhang et al (2010) e obtiveram concentrações residuais de glicose entre 4,10 e 4,90 g/L com máxima produção de ácido láctico de 96,3 g/L.

Diferentes estratégias foram utilizadas por Ding e Tan (2006) para a produção de L(+) ácido láctico e foi encontrado que a fermentação com alimentação exponencial a partir de glicose e extrato de levedura teve aumento de 56,70 % na produção de ácido láctico, 68,60 %

de aumento na massa celular e 59,70 % de aumento na produtividade quando comparado a fermentação em batelada.

2.4 Extração e purificação do ácido lático

As barreiras tecnológicas para a produção de ácido lático com baixo custo estão principalmente no processo de separação e purificação do ácido lático do meio fermentativo. Além disso, a eficiência deste processo é essencial para posterior síntese do polímero de ácido lático ou ácido polilático (PLA), visto que a presença de açúcar, proteínas e de outros ácidos orgânicos devem ser mínimas para obtenção de ótimos resultados na polimerização.

No método convencional de purificação do ácido lático ocorre a precipitação do lactato de cálcio, com esterificação e hidrólise através da destilação reativa. É um processo econômico, simples e confiável, porém gera grandes quantidades de gesso, que é considerado contaminante ambiental (JOGLEKAR et al., 2006). Por esta razão há a procura de métodos alternativos e ecologicamente corretos para a purificação, como por exemplo, métodos envolvendo: troca-iônica; destilação a vácuo; esterificação e métodos de hidrólise; separação por membrana (LI et al., 2008); eletrodialise e osmose reversa (TIMMER et al., 1993).

A purificação de ácido lático a partir de colunas de troca iônica se mostra como uma opção tecnológica para o processo (GONZÁLEZ et al., 2008), uma vez que os equipamentos necessários são relativamente simples e baratos. O uso é recomendado quando a solução de ácido lático possui baixa concentração de sais (QUINTERO et al., 2012). Muitos estudos se concentram na recuperação de ácido lático usando adsorventes poliméricos aniônicos (base forte, moderada ou fraca). A vantagem deste processo está no fato de não haver necessidade de acidificar o caldo fermentativo antes da adsorção. Adsorção de resina de troca iônica é um método prático na indústria, devido a sua economia, facilidade de utilização, redução em consumo de substâncias químicas e menor produção de resíduos. Este método de separação também pode ser acoplado com o processo fermentativo (MOLDES et al., 2003; KULPRATHIPANJA e OROSHAR, 1991). Quando se utiliza a resina em coluna de leito fluidizado, é possível tratar o caldo fermentado de uma forma rápida. No entanto, há dificuldades para alcançar alta capacidade de adsorção no processo de purificação por troca iônica para ácido lático (RAYA-TONETTI et al., 1999).

O processo de nanofiltração (NF) também tem se mostrado como uma opção para o processo de separação do ácido lático do meio de fermentação (LI et al., 2008). A sua seletividade se dá tanto por impedimento estérico quanto por efeito de repulsão eletrostática, ou seja, a eficiência da separação por membranas de nanofiltração no tratamento de soluções

iônicas pode ser explicada pela combinação de efeitos de tamanho e carga do ácido. A maioria das membranas de NF podem reter firmemente compostos de peso molecular de até 150-250 g/mol, espécies carregadas e íons polivalentes.

A nanofiltração pode constituir um passo no processo de purificação para ácidos orgânicos de baixa massa molar. Foi mostrado que a NF é um método adequado para o processamento da fermentação de acetato de sódio, graças à sua capacidade de deixar permear o acetato enquanto que os nutrientes retidos como a glicose, podem ser reciclados no tanque de fermentação (HAN e CHERYAN, 1995).

Nanofiltração, carvão ativado e colunas de troca iônica são soluções para recuperação do ácido láctico mencionadas em patentes (MANI e HADDEN, 1998). A nanofiltração é um passo de purificação que pode ser realizado antes e/ou depois do processo de troca iônica, pois as membranas de NF apresentam baixas taxas de rejeição ao ácido láctico (e alta rejeição a mono-e dissacarídeos) e os mecanismos da rejeição de NF são tradicionalmente conhecidos como parcialmente regulado por interações eletrostáticas, levando a altas rejeições de íons bivalentes (efeito Donnan) (BOUCHOUX et al., 2006).

Avanços na separação e purificação com base em tecnologias de membrana, particularmente, em microfiltração, ultrafiltração e eletrodialise (ED) levaram à criação de novos processos para a produção de ácido láctico sem a geração de resíduos.

A literatura mostra que a produção de ácido láctico é viável a partir de sais de lactato através do uso da membrana bipolar da eletrodialise, que consegue converter soluções de sais em ácidos. Primeiramente, deve ser usada a membrana de eletrodialise monopolar que será responsável por concentrar e purificar o caldo, então, prossegue-se para o uso da membrana de eletrodialise bipolar que converte sais lactato em ácido láctico (RYU et al., 2012). Através de trocas iônicas, a membrana é capaz de fornecer íons de hidrogênio ao caldo e recuperar os cátions presentes, de forma que a base usada durante a fermentação também pode ser recuperada. Em outras palavras, ao fim do processo há a conversão dos sais de lactato para a forma ácida e também ocorre a recuperação da base utilizada no processo fermentativo.

2.5 Aplicações do ácido láctico

Em 1990, o volume da produção mundial de ácido láctico era de 40.000 ton./ano com dois importantes produtores, CCA Biochem (Holanda) e Sterling Chemicals (EUA). A produção em 2006 foi estimada em 120.000 ton./ano e o preço do ácido láctico com 50% de pureza era de US\$ 1,38/Kg e com 88% de pureza era US\$ 1,54/Kg (WEE et al., 2006). Já em

2010 a joint venture Cargill Dow, maior produtor mundial de PLA, anunciou produção de ácido láctico em 500.000 ton.

Tradicionalmente o principal uso do ácido láctico está em aplicações alimentícias ou relacionadas com alimentos. Nos EUA este destino para o ácido representa 85% da demanda. O restante, aproximadamente 15%, é usado em aplicações não alimentícias. Recentemente com o desenvolvimento e comercialização dos biopolímeros o uso do ácido láctico aumentou consideravelmente e estima-se que entre 20 e 30% da produção de 2005 tenha sido utilizada nestas novas aplicações.

Como acidulante alimentar o ácido láctico tem gosto ácido suave, em contraste com os outros ácidos alimentares. Ele não é volátil, não possui odor e é classificado como um aditivo seguro pela “Food and Drug Administration”. É um bom conservante para alimentos em conserva, como azeitonas e pickles. Ele também é usado como flavorizante, controlador de pH (tampão) ou como inibidor de esporos bacterianos em uma variedade de produtos alimentícios processados, como pães, bebidas, sopas, laticínios, cervejas, geléias, maionese e outros produtos onde frequentemente a adição do acidulante aumenta o tempo de prateleira e reduz o crescimento de organismos anaeróbios formadores de esporos, como *Clostridium botulinum*.

Ácido láctico e lactato de etila há tempos são utilizados em aplicações farmacêuticas e cosméticas. Por exemplo, entram nas formulações de óleos, loções, pomadas; atuam como humectantes. Os lactatos são frequentemente superiores aos produtos naturais e mais efetivos que os alcoóis, por exemplo, lactato de etila é o ingrediente ativo em muitas aplicações anti-acne (DATTA e HENRY, 2006).

Os dois grupos funcionais (ácido carboxílico e álcool) possibilitam grande variedade de reações químicas para o ácido láctico, como reações de condensação, esterificação, redução e substituição do grupo álcool. Estas reações podem levar a formação de diferentes produtos: polímeros para plásticos e fibras, solventes que entram na formulação de produtos de limpeza e químicos industriais oxigenados. Assim, o ácido láctico é um composto químico de primeira classe que pode ser derivado de carboidratos renováveis e que tem aplicações em uma enorme variedade produtos úteis (DATTA e HENRY, 2006).

Algumas vantagens dos polímeros feitos a partir de ácido láctico incluem: não retenção do calor, rápida taxa de degradabilidade no ambiente (compostagem), composto sustentável (com base em recursos renováveis). Além disso, o uso de polímeros de ácido láctico torna os produtos mais leves, uma vez que ele apresenta menor gravidade específica em comparação com outras fibras naturais; proporciona maior resistência à tração (maior tenacidade que as

fibras naturais); secagem rápida; tem resistência aos raios UV; baixo índice de refração; quando comparados com materiais PET, apresentam menor calor de combustão, ou seja, emitem menos fumaça quando queimados (COELHO, 2011).

A demanda de ácido lático tem aumentado e é estimado um crescimento de 19% ao ano, principalmente devido ao seu emprego na produção de polímeros biodegradáveis como o ácido polilático, que pode ser o substituto de polímeros derivados do petróleo (DATTA et al., 1995, WEE et al., 2006) e por isso tem sido considerado um dos plásticos biodegradáveis mais promissores (GROSS e KALRA, 2002; SAKAI et al., 2004). A elevada resistência química desse composto é vantajosa para manufatura de fibras e filmes, enquanto a resistência ao calor é favorável para produção dos mais diversos utensílios, como copos, bandejas (TANAKA et al., 2006), talheres, pratos, sacolas, sacos de adubo, garrafas de refrigerante, sacola de supermercado (BUSTOS et al., 2004; NAVEENA et al., 2005) assim como no setor de embalagens da indústria alimentícia (BOUDRANT et al., 2005).

Seu tempo de vida útil é curto, podendo ser totalmente degradado no meio ambiente em condições de aerobiose ou anaerobiose. Sendo que essa ação é facilitada quando ocorre exposição a altas temperaturas e umidade (AURAS et al., 2003; TUOMINEN, 2003).

Além disso, os polímeros de ácido lático podem ser utilizados na medicina, pois têm a importante característica de serem biorreabsorvíveis, podendo ser empregados na regeneração de tecidos, suturas, fixações de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, reparo do menisco, fixação de ligamentos e implantes (SAKATA et al., 2004).

Solventes “amigos do meio ambiente” é outra área de crescimento potencial para o ácido lático e seus derivados, particularmente os ésteres de ácido lático com baixo peso molecular, como etil, propil, e butil. Mais recentemente a “Vertec Biosolventes” desenvolveu e vem comercializando blendas desses ésteres com outros solventes biológicos, derivados de ácidos graxos e ésteres metil ou D- limoneno que tem inúmeras propriedades de solvatação e de limpeza (DATTA e HENRY, 2006).

3 OBJETIVOS

Objetivo deste trabalho foi o de aumentar a produção de L(+) ácido lático utilizando diferentes estratégias de fermentação em batelada alimentada, tendo como fonte de carbono e nitrogênio resíduos da agroindústria. A separação e purificação do ácido lático utilizando técnicas de filtração com carvão ativado, carvão ativado e celite, resinas de troca iônica e nanofiltração, também foram objetivos deste trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

Foi utilizado o micro-organismo homofermentativo *Lactobacillus rhamnosus* B103 (Figura 2) cedido pela Dra. Georgina L. Michelena Alvarez do ICIDCA de Cuba. O micro-organismo encontrava-se liofilizado. Foi usado o meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS), composição em g/L: glicose (20), peptona (10), extrato de carne (10), extrato de levedura (5), acetato de sódio (5), fosfato de potássio (2), sulfato de magnésio (0,1), sulfato de manganês (0,05) e citrato de amônio (2).

Primeiramente foi realizada a ativação do micro-organismo: em 5,00 mL de caldo MRS foi colocado o micro-organismo liofilizado e incubado à 37°C por 18 horas. Após este período, 1,00 mL da suspensão bacteriana foi transferido para um *Erlenmeyer* contendo 12,50 mL de caldo MRS. O *Erlenmeyer* foi mantido em incubadora, à 37°C, 150 rpm, por 18 horas. Para obter culturas estoques, o conteúdo do *Erlenmeyer* foi igualmente distribuído em *Eppendorfs* contendo 500,00 µL de solução de glicerol 40 % (v/v) e congelados à -20°C. Para o preparo do inóculo, tubos da cultura estoque foram descongelados e o seu conteúdo inserido em um *Erlenmeyer* contendo 100,00 mL de caldo MRS. O inóculo foi incubado a 37°C, 150 rpm por 24 horas. Em todos os experimentos foram adicionados 10% (v/v) de inóculo, com 24 horas.

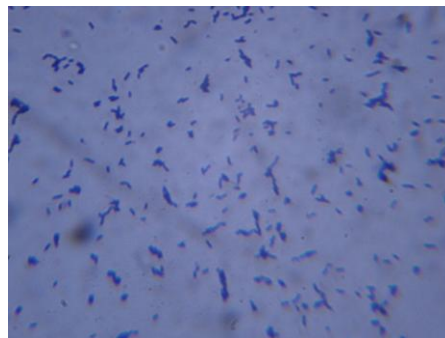


Figura 2: Coloração de Gram para *Lactobacillus rhamnosus* B 103

4.2 Substratos

O soro de queijo em pó foi fornecido por Laticínios Regina (São Paulo-SP) e possuía aproximadamente 60 % de lactose. O soro de queijo utilizado no meio de fermentação foi preparado através da desproteinização. O soro foi dissolvido em água e posteriormente aquecido, em autoclave, por 15 minutos. Este processo provocou a coagulação das proteínas. Em seguida, a solução foi resfriada naturalmente até atingir a temperatura ambiente e então

centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos para a remoção das proteínas (soro de queijo desproteínizado).

Já para o preparo do meio usado para alimentação durante as fermentações em batelada alimentada foi realizado o processo anterior e após a remoção das proteínas foi realizada nova dissolução do soro de queijo em pó e foi realizado o processo de desproteínização novamente. Assim foram preparados dois meios de soro de queijo, o primeiro usado como meio de fermentação e o segundo, mais concentrado, usado como meio de alimentação.

A água de maceração de milho utilizada foi fornecida por Corn Products, Mogi Guaçu/SP. A AMM foi submetida a centrifugação (10.000 x g por 10 minutos) para remoção de impurezas sólidas presentes.

4.3 Fermentações

*4.3.1 Produção de L(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* B103*

As fermentações para produção de L(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* B103 foram conduzidas em fermentador (Bio-T Mini Zeta) de 5 litros com temperatura, agitação e pH de 37°C, 200 rpm e 6,20, respectivamente. O volume de trabalho inicial foi de 1,50 L para todas as fermentações (Figura 3). Foram realizadas 4 tipos de fermentações, sendo uma batelada simples e 3 bateladas alimentadas (por fluxo constante, por pulso e pH stat) . O pH das fermentações foi controlado com NaOH.

O meio de cultivo para a batelada simples foi o meio otimizado, adaptado, com base nos melhores valores de rendimento para ácido láctico, obtidos por Coelho (2011a): 90,00 g/L de açúcares redutores totais, provenientes do soro de queijo, 45,00 mL/L de água de maceração de milho, 1,00 mL/L de Tween 80 e 0,075 g/L de sulfato de manganês. Todas as fermentações do tipo batelada alimentada foram compostas inicialmente pelo mesmo meio de fermentação utilizado para a batelada simples. Já o meio de alimentação foi composto por soro de queijo (contendo 500,00 g/L de lactose) e 7,50 % (v/v) de AMM. Amostras foram retiradas a cada 3 horas até 12h e então de 6 em 6 horas. As fermentações tiveram duração, em média, de 96 horas.

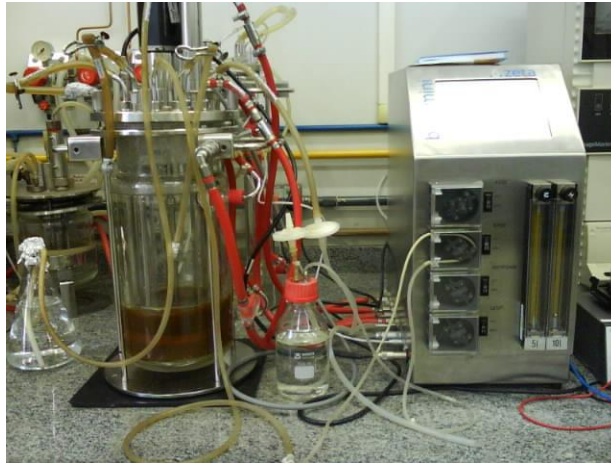


Figura 3: Fermentação em batelada a 37°C, 200 rpm e pH 6.2 controlado com 10 N NaOH.

4.3.1.1 Batelada alimentada por fluxo constante

Para a batelada alimentada de fluxo constante foi utilizado o fluxo de alimentação de 0,35 mL/min. A alimentação ocorreu no início da fase logarítmica de crescimento do micro-organismo (Figura 6) e teve a duração de 16 horas. O tempo total de fermentação foi de 123 horas.

4.3.1.2 Batelada alimentada por pulso

Para a batelada alimentada por pulso foram realizados 2 pulsos do meio de alimentação. Um pulso foi acionado às 24 horas e outro às 48 horas de fermentação. Os pulsos tiveram fluxo de 30,00 mL/min e duração de dois minutos e dezoito segundos.

4.3.1.3 Batelada alimentada por pH stat

A ocorrência da produção de ácido láctico leva a queda do pH e o consumo do substrato. Na fermentação do tipo batelada alimentada por pH stat ocorre o controle do pH e a adição de substrato simultaneamente. Dessa forma, conforme houve a queda do pH durante a fermentação, o meio de alimentação foi adicionado proporcionando a regulação do pH e também a adição de novo substrato ao biorreator de acordo com o consumo ocorrido.

Foram realizadas quatro fermentações do tipo pH stat, com diferentes meios de alimentação:

- 500,00 g/L de lactose(reagente sintético) + 7,50 % (v/v) de AMM e NaOH 5N
- 500,00 g/L de lactose (soro de queijo) + 7,50 % (v/v) de AMM e NaOH 10N
- 500,00 g/L de lactose (soro de queijo) + 7,50 % (v/v) de AMM e NaOH 5N

- 500,00 g/L de lactose (soro de queijo) + 7,50 % (v/v) de AMM sem adição de NaOH

4.4 Cinética dos processos fermentativos e parâmetros estequiométricos

Cinética de crescimento, consumo de substrato e produção de ácido láctico foram realizadas para todas as fermentações, com o objetivo de comparar os processos fermentativos deste trabalho.

Foram avaliados os fatores de conversão de substrato em produto, Y_p/s (g de ácido láctico/g de ART), de substrato em biomassa, Y_x/s (g de células/ g de ART) e relação entre a produção de ácido láctico e a produção de células, Y_p/x (g de ácido láctico/g de células).

4.5 Purificação e recuperação do ácido láctico do caldo fermentado

O caldo proveniente da fermentação foi reservado. Foi realizada centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos e com o sobrenadante foram realizados quatro métodos de purificação: carvão ativado, carvão ativado e celite, resinas de troca iônica e nanofiltração. O pH do caldo foi ajustado para 5 antes de início do processo de purificação.

4.5.1 Carvão ativado

4.5.1.1 Determinação da concentração de carvão ativado

Para a determinação da concentração de carvão ativado foi realizado planejamento do composto central com três replicas do ponto central, onde as variáveis temperatura e concentração do pó de carvão ativado foram avaliadas totalizando 11 experimentos.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada) utilizando as seguintes equações de codificação:

$$X_1 = \frac{(\% \text{ de carvão} - 10)}{9} \quad (\text{Eq.1})$$

$$X_2 = \frac{(\text{Temperatura} - 50)}{20} \quad (\text{Eq. 2})$$

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 Valores reais das variáveis independentes codificadas

Variáveis	Níveis				
	- 1.41	-1	0	+1	+ 1.41
% de carvão ativado	0,13	3	10	17	19,87
Temperatura (°C)	26,8	35	55	75	83,2

Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio, contendo 10,00 mL de caldo fermentado. Amostras de 1,00 mL foram retiradas após 15 minutos de tratamento sob as condições de porcentagem de carvão ativado e temperatura, estipuladas na Tabela 2. As amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos e filtradas em filtro de 0,20 µm. O sobrenadante foi utilizado para análise da redução de cor do caldo fermentado, concentração de ácido lático e presença de açúcares redutores totais (ART).

4.5.1.2 Análise estatística

A análise estatística do planejamento experimental foi feita utilizando o programa Statistica 7.0 ®, a partir da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros, os termos isolados, de interação e quadráticos das três variáveis estudadas. A equação empírica de 2ª ordem proposta para representar cada uma das respostas segue a seguinte forma:

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2X_3 + hX_1^2 + iX_2^2 + jX_3^2 \quad (\text{Eq.3})$$

Sendo:

Y = resposta estudada;

β_0 = valor médio da resposta;

a,b,c,...j = constantes ou parâmetros da equação;

$X_1; X_2; X_3$ = variáveis independentes

A esta equação foram aplicados os resultados obtidos e feita uma avaliação estatística para estimar os parâmetros através dos valores de T de Student para cada um, sendo eliminados aqueles com nível de significância (p) superior a 5%, ou seja, as variáveis relacionadas a estes são consideradas não relevantes quando p for superior a 5%. Os parâmetros não significativos foram eliminados, obtendo-se assim, uma equação que representa os efeitos das variáveis na produção de ácido lático e que determina qual delas influência mais a resposta. Pode-se ainda, prever qual a melhor condição para este processo. O valor do R^2 e a comparação entre F calculado e F tabelado foram utilizados para constatação da significância ou não do modelo.

Com o objetivo de verificar o comportamento da resposta estudada, isto é, se ela apresenta ponto de máximo, de mínimo ou não apresenta nem ponto de máximo e nem de mínimo (ponto de sela) é necessário descobrir o ponto estacionário.

Os pontos estacionários são obtidos através da derivada da equação da resposta Y pela variável X_k , isto é:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (\text{Eq. 4})$$

sendo, $Y = b_0 + x'b + x'Bx$

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (\text{Eq. 5})$$

onde, b_0 é o termo independente;

$x'b$ são os termos de 1ª. ordem na função de resposta;

$x'Bx$ é a contribuição quadrática.

Então, o ponto estacionário será dado por:

$$X_0 = -B^{-1} b/2 \quad (\text{Eq.6})$$

Onde, B é a matriz (k x k) na qual a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2. A matriz b é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados às variáveis isoladas (variáveis lineares).

O ponto estacionário (x_0) pode ser:

- Um ponto onde a superfície atinge um máximo;
- Um ponto onde a superfície atinge um mínimo, ou
- Um ponto nem de máximo, nem de mínimo \Rightarrow Ponto de sela (“saddle point”).

Porém, podem existir problemas relacionados a estes pontos estacionários:

- Pode existir uma região de máximo e não um ponto de máximo;
- Pode ser que o ponto estacionário esteja fora da região experimental.

Para determinar a natureza desse ponto estacionário foi necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem (X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, ..., 0) para o ponto estacionário X_0 (Figura 4) . Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, W_1, W_2, \dots, W_k .

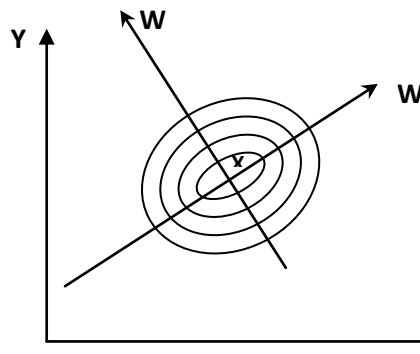


Figura 4: Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtêm-se a função de resposta em termos das novas variáveis:

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (\text{Eq.7})$$

onde:

y_0 : é a resposta estimada no ponto estacionário e,

$\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ são constantes.

Os sinais dos λ 's e a grandeza dos λ 's ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário e, a relação entre os w 's e os x 's também são importantes, pois indicam ao pesquisador regiões úteis para exploração.

Se $\lambda_i < 0$, sendo $i = 1, 2, \dots, k$, quando movimentamos em qualquer direção a partir do ponto estacionário, teremos um decréscimo de Y , isto é, o ponto estacionário x_0 é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se $\lambda_i > 0$, o ponto estacionário x_0 é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os λ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário x_0 não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

A obtenção dos pontos estacionários e a análise canônica dos dados para cálculo dos pontos de maximização das respostas foram realizados utilizando um algoritmo implementado no software Maple V Release 4®.

4.5.1.3 Purificação utilizando carvão ativado

O caldo fermentado centrifugado foi misturado ao carvão ativado em pó (Sigma-Aldrich) a 18,72%. A mistura foi submetida a agitador magnético em temperatura ambiente por uma hora, em seguida a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado para ser submetido a próximas etapas da purificação.

4.5.1.4 Purificação utilizando carvão ativado e celite

Em funil de placa sinterizada (3,50 cm de diâmetro e 5,00 cm de altura) foi adicionado uma camada de celite (Sigma-Aldrich) e uma camada de carvão ativado em pó ambos com aproximadamente 1,00 cm de espessura. Primeiramente foi passada água destilada para a completa compactação do carvão e do celite, em seguida o caldo centrifugado foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada contendo a mistura de celite e carvão ativado. Após a filtração foi realizada lavagem com água destilada e o filtrado foi armazenado.

Em alguns casos o filtrado foi submetido à nova filtração, ou seja, o caldo foi duplamente filtrado.

4.5.2 Troca iônica

Foram testadas duas resinas de troca aniônica: IRA 400 (resina trocadora de ânions de base forte) e IRA 67 (resina trocadora de ânions de base fraca). Antes da utilização, as resinas foram lavadas e convertidas nas formas OH^- ou Cl^- .

4.5.2.1 Preparação das resinas

As resinas na forma OH^- foram obtidas a partir do processo de lavagem na seguinte seqüência: solução de 1,00 N de NaOH, água destilada, solução de 1,00 N de HCl, água destilada, solução de 1,00 N de NaOH e lavagem da resina com água destilada até atingir pH 7,00. A resina Amberlite IRA 67 não pode ser obtida na forma OH^- , pois permanece na forma de base livre em pH maior que 9,00.

Resinas na forma Cl^- foram obtidas pela lavagem da resina na seguinte ordem: solução 1,00 N HCl, água destilada, solução 1,00 N NaOH, água destilada, solução 1,00 N HCl e água destilada até atingir pH 7,00.

Alíquotas das resinas nas formas OH^- , base livre e Cl^- foram secas em temperatura ambiente e analisadas para determinação da umidade por secagem em estufa a 105° C por 24h.

4.5.2.2 Capacidade de adsorção da resina

Neste estudo de equilíbrio, 1,00 g de resina IRA 400 e IRA 67 em ambas as formas (OH^- e Cl^-) com aproximadamente 60 % de umidade foram adicionados a 5,00 mL de solução de ácido láctico do caldo de fermentação em diferentes concentrações (18,85; 9,40; 4,70; 2,35; 1,17; 0,58; 0,29 g/L). O estudo foi feito em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL a 25 °C.

O pH inicial de todas as amostras foram fixados em 5,00. Depois de 12 horas, o sobrenadante das amostras (ácido láctico) foram retirados e analisados em CLAE.

Também foi realizado estudo para avaliar a forma de ocorrência da adsorção através de isotermas de adsorção, no modelo de equilíbrio. A adsorção pode se dar em monocamadas ou multicamadas. O modelo de adsorção de Freundlich consiste na formação de um composto intermediário com adsorção em multicamadas. As moléculas são adsorvidas pela resina e servirão como um composto intermediário para adsorção. As moléculas ligam-se entre si de modo a formar várias camadas. Já o modelo de adsorção de Langmuir mostra uma superfície de adsorção homogênea, ou seja, a adsorção ocorrerá em sítios específicos levando a formação de monocamadas. Neste caso, as moléculas ligam-se apenas aos sítios disponíveis (vazios) da resina, quando não há mais sítios livres a adsorção cessa. As moléculas adsorvidas não funcionarão como um composto intermediário como ocorre no modelo de multicamadas. As equações de Langmuir e Freundlich estão representadas nas equações 8 e 9, respectivamente.

$$q_e = K_L \cdot C_e / (1 + \alpha_L C_e) \quad (\text{Eq 8})$$

$$q_e = K_F \cdot C_e^{bf} \quad (\text{Eq 9})$$

Onde q_e representa a capacidade de adsorção, C_e a concentração de ácido láctico adsorvido, bf é a constante de adsorção e K_L e K_F são as constantes de Langmuir e de Freundlich respectivamente.

4.5.2.3 Recuperação do ácido láctico

Neste estudo, 1,00 g de resina carregada com ácido láctico (0,58 g/L Amberlite IRA 67, na forma de cloro) foram adicionados em 5,00 mL de diferentes eluentes (soluções de 1N de HCl, 1N de H₂SO₄, 1N de NaCl e 1N NaOH), em frascos de *Erlenmeyers* de 125 mL, mantido em incubadora a 25°C, 150 rpm, durante 2h. Ao final do processo as amostras foram centrifugadas (10.000 x g por 10 min) e a concentração de ácido láctico no sobrenadante foi determinada.

4.5.2.4 Coluna de troca iônica

Foram realizados 4 processos diferentes de purificação em coluna com resina de troca iônica.

Primeiramente uma coluna de 48,00 cm de altura e 2,00 cm de diâmetro foi empacotada com 51,00 g de resina (Amberlite IRA 67 na forma Cl⁻) em água destilada. Em

seguida foi adicionada uma solução (170,00 mL) de ácido láctico (142,20 g/L), obtida pela purificação com carvão ativado em pó, com fluxo de 1,50 mL/min.

O segundo processo foi realizado com o caldo proveniente da filtração à vácuo de carvão com celite. Foi usada uma coluna de 15,50 cm de altura e 1,50 cm de diâmetro. Nesta coluna foram empregados 14,00 g de resina IRA 67 na forma Cl^- e 27,50 mL de caldo filtrado com carvão e celite na concentração de 60,50 g/L utilizando fluxo de 0,70 ml/min.

No terceiro processo 10,00 ml de caldo filtrado a vácuo com carvão e celite com concentração de 92,04 g/L, permaneceu em contato por 12 h com 35,00 g de resina IRA 67 na forma de Cl^- (para adsorção do ácido láctico a resina), em seguida a mistura contendo o caldo e a resina foram adicionados a uma coluna de 48,00 cm de altura e 2,00 cm de diâmetro com fluxo de bombeamento de 0,50 ml/min.

Por fim, no quarto processo foram utilizados 20,00 ml de caldo filtrado a vácuo com carvão e celite com concentração de 76,00 g/L de ácido láctico, neste caso foi utilizado 50,00 g da resina IRA 67 na forma de cloreto com fluxo de 0,50 ml/min.

Para todos os processos alíquotas do efluente foram coletadas e analisadas para determinação da concentração de ácido láctico. A resina foi considerada saturada quando a concentração de ácido láctico no efluente fosse correspondente ao de alimentação. A solução intersticial (ácido láctico) foi removida pela adição de água destilada (bombeamento) até que concentração de ácido láctico no efluente estivesse abaixo de 0,10 g/L. A recuperação do ácido láctico se deu através do bombeamento de 1 N HCl, com fluxo de 1,50 mL/min. Amostras do efluente foram coletadas e analisadas até que a concentração de saída de ácido láctico estivesse menor que 0,10 g/L. Finalmente, as colunas foram lavadas com água destilada para a remoção do HCl, tornando-as prontas para um novo ciclo.

4.5.3 Nanofiltração

A solução utilizada na nanofiltração deveria conter resíduos da fermentação, como proteínas e açúcares, para que sua capacidade de purificação fosse avaliada, por esta razão foi utilizado o caldo proveniente do terceiro processo de purificação com resina de troca iônica. Para este experimento foi utilizada a membrana HL da GE Osmonics com área de 6,28 cm², acoplado a uma bomba de bancada Masterflex L/S standard drive para bombeamento da solução pela unidade de membrana.

4.6 Metodologia analítica

4.6.1 Quantificação do ácido láctico

Foi empregado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) equipado com detector Ultra-violeta a 210 nm e detector de índice de refração. Foram utilizadas as colunas Rezex ROA (300,00 x 7,80 mm) da Phenomenex, eluída com 2,50 mM de H₂SO₄ como fase móvel, fluxo de 0,60 mL/min e temperatura de 65°C e Chirex 3126 Phenomenex (150,00 x 4,60 mm) eluída com 1 mM de Sulfato de cobre II em solução aquosa como fase móvel, fluxo de 1,00 mL/min e temperatura de 26 °C.

4.6.2 Determinação da concentração de açúcares e proteínas

Os açúcares do caldo fermentativo foram quantificados através do método de DNS (MILLER, 1959) e os açúcares do processo de purificação por CLAE, já as proteínas foram quantificadas através da metodologia de Lowry (PETERSON, 1977).

4.6.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por densidade ótica, no comprimento de onda de 650 nm. Após a centrifugação da amostra e separação do sobrenadante, o precipitado foi lavado com água destilada e diluído, antes da sua introdução no espectrofotômetro. A diluição foi realizada de modo que a absorbância permanecesse na faixa de 0,20 - 0,80 unidades de absorbância. A medida da absorbância foi convertida em concentração celular (g massa seca/litro de meio) por meio de uma curva de calibração ($y = 0,584x - 0,001$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cinética de crescimento

A curva de crescimento foi construída para o micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus*. O objetivo da construção dessa curva foi determinar como ocorre o crescimento do micro-organismo e então identificar o melhor momento para realização do inóculo na fermentação. A curva está apresentada na Figura 5.

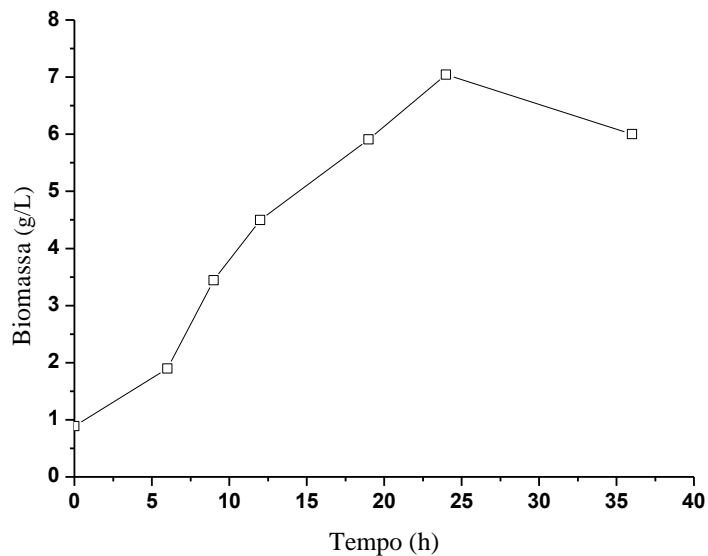


Figura 5: Curva de crescimento para *Lactobacillus rhamnosus* B103

Pela Figura 5 é possível observar que em 18h o micro-organismo se encontra na fase exponencial de crescimento. Em 24 horas de fermentação foi alcançado o crescimento máximo.

5.2 Fermentação em batelada

A fermentação em batelada teve duração de 48 horas, inóculo de 10% (v/v) e controle de pH por NaOH 10N, como descrito no item 4.3.1. Os resultados para cinética de produção, consumo de substrato e de crescimento são apresentados na Figura 6.

A máxima produção obtida foi de 57,00 g/L de L(+) ácido láctico em 48 horas de fermentação. A concentração final de açúcares redutores totais foi de 21,74 g/L e a maior biomassa obtida ocorreu em 48 horas de fermentação com 4,79 g/L.

Kwon et al (2000) estudaram duas fontes de carbono para o micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus*. Ao fim de 55 horas de fermentação encontraram produção similares de ácido láctico de 125,00 e 127,00 g/L quando foi usado glicose e lactose, respectivamente. A concentração inicial de ambas as fontes de carbono era de 150,00 g/L. Este estudo mostra a capacidade que *Lactobacillus rhamnosus* tem de metabolizar lactose tão bem quando glicose.

Considerando o uso de resíduos agroindustriais para a produção de ácido láctico Buyukkileci e Harsa (2004) observaram maior produtividade quando se usou o substrato soro de queijo ($1,75 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) do que quando se usou lactose e glicose sintéticos ($1,45 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$). Os autores comprovaram que a composição complexa do soro de queijo provê

maiores nutrientes para os micro-organismos, sendo necessária pouca ou quase nenhuma suplementação do meio de cultivo. Segundo Fitzpatrick et al (2001) apenas a adição de sulfato de manganês ao soro de queijo suplementado com extrato de levedura foi capaz de reduzir o tempo de fermentação de 120 para 24 horas, sem perda na produção de L(+) ácido láctico por *Lactobacillus casei*.

Levando em conta a produtividade quando soro de queijo foi utilizado como fonte de carbono, este trabalho encontrou maior produtividade (1,18 g/L/h) quando comparado ao trabalho de De Lima et al (2010b) que utilizaram *Lactobacillus* sp e conseguiram produtividade de 1,09 g/L/h partindo da mesma concentração de lactose.

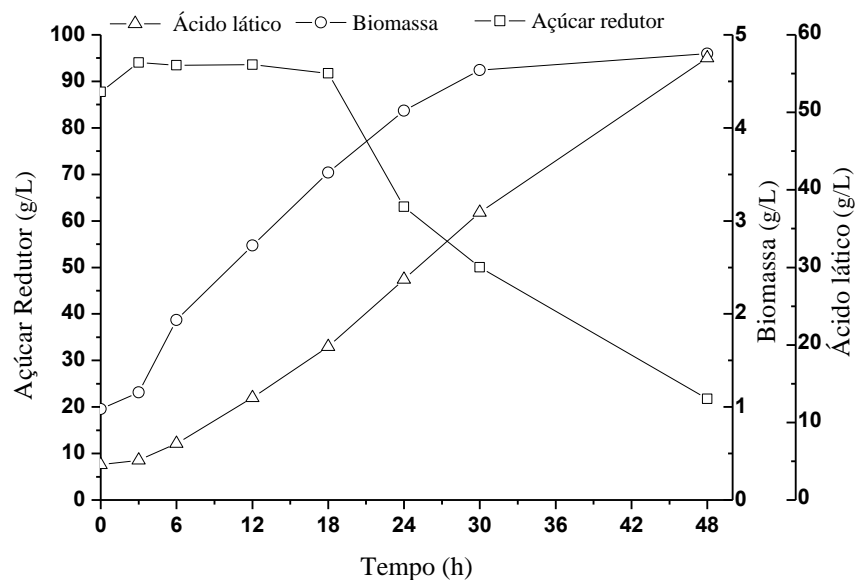


Figura 6: Produção de ácido láctico em fermentação em batelada a 37°C, 200 rpm e pH 6.2 controlado com 10N NaOH.

5.3 Batelada alimentada

5.3.1 Batelada alimentada por pulso

Nesta fermentação foram dados dois pulsos de 70,00 mL cada um contendo 500,00 g/L de soro de queijo e 7,50 % de AMM. Os pulsos foram acionados quando, durante a fermentação em batelada, foi observada a queda na concentração de açúcar e as células estavam na fase log de crescimento.

Nesta fermentação observou-se que a maior produção de ácido láctico, 106,20 g/L, foi alcançado em 60 horas de fermentação. Em termos de produção de ácido láctico esta fermentação se apresenta melhor que a fermentação em batelada. Os açúcares redutores totais ao fim da fermentação por pulso são expressivamente menores (5,30 g/L) do que aqueles para

a fermentação em batelada (21,74 g/L). Então, comparando esses dois tipos de fermentação pode-se dizer que houve melhora na produção de L(+) ácido láctico (aumento de 49,20 g/L) e redução na quantidade de açúcar residual final. Além de que a fase log do micro-organismo foi estendida (Figura 7).

Com relação à biomassa pode-se observar que existiram pequenas flutuações durante sua fase log. A fase lag teve menor duração e as células entraram no período estacionário somente com 60 horas de fermentação.

Usando *Lactobacillus rhamnosus*, fermentação em batelada por pulso e glicose como fonte de carbono Li et al. (2010) conseguiram aumentar a produção de L(+) ácido láctico de 90,00 g/L (concentração inicial de glicose de 130,00 g/L) para 130,00 g/L, partindo de 125,00 g/L de glicose. O meio de alimentação era composto por 770,00 g/L de glicose e os pulsos eram acionados quando a concentração residual de glicose no reator ficava abaixo de 15,00 g/L.

Muitos autores usaram esta técnica de alimentação e conseguiram aumentar a produção de seu produto. Por exemplo, Meng et al. (2012) aumentaram a produção de L(+) ácido láctico em 50,00 g/L usando diferentes estratégias de pulsos. Son e Know (2013) tiveram aumento de 30,00 g/L na produção de ácido láctico. Porém Chen et al (2012) não observaram aumento na produção de glicosamina sintase utilizando a técnica da fermentação em batelada por pulso.

De modo geral, pode-se perceber que a estratégia de alimentação por pulso pode ser utilizada para aumento da produção e produtividade do ácido láctico. A concentração residual de substrato no reator é controlada e a inibição do crescimento do micro-organismo pelo excesso de substrato é evitada.

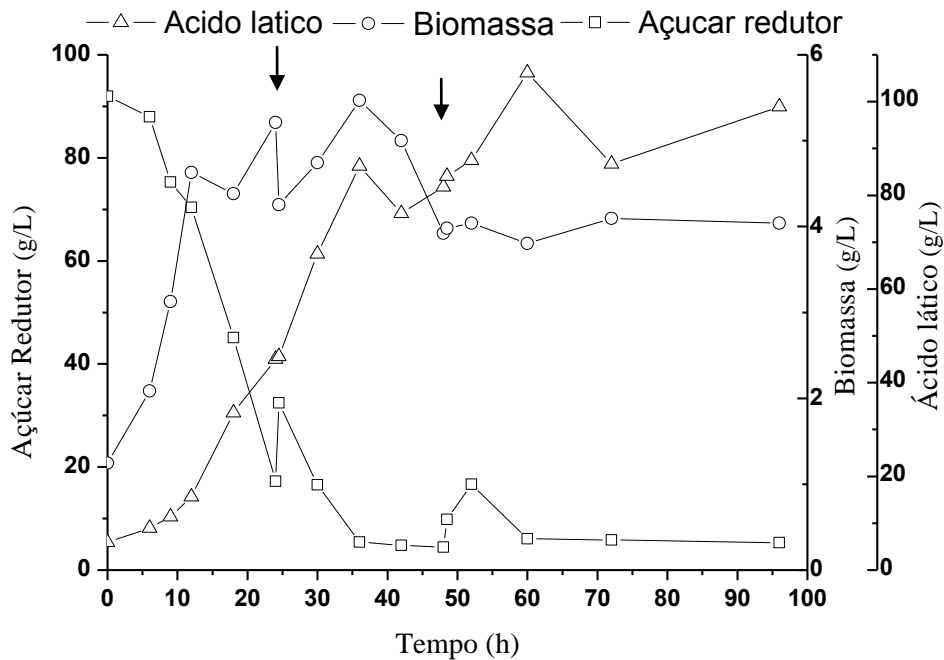


Figura 7: Produção de ácido láctico em batelada alimentada por pulso a 37°C, 200 rpm e pH 6.2 controlado com 10N NaOH. Pulsos de fluxo de 30mL/min. As setas indicam os momentos de ocorrência dos pulsos.

5.3.2 Batelada alimentada por fluxo constante

Nesta fermentação o processo de alimentação ocorreu pelo uso do fluxo constante de substrato. Quando a fermentação alcançou 18 horas, momento em que o micro-organismo se encontra na sua fase exponencial, iniciou-se a alimentação. O fluxo foi de 0,35 mL/min e teve duração de 16 horas. O tempo total de fermentação foi de 123 horas.

A maior produção de ácido láctico foi de 80,45 g/L. Ao fim da fermentação a concentração de açúcares redutores totais foi de 58,94 g/L. A máxima concentração celular foi de 7,36 g/L em 78 horas de fermentação (Figura 8).

Em comparação a fermentação em batelada por pulso, foi obtida menor produção de ácido láctico, maior concentração residual de substrato e maior concentração celular também. Em um processo industrial com apenas essas duas opções para a produção de ácido láctico, o processo em batelada alimentada por pulso seria mais interessante, uma vez que é possível obter maiores concentrações do produto com redução na concentração final do substrato.

Diferente do que foi encontrado neste trabalho, Ding e Tan (2006) não obtiveram diferenças na produção de ácido láctico quando foram usadas as duas estratégias de alimentação. Com a fermentação em batelada alimentada por fluxo constante obtiveram 135,00 g/L de ácido láctico, enquanto que para a fermentação em batelada alimentada por

pulso obtiveram 130,00 g/L. Bai et al. (2003) encontraram que a estratégia de alimentação por fluxo constante aumentou consideravelmente a produção de ácido láctico por *Lactobacillus lactis*, onde foram conseguidos 210,00 g/L de ácido láctico, restando menos de 0,50 g/L de glicose.

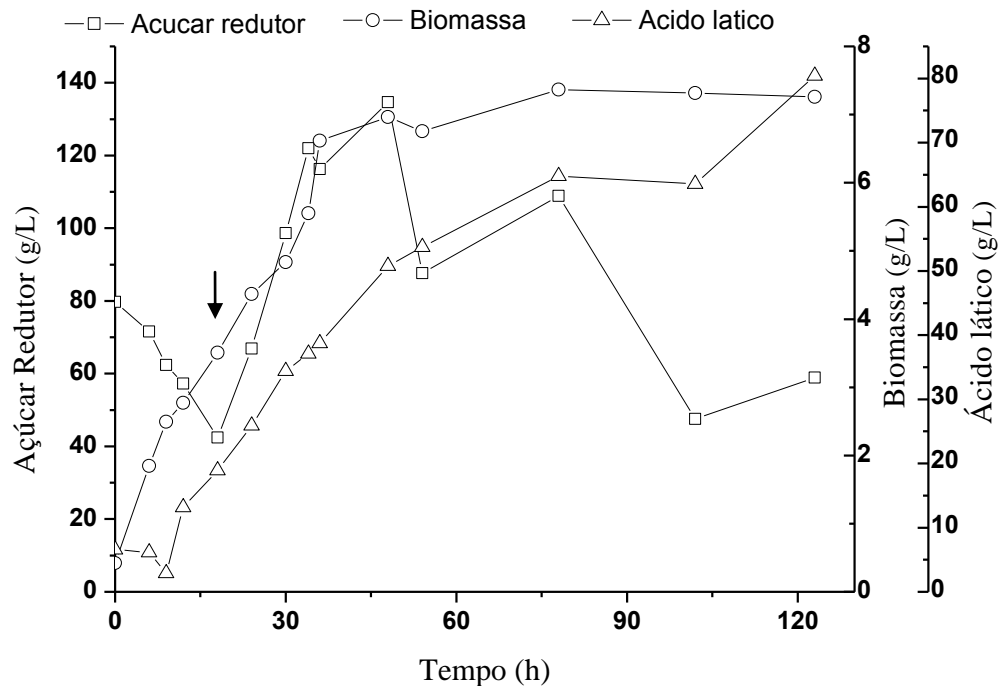


Figura 8: Produção de ácido láctico em fermentação em batelada alimentada por fluxo constante a 37°C, 200 rpm e pH 6.20 controlado com 10N NaOH com fluxo de 0,35 mL/min. A seta indica o início da alimentação.

5.3.3 Batelada alimentada por pH stat

Na fermentação batelada alimentada por pH stat o objetivo era que o substrato fosse adicionado ao meio de fermentação conforme ocorresse a queda do pH durante o processo fermentativo. A queda do pH indica que houve produção de ácido láctico e consumo de substrato, assim se o substrato for adicionado conforme houver necessidade espera-se que a produção de ácido láctico aumente.

Neste trabalho foram estudadas quatro formas de controle de pH. Na primeira fermentação do tipo pH stat foi usado lactose (reagente puro) e AMM adicionado ao hidróxido de sódio 5N. Na segunda foi usado como controle de pH soro de queijo, a água de maceração de milho e hidróxido de sódio 10N. Na terceira foi utilizado soro de queijo e AMM e a concentração de NaOH foi de 5N. Finalmente na quarta fermentação apenas soro de queijo e água de maceração de milho foram usados para o controle do pH da fermentação.

Diferentes concentrações de hidróxido de sódio foram estudadas para análise sobre a concentração de hidróxido e a produção de ácido láctico. Quanto maior a concentração de hidróxido de sódio, menor quantidade de meio de alimentação foi adicionado ao fermentador. No entanto, em batelada alimentada é interessante que seja adicionada maior concentração de substrato sem que haja inibição do micro-organismo, por isso a realização das diferentes fermentações com diferentes concentrações de hidróxido de sódio.

5.3.3.1 Meio de alimentação: lactose (reagente puro) +AMM + NaOH 5N

Nesta fermentação a concentração de ácido láctico ficou estável a partir de 24 horas, variando em torno de 40,00 g/L. A máxima produção e biomassa foram 41,98 g/L e 4,70 g/L respectivamente. Apesar de ser uma fermentação com baixa produção de ácido láctico a concentração residual de açúcares redutores teve um aspecto positivo, uma vez que restou apenas 7,78 g/L (Figura 9).

Considerando as outras fermentações realizadas, esta foi a que apresentou os resultados menos satisfatórios para produção de ácido láctico, menores inclusive que a fermentação em batelada.

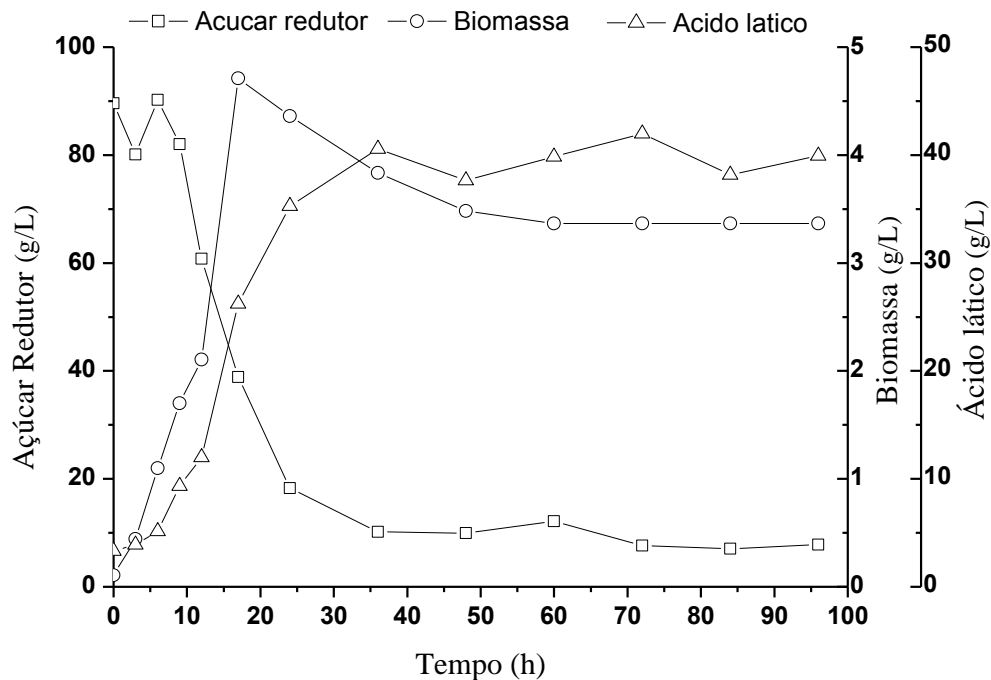


Figura 9: Produção de ácido láctico em fermentação pH stat a 37°C, 200 rpm e pH 6.2 controlado com lactose, AMM e NaOH 5N

5.3.3.2 Meio de alimentação: soro de queijo +AMM + NaOH 10N

Nesta fermentação observa-se maior produção de ácido láctico quando comparada com a fermentação em pH stat tendo lactose sintética, AMM e NaOH 5N como alimentação.

A maior produção de ácido láctico foi de 92,15 g/L em 48 horas de fermentação, quando ocorre uma ligeira queda na produção. Também é possível observar que a concentração de biomassa apresenta decréscimo e que a concentração de açúcar se mantém constante (Figura 10). A concentração de açúcares redutores ao fim da fermentação foi de 10,25 g/L e a maior concentração de biomassa foi de 6,05 g/L, quando a fermentação completava 24 horas.

A concentração celular se mantém relativamente constante a partir de 60 horas de fermentação. Os fatores que causam a parada no crescimento nem sempre são claros. A exaustão de nutrientes e acúmulo de metabólitos podem ter influencia sobre esse processo (TORTORA et al., 2010).

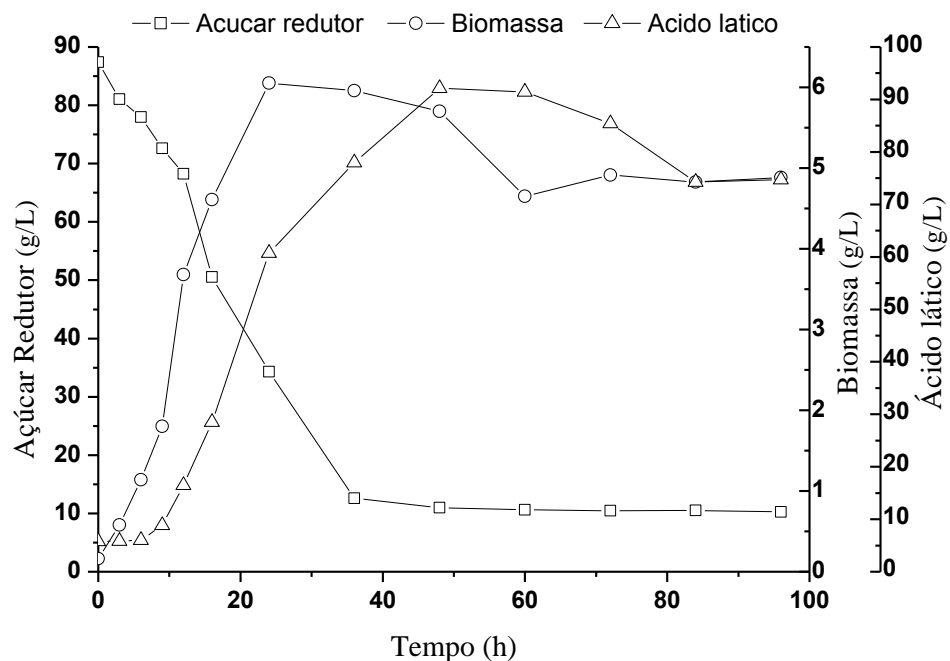


Figura 10: Produção de ácido láctico em fermentação batelada alimentada pH stat a 37°C, 200 rpm e pH 6.2 controlado com soro, AMM e NaOH 10N.

5.3.3.3 Meio de alimentação: soro de queijo + AMM + NaOH 5 N

Esta fermentação apresentou produção de 112,00 g/L de L(+) ácido láctico, concentração final de açúcares redutores de 29,90 g/L e máxima biomassa de 8,47 g/L. Na Figura 11 é possível observar que a produção de ácido láctico está parcialmente associada ao crescimento. Comparando esta fermentação com aquela realizada com NaOH 10N houve maior produção de ácido láctico.

Todas as fermentações apresentadas até aqui apresentam pronunciado crescimento do micro-organismo nas primeiras horas de fermentação, sem expressivo consumo de açúcares redutores. Como foi utilizado soro de queijo na composição do meio de fermentação é possível que haja outros carboidratos fermentescíveis em sua complexa composição que possam ser utilizados pelo micro-organismo para seu crescimento.

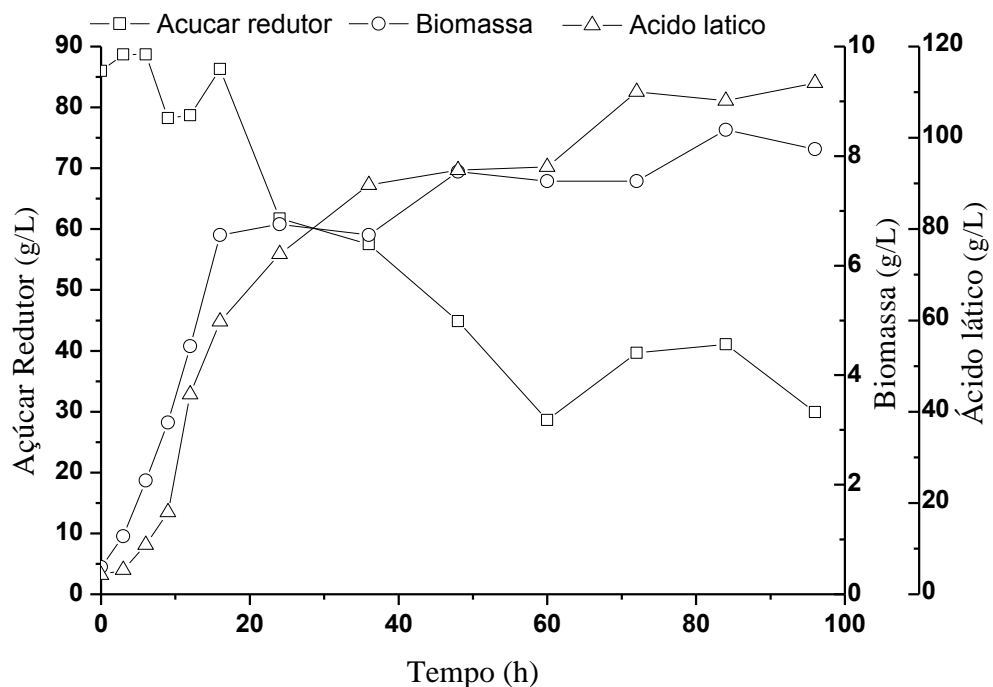


Figura 11: Produção de ácido láctico em fermentação em batelada alimentada pH stat a 37°C, 200 rpm e pH 6.2 controlado com soro, AMM e NaOH 5N.

5.3.3.4 Meio de alimentação: somente soro de queijo e AMM

Esta fermentação apresentou os melhores resultados para produção de ácido láctico e para o crescimento de biomassa. Apenas a concentração final de açúcares redutores que ficou um pouco mais elevada nesta fermentação (24,10 g/L) quando comparada com a fermentação em batelada por pulso (5,30 g/L). Os fatores cinéticos também foram os melhores (Tabela 3 e Tabela 5). O valor final da produção de ácido láctico foi de 143,70 g/L em 96 horas de fermentação e o valor máximo de biomassa foi de 11,33 g/L (Figura 12).

Considerando os gráficos para biomassa da fermentação em batelada e o da fermentação em batelada alimentada pH stat (somente soro e AMM) observa-se o prolongamento da fase exponencial, especialmente quando se considera a diferença de biomassa entre os pontos de 12 horas e 24 horas. Para a fermentação em batelada a diferença é de 1,44 g/L e para a fermentação em batelada alimentada pH stat (somente soro e AMM) a diferença é de 4,77 g/L. O aumento da concentração celular é um dos objetivos da fermentação em batelada alimentada (WANGSA-WIRAWAN et al., 1997).

Comparando-se as três fermentações em batelada alimentada por pH stat que possuíam soro de queijo no meio de alimentação, a fermentação que apresentou melhores resultados foi a pH stat tendo na alimentação apenas soro de queijo e AMM, sem adição de NaOH. Com a ausência do hidróxido de sódio o controle de pH se deu exclusivamente pelo meio de alimentação (soro e AMM). Portanto, foi adicionada maior quantidade de substrato ao meio de fermentação, o que pôde proporcionar aumento na produção do ácido láctico. Como não foi adicionado nenhuma base para o controle de pH, o controle do pH da fermentação se deu exclusivamente pelos resíduos da agroindústria.

Zhang et al (2010) usaram um método simples de alimentação baseado no pH. Eles controlaram o pH e a concentração de substrato concomitantemente com o intuito de aumentar a produção de ácido láctico em uma cultura alimentada. No processo em batelada simples, iniciaram a fermentação com 106,00 g/L de glicose. A máxima concentração celular e produção de ácido láctico obtida foram de 3,30 g/L e 82,70 g/L respectivamente. Já na fermentação em batelada alimentada pH stat eles misturaram, proporcionalmente, a glicose com hidróxido de amônio. Iniciaram a fermentação com 38,00 g/L e obtiveram concentração final de ácido láctico de 96,30 g/L, ou seja, aumento de 13,60 g/L. Neste trabalho o aumento na concentração de ácido láctico usando a fermentação em batelada alimentada pH stat em relação a fermentação em batelada foi de 86,70 g/L (Tabela 4).

Com o objetivo de aumentar a produção de ácido láctico através da técnica da fermentação em batelada alimentada por pH stat, também, foi estudada para células

imobilizadas conseguindo uma aumento na produção de 16,60 %, sendo a produção de ácido láctico 110,3 g/L (ZHANG et al., 2011).

Para a produção de L- triptofano Cheng et al (2013) usaram *E. coli* e como método de alimentação da fermentação em batelada pH stat. Conseguiram aumentar a produção do aminoácido de 43,65 g/L para 52,43 g/L. A técnica do pH stat também foi usada para produção de butanol onde foi alcançada produção de 15,50 g/L enquanto que na fermentação em batelada a produção foi de 5,98 g/L (OSHIRO et al., 2010). Esta técnica foi aplicada também na produção de ramnolipídio, Chen et al (2007) que obtiveram uma produção de 9,40 g/L, alcançando um aumento de 4,09 g/L.

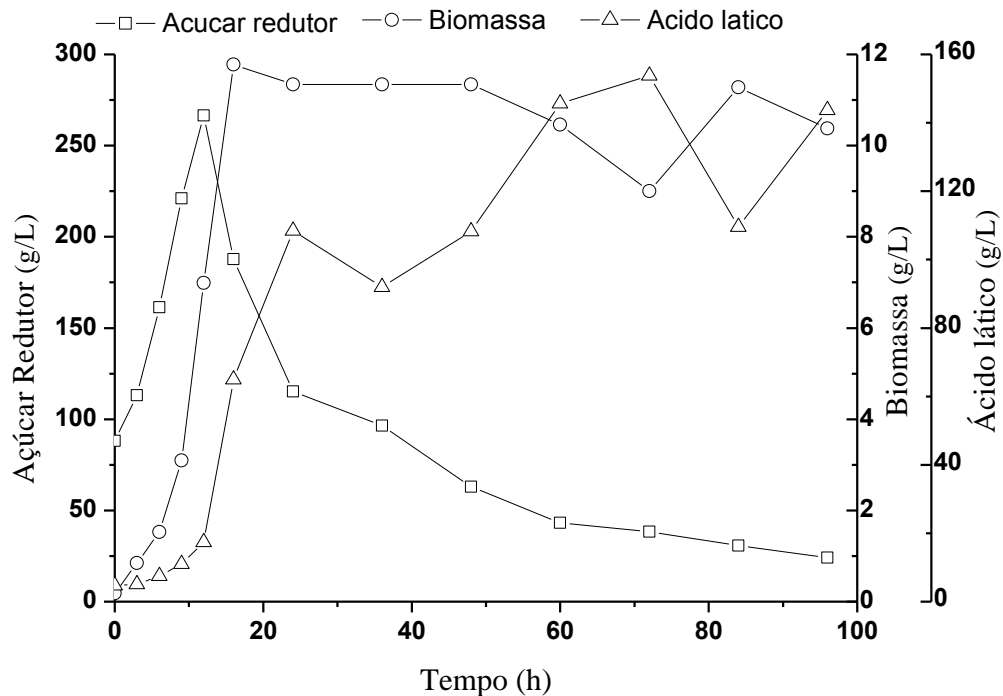


Figura 12: Fermentação batelada alimentada pH stat a 37°C, 200 rpm e pH 6.2 controlado com soro e AMM

5.4 Comparação da produtividade e produção entre as fermentações

Em 24 horas a fermentação em batelada alimentada por pH stat (soro + AMM + NaOH 5N) apresentou o valor de 3,10 g/L/h (Tabela 3). No entanto, em 48 horas o valor da produtividade para ácido láctico cai substancialmente, enquanto que a fermentação pH stat (somente soro e AMM) manteve a sua produtividade relativamente constante até o fim do processo. Na fermentação em batelada alimentada pH stat (somente soro + AMM) foram observados maiores valores de biomassa e em todos os momentos em que foi avaliada. Em

todas as outras fermentações foi observado decréscimo nos valores de produtividade de biomassa com o decorrer do tempo.

Ye et al (2013) conseguiram a maior produtividade para ácido láctico publicada até o momento. Usando *Bacillus coagulans* C106 e xilose como fonte de carbono alcançaram a produtividade de 7,50 g/L/h durante o processo batelada. Ao contrário do que foi encontrado neste trabalho, quando os autores realizaram o processo fermentativo da batelada alimentada encontraram valores menores de produtividade, que foi de 4,00 g/L/h. No entanto, este valor ainda se apresenta extremamente elevado para processos em batelada alimentada.

Son e Kwon (2013) usaram como fonte de carbono amido solúvel e o micro-organismo *Lactobacillus manihotivorans* e realizaram fermentações em batelada e em batelada alimentada. Seus resultados estão de acordo com os encontrados neste trabalho, no processo em batelada a produtividade do ácido láctico foi de apenas 0,34 g/L/h enquanto que no processo em batelada alimentada a produtividade quase dobrou de valor, 0,60 g/L/h.

Tabela 3: Valores de produtividade para todas as fermentações

Tipos de fermentação	Produtividade (g/L/h)							
	24h		48h		96h		123h	
	AL*	Biomassa	AL*	Biomassa	AL*	Biomassa	AL*	Biomassa
Batelada	1,18	0,17	1,18	0,09	-	-	-	-
Alimentada por pulso	1,90	0,17	1,17	0,08	1,03	0,04	-	-
Alimentada fluxo constante	1,07	0,18	1,05	0,14	-	-	0,65	0,05
pH stat lactose	1,47	0,18	0,78	0,07	0,41	0,03	-	-
pH stat soro + 10N NaOH	2,53	0,25	1,9	0,11	0,77	0,05	-	-
pH stat soro + 5N NaOH	3,10	0,28	1,93	0,16	1,16	0,08	-	-
pH stat + soro	2,70	0,49	2,25	0,23	1,49	0,1	-	-

*AL= Ácido láctico

A Tabela 4 apresenta os dados de produção ao fim de cada fermentação e também a variação percentual de cada fermentação em relação ao processo em batelada. As fermentações em batelada alimentada do tipo pH stat apresentam melhores resultados.

Tabela 4: Dados de produção e variação percentual para as fermentações realizadas

	Produção de ácido láctico (g/L)	Varição percentual (%)
Batelada	57,00	
Alimentada por pulso	98,90	+ 73,50*
Alimentada fluxo constante	80,45	+41,14
pH stat lactose	39,94	- 29,92
pH stat soro + 10N NaOH	74,70	+31,05
pH stat soro + 5N NaOH	112,00	+96,49
pH stat + soro	143,70	+152,10

* O sinais + e – significam aumento e queda na produção em relação a fermentação em batelada

Podemos observar que as fermentações do tipo pH stat que continham soro de queijo e AMM na composição do meio de alimentação apresentaram os maiores aumentos percentuais quando comparados a fermentação em batelada (152,10 % e 96,49 %). Com relação a fermentação do tipo pH stat com lactose na alimentação houve redução de 29,92 % na produção de ácido láctico. A fermentação em batelada alimentada por pulso também apresentou bom aumento na produção de ácido láctico (73,50 %).

5.5 Comparação entre fatores de conversão das fermentações

É importante considerarmos os valores da cinética do processo fermentativo, pois estes são os pontos de partida para o dimensionamento de uma instalação produtiva. Descrevem quantitativamente o processo e auxilia na determinação de sua duração, considerando o instante em que a biomassa e produtos são máximos. Além disso, possibilita a comparação entre diferentes condições de cultivo, através de variáveis como os fatores de conversão.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores dos fatores de conversão para todos os processos fermentativos. São oferecidos os valores de conversão de açúcares redutores em ácido láctico (Y_p/s), conversão de substrato de biomassa em ácido láctico (Y_p/x) e conversão de açúcares em biomassa (Y_x/s). A fermentação que apresenta melhor conversão do substrato em produto é a fermentação em batelada alimentada por pH stat (somente soro e AMM), seguida pela batelada alimentada por pH stat (soro + AMM+ NaOH 5N). Avaliando-se a conversão de biomassa em produto a fermentação que apresenta o maior resultado é a fermentação em batelada alimentada por pulso. Por fim, a conversão de substrato em células também

apresentou os melhores resultados foi a fermentação em batelada alimentada pH stat (somente soro e AMM).

Tabela 5: Valores dos fatores de conversão

Tipos de bateladas	Fatores de conversão		
	Y _{p/s} (g/g)	Y _{p/x} (g/g)	Y _{x/s} (g/g)
Batelada	1,01	13,73	0,07
Alimentada por pulso	1,68	51,59	0,01
Alimentada fluxo constante	0,41	12,75	0,04
pH stat lactose (sintética)	0,44	11,23	0,03
pH stat soro + 10N NaOH	0,89	14,59	0,06
pH stat soro + 5N NaOH	1,92	14,12	0,13
pH stat + soro	2,16	13,63	0,15

5.6 Planejamento composto central e superfície de resposta

A influência das variáveis, concentração de carvão (X_1) e temperatura (X_2) na remoção de cor do caldo de fermentação foi estudada segundo um planejamento fatorial composto central com três réplicas no ponto central, perfazendo um total de 11 experimentos. A matriz do planejamento, assim como as respostas (remoção de cor, ácido láctico e ART) estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Matriz do planejamento experimental composto central (valores reais e codificados) com a resposta produção de ácido láctico.

Experimentos	Carvão (%)	Temperatura (°C)	Remoção de cor (%)	Ácido láctico (g/L)	ART (g/L)
1	3 (-1) ^a	35 (-1)	25,57	120	5,32
2	3 (-1)	75 (1)	27,98	120	5,60
3	17 (1)	35 (-1)	77,87	123	6,00
4	17 (1)	75 (1)	97,45	126	6,57
5	0,13 (-1,41)	55 (0)	9,31	139	6,96
6	19,87 (1,41)	55 (0)	96	114,40	6,18
7	10 (0)	26,80 (-1,41)	73,67	127,84	6,22
8	10 (0)	83,20 (1,41)	72,20	137,20	6,36
9	10 (0)	55 (0)	73,24	137,60	6,66
10	10 (0)	55 (0)	81,42	126,60	6,88
11	10 (0)	55 (0)	79	123	6,50

^a (-1,42), (-1), (0), (1) e (1,41) são níveis codificados.

As maiores remoções de cor do caldo fermentado foram observadas nos experimentos 4 e 6, sendo de 97,45 % e 96% respectivamente. As concentrações de ácido láctico e de ART não foram influenciadas pelo carvão e pela temperatura.

A partir dos dados experimentais referentes a remoção de cor do caldo fermentado apresentados na Tabela 6 foi feita a análise de regressão múltipla que gerou a equação de regressão (10), apresentada abaixo:

$$Y = 77,88 + 30,54X_1 + 2,48X_2 - 14X_1X_1 + 4,29X_1X_2 - 3,86X_2^2 \quad (\text{Eq.10})$$

Onde Y é a resposta predita, que é a remoção de cor, e X_1 e X_2 são as variáveis codificadas para % de carvão e temperatura, respectivamente.

O teste de Fisher F-test foi usado para checar a significância estatística da Equação (10). A Tabela 7 apresenta a distribuição *t* de Student e os correspondentes valores, juntamente com os parâmetros estimados. A identificação dos parâmetros significativos foi realizada através de testes de hipóteses utilizando a estatística *t* de Student. A probabilidade (*P*) foi utilizada como uma ferramenta para verificar a significância de cada um dos coeficientes. Foi estabelecida uma probabilidade máxima de erro no teste de 5%, desta forma, os parâmetros com valor de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Tabela 7: Coeficiente do modelo estimado pela regressão linear

Fator	Coeficiente	Erro padrão	<i>t</i> -valor	<i>P</i> -valor
Intercepto	77.8892	3.366028	23.13980	0.000003
X_1	30.5459	2.061265	14.81898	0.000025
X_2	2.4885	2.061265	1.20729	0.281312
X_1^2	-14.0087	2.453402	-5.70991	0.002302
X_1X_2	4.2937	2.915066	1.47295	0.200755
X_2^2	-3.8699	2.453402	-1.57735	0.175543

Os resultados mostram que a variável X_1 e X_1^2 tiveram efeito significativo (Tabela 7, observados através do *P*-valor), sendo que a variável X_1 teve efeito positivo, ou seja, um aumento nas suas concentrações acarreta um aumento da resposta (remoção de cor).

O modelo quadrático da superfície de resposta foi realizado na forma de análise de variância (ANOVA) e os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Análise de variância do modelo polinomial de segunda ordem

Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	$p > F$
-------	-------------------	--------------------	----------------	-------------------	---------

Regressão	8696,241	5	1739,248	51,16875	0,000271
Residual	169,952	5	33,990		
Falta de ajuste	134,674	3	44,891	2,5450	0,294603
Erro puro	35,279	2	17,639		
Total	8866,193	10			

$R^2 = 0,98$; Ajustado $R^2 = 0,96$; $R = 0,99$;

A ANOVA do modelo de regressão quadrático demonstrou que o modelo é altamente significativo, como é evidente pelo teste de Fisher, teste-F ($F_{\text{calc}}(5,5) = 51,16875 > F_t(5,5) = 5,05$ e tem um valor de probabilidade muito baixo ($p < 0,000271$). O bom ajuste do modelo foi verificado pelo coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação múltipla (R). Neste caso, o valor de R^2 (0,98) indica que 98% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo. O coeficiente de determinação ajustado ($R^2 = 0,96$) também foi satisfatória para confirmar a significância do modelo.

A Figura 13 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero e a Figura 14, o gráfico de valores predito em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

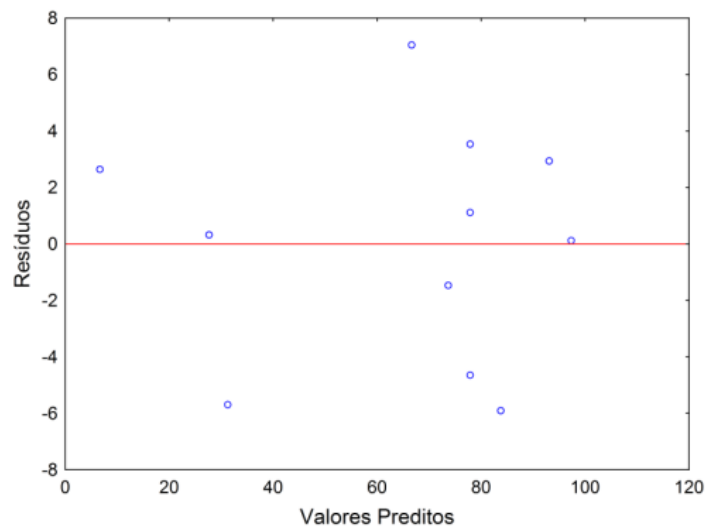


Figura 13: Distribuição dos resíduos relativos à produção de ácido lático

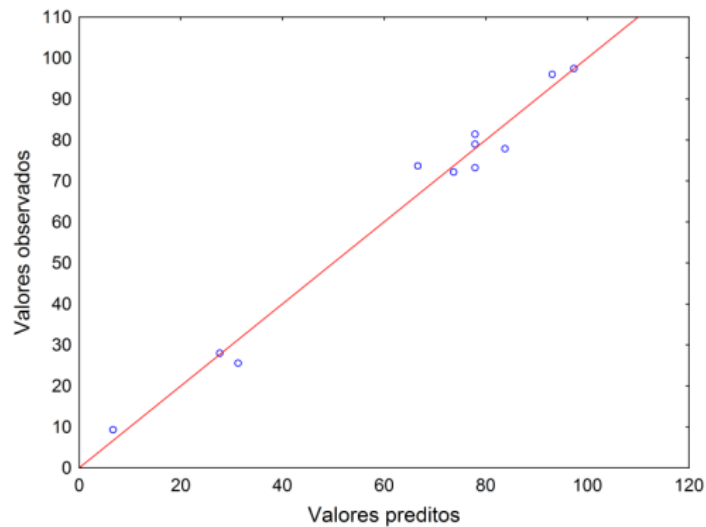


Figura 14: Valores preditos em função dos observados relativos à produção de ácido lático

A partir da equação 10 foi construída a superfície de resposta para remoção de cor, como uma função das variáveis, carvão e temperatura.

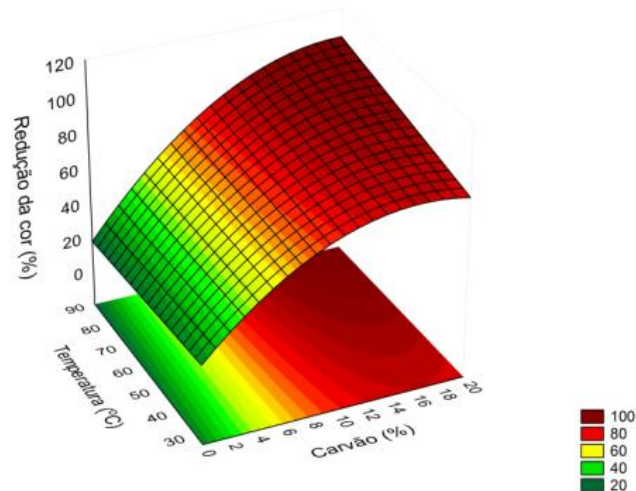


Figura 15: Superfície de resposta para redução da cor do caldo fermentado, mostrando a interação entre o carvão e a temperatura.

Pela análise da Figura 15 é possível visualizar a forte influencia da concentração de carvão na remoção de cor do caldo, já a temperatura não influenciou. A faixa ótima para a concentração de carvão está entre 14 e 18% de carvão.

O ponto de máxima clarificação do caldo de fermentação foi determinado através de uma análise canônica do modelo ajustado. Foi realizado um estudo para identificar a natureza do ponto estacionário para verificar a ocorrência de um ponto de máxima ou mínima resposta,

ou ainda de um ponto de sela. Isto foi feito calculando-se as raízes características da matriz A, que é a matriz dos coeficientes dos termos quadráticos e dos termos de interação do modelo ajustado. Portanto temos a Equação 11:

$$A := \begin{bmatrix} -14 & 2.145000000 \\ 2.145000000 & -3.86 \end{bmatrix} \quad (\text{Eq.11})$$

Cujas raízes características são iguais a:

$$\lambda_1 = -14,43 \quad \lambda_2 = -3,42$$

Observa-se que todas as raízes características da matriz A (Eq.11) possuem sinais negativos. Isto quer dizer que um deslocamento a partir do ponto estacionário em qualquer direção implicará em um decréscimo na resposta. Portanto, conclui-se que o ponto estacionário x_0 é ponto de máximo.

O vetor dos coeficientes dos termos de 1ª ordem da Equação 10 é dado por:

$$b = \begin{bmatrix} 30,54 \\ 2,48 \end{bmatrix} \quad (\text{Eq.12})$$

Com o vetor b e com a matriz A calculou-se o ponto estacionário x_0 através da Equação 10.

$$x_0 = \begin{bmatrix} 1,24 \\ 1,01 \end{bmatrix} \quad (\text{Eq.13})$$

No qual 1,24 e 1,01 correspondem respectivamente aos valores das variáveis independentes X_1 e X_2 no ponto estacionário. Utilizando as equações de codificação (1) e (2) obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da produção de ácido láctico.

A concentração ótima de carvão ativado encontrada foi de 18,72%. A partir dos valores codificados das variáveis X_1 e X_2 no ponto de otimização, determinou-se que a redução de cor estimada neste ponto é de 98,17%. Para confirmar se o modelo estava adequado para prever a máxima redução de cor do caldo, três experimentos adicionais foram conduzidos com as características ótimas. A média dos valores de redução de cor do

caldo foi de 96,06%, que esta próximo com o valor predito 98,17%. Então, foi provado que este modelo é adequado.

5.7 Purificação utilizando carvão ativado em pó

Após a centrifugação do meio de fermentação selecionado, o sobrenadante foi colocado em contato com 18,72 % (m/v) de carvão ativado em pó por uma hora. A mistura foi centrifugada. No início do processo a concentração de ácido láctico, proteínas e açúcar eram de 145,40 g/L, 10,28 g/L e 7,10 g/L respectivamente. Após o processo com carvão ativado a concentração de ácido láctico era de 142,20 g/L e a de açúcar 1,24 g/L, já a concentração de proteínas se tornou indetectável pelo método de Lowry utilizado. Para o cálculo do rendimento temos que considerar o volume em cada uma das fases. No início do processo tínhamos 320 mL enquanto que no final foram obtidos 170 mL, assim o rendimento deste processo (recuperação do ácido láctico) foi de 52 % (Tabela 13).

5.8 Purificação utilizando carvão ativado e celite

Como observado na purificação anterior a utilização de carvão ativado foi bastante eficiente na remoção de cor e de proteína, entretanto houve também grande perda de ácido láctico (rendimento de 52 %). Essa perda de ácido láctico poderia ser decorrente do processo de separação do carvão ativado da solução.

Assim, realizou-se a filtração o vácuo para separação da solução de ácido láctico do carvão ativado em pó e para isto utilizou-se também o celite que é um reagente que retém o carvão, além de ser um composto muito utilizado para realizar filtrações, purificações e clarificações de soluções (SILVA et al., 2008).

Dessa maneira o caldo fermentado foi filtrado em um funil de placa sinterizada contendo celite e carvão ativado conforme descrito em 4.5.1.4. Os resultados dos experimentos realizados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 Resultados obtidos nas filtrações utilizando celite e carvão.

	1° Experimento		2° Experimento	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Ácido láctico (g/L)	109,00	92,04	109,00	76,06
Açúcar (g/L)	7,00	0,76	7,00	1,17
Proteína (g/L)	11,51	0,24	11,51	0
Volume (mL)	10,00	10,00	15,00	20,00
Eficiência (%)		84		93

Observando os dados da Tabela 9 é possível verificar que houve maior recuperação do ácido láctico (84% e 93%) utilizando a filtração a vácuo com celite e carvão ativado, quando comparado com o método onde somente carvão ativado foi usado. Além disso, a remoção de açúcar e proteína continuou praticamente a mesma. Estas soluções foram submetidas a posterior purificação com resina IRA 67.

A solução final obtida na filtração com carvão e celite apresenta uma pureza relativamente alta, sendo que apenas a quantidade de açúcar está acima da desejada (quantidade de açúcar menor que 1% em relação ao ácido láctico) para a realização de uma boa polimerização.

Dessa maneira, a fim de obter uma relação de açúcar e ácido láctico menor que 1% o caldo foi submetido a duas filtrações seguidas em carvão e celite. Dessa forma, o caldo fermentado foi duplamente filtrado em um funil de placa sinterizada contendo celite e carvão ativado conforme descrito no item 4.5.1.4. Os resultados obtidos nestes experimentos são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 Resultados obtidos a partir de dupla filtração utilizando celite e carvão.

	1° Experimento		2° Experimento	
	Caldo inicial	Solução final (duplamente filtrado)	Caldo inicial	Solução final (duplamente filtrado)
Ácido láctico (g/L)	109,00	38,72	112,03	19,15
Açúcar (g/L)	7,00	0,21	7,97	0,16
Proteína(g/L)	11,51	0	12,10	0
Volume (mL)	10,00	20,00	50,00	290
Eficiência (%)	-	71	-	99

A Tabela 10 apresenta dois experimentos que foram realizados com dupla filtração com carvão e celite, sendo que o segundo experimento foi utilizado maior volume inicial de caldo (50 mL) e foi lavado com maior quantidade de água.

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar alta eficiência do processo utilizando dupla filtração com carvão e celite, pois foi possível obter até 99% de recuperação do ácido láctico (2º experimento), provavelmente porque foi lavado com uma maior quantidade de água. Além disso, nos dois casos houve eliminação total de proteína, presença de açúcar residual em relação ao ácido láctico menor que 1% (0,5% e 0,8% para o 1º e 2º experimento, respectivamente) e praticamente 100% de remoção de cor.

5.9 Troca iônica

5.9.1 Capacidade das resinas IRA 67 E IRA 40

A fim de verificar a capacidade de adsorção das resinas IRA 67 e IRA 400, em suas diferentes formas, as resinas foram carregadas com solução aquosa de ácido láctico com pH inicial ajustado para 5. Quando o equilíbrio foi alcançado os sobrenadantes das amostras foram retirados e as capacidades das resinas foram calculadas de acordo com a Equação 13.

$$q = LA_0 - LA_f / w \quad \text{Eq. 13}$$

Onde, LA_0 e o LA_f significam ácido láctico inicial e final do meio aquoso (g/L), respectivamente e w é o peso da resina (g).

Em menores concentrações de ácido láctico os dois tipos de resina tiveram capacidades de adsorção similares em ambas as formas. No entanto, quando as concentrações de ácido láctico foram maiores existiram diferenças na capacidade de adsorção (Figura 16).

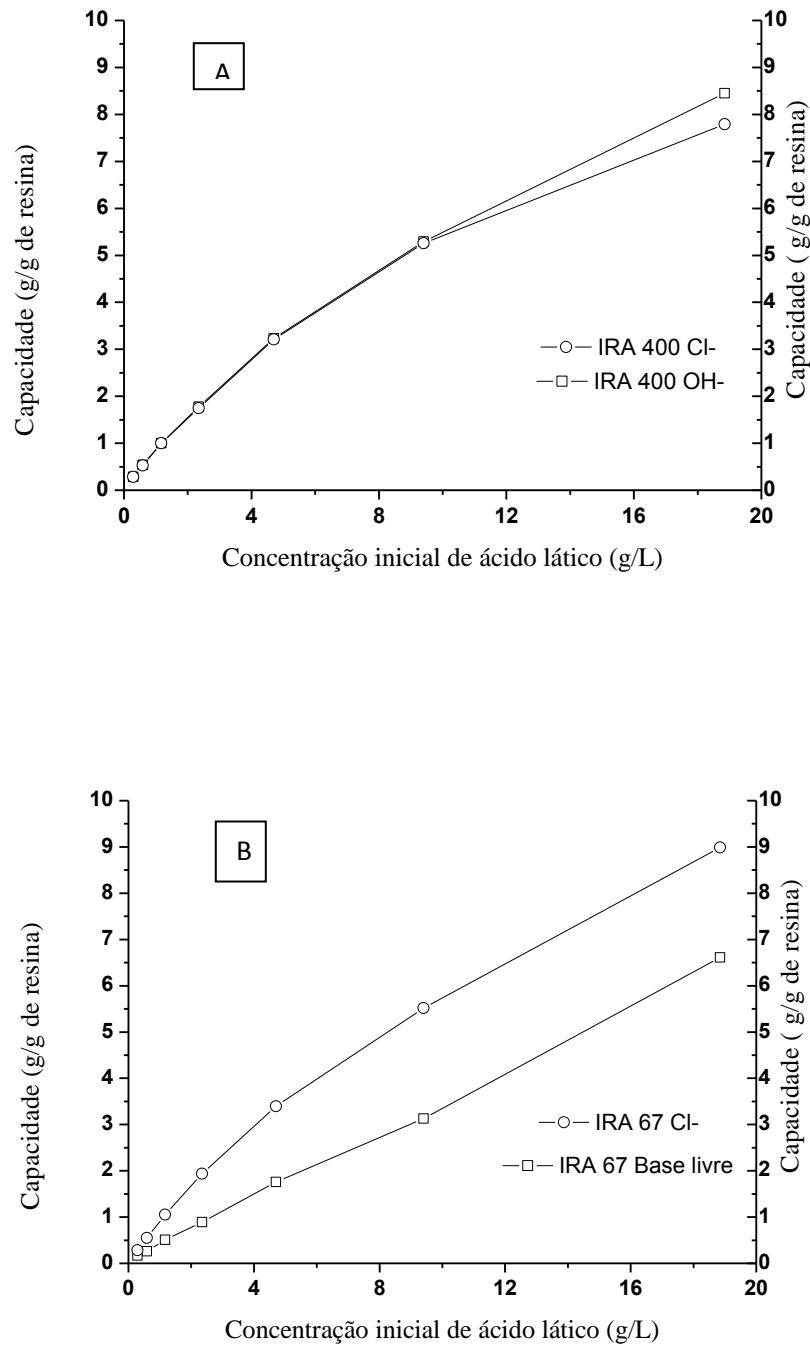


Figura 16: Capacidade de adsorção por cada resina (A: IRA 400 B: IRA 67) nas diferentes formas.

A partir da Figura 16 é possível observar que a resina IRA 67 teve maior capacidade de adsorção quando estava na forma de cloreto. Além disso, nesta forma ela teve maior capacidade de adsorção que a resina IRA 400 em qualquer forma.

John et al (2008) observaram que na forma de Cl^- , as resinas de base fraca apresentam maior capacidade de adsorção do que as resinas de base forte. Entretanto, as resinas de base forte na forma OH^- tiveram maior capacidade de adsorção do que as resinas de base fraca na forma de base livre. O mesmo fenômeno foi constatado neste estudo.

Observando a Tabela 11 e as isotermas de equilíbrio (Figuras 17, 18, 19, 20) pode-se dizer que o modelo que melhor explica a adsorção do ácido láctico nas resinas é o de Freundlich, ou seja, em multicamadas de adsorção.

Tabela 11: Valores de R^2 ajustado para os modelos de Langmuir e de Freundlich

Valor de R^2 ajustado	IRA 400 Cl^-	IRA 400 OH^-	IRA 67 Cl^-	IRA 67 Base Livre
Modelo de Langmuir	0,94372	0,91563	0,92107	0,40365
Modelo de Freundlich	0,99572	0,99572	0,99927	0,9896

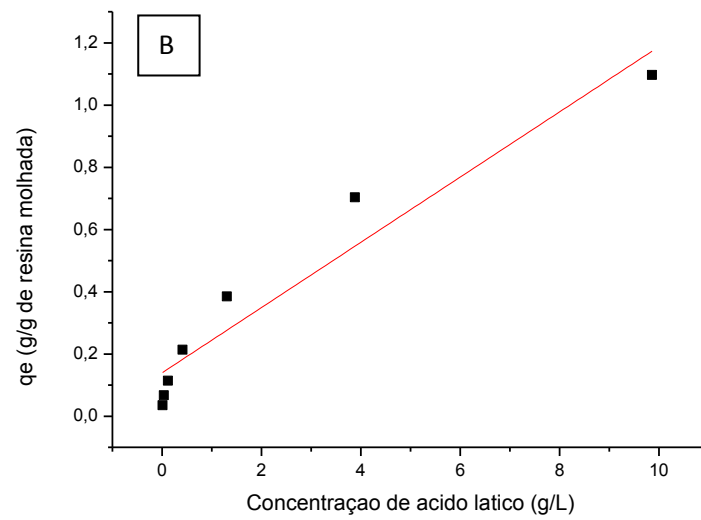
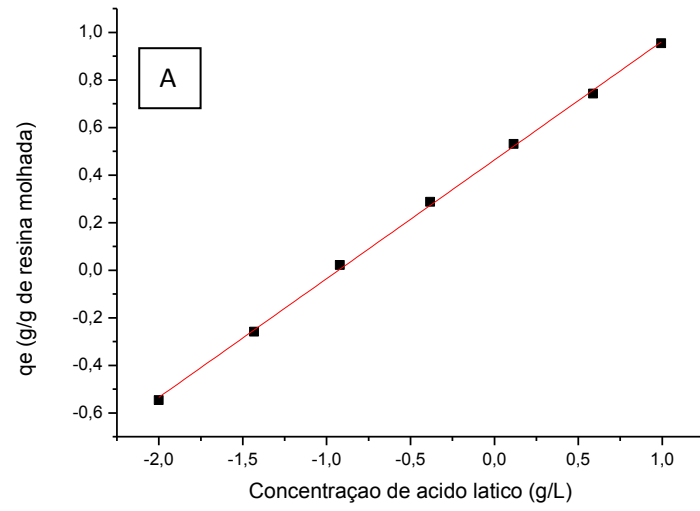


Figura 17: Isotermas de adsorção para IRA 67 Cl. A: Freundlich B: Langmuir

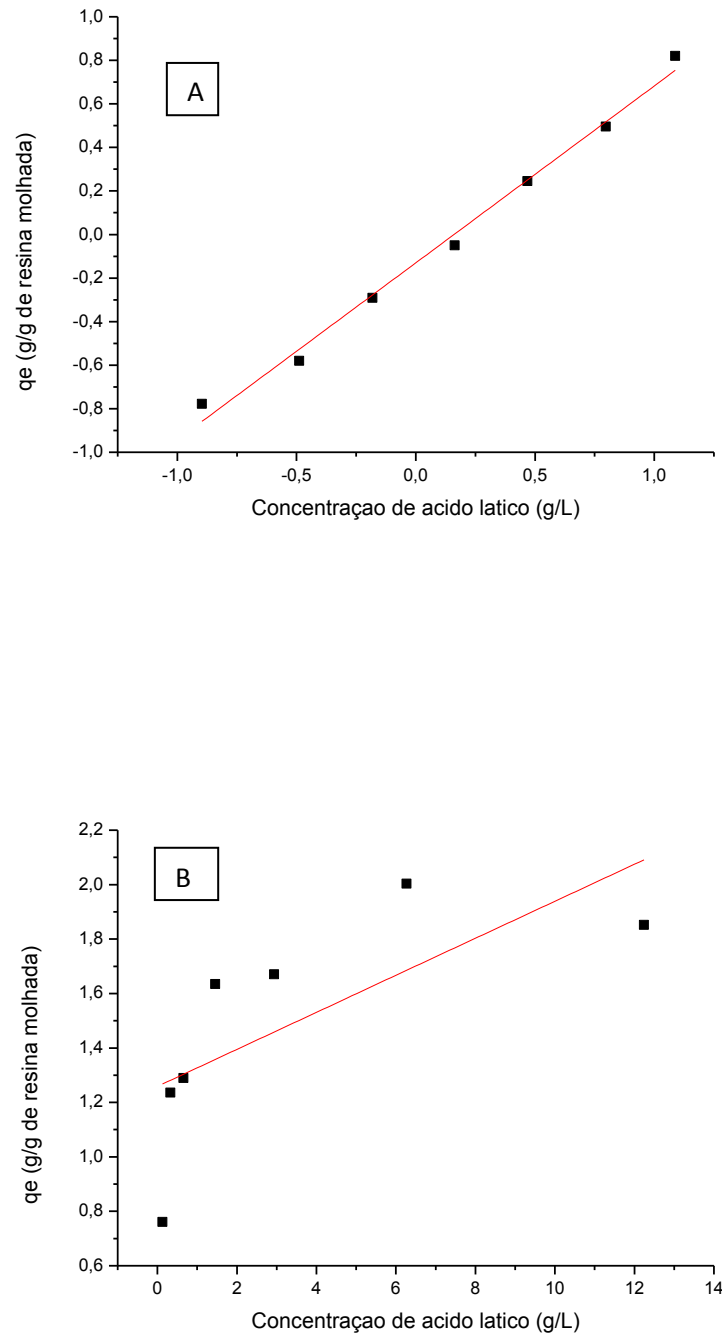


Figura 18: Isothermas de adsorção para IRA 67 Base livre. A: Freundlich B: Langmuir

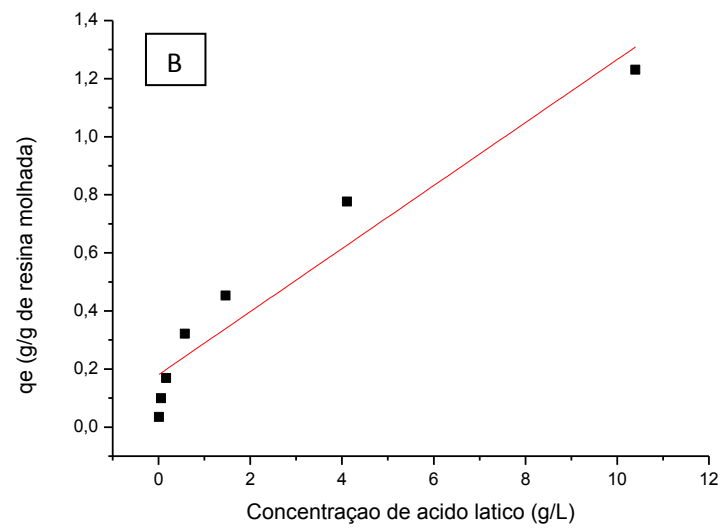
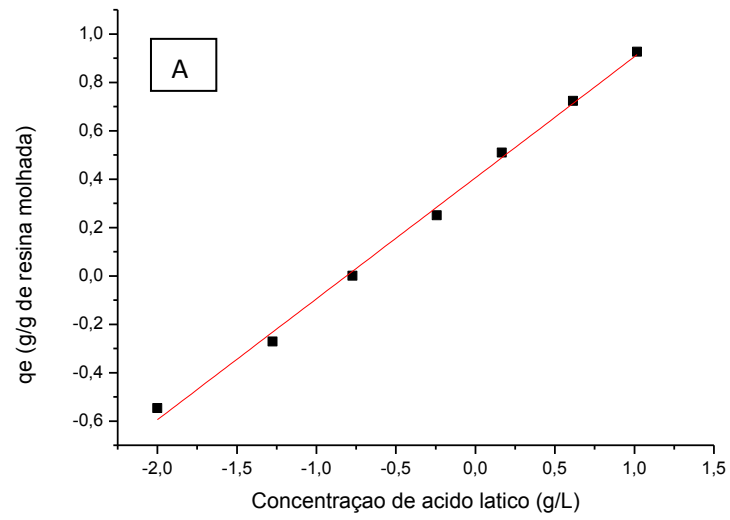


Figura 19: Isotermas de adsorção para IRA 400 OH. A: Freundlich B: Langmuir

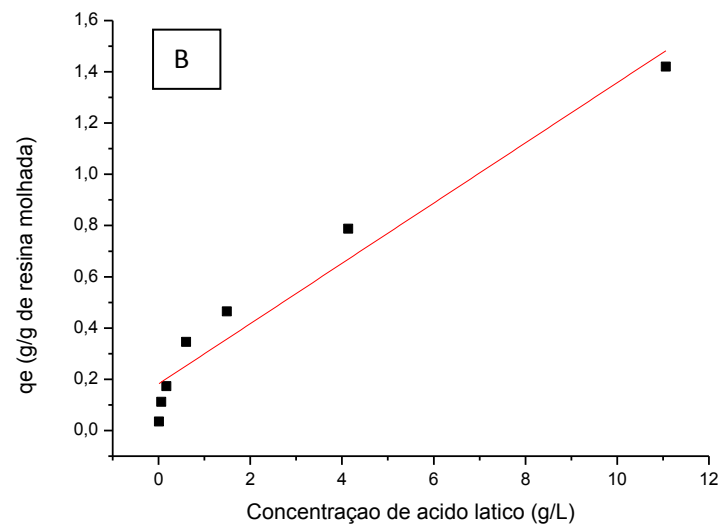
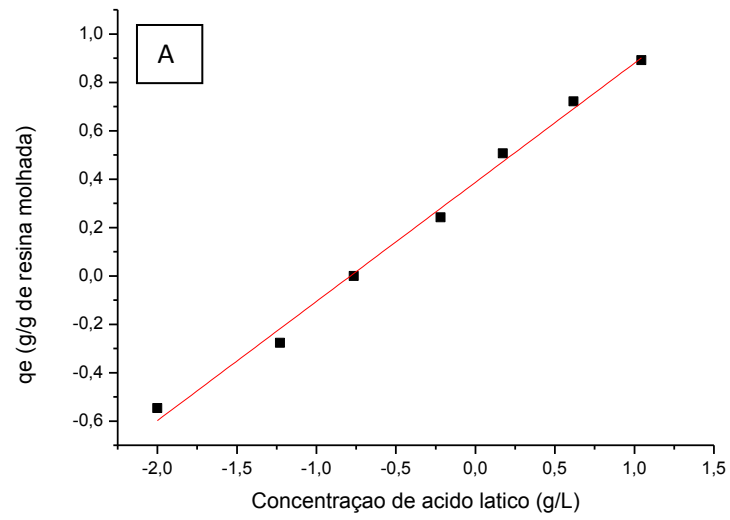


Figura 20: Isotermas de adsorção para IRA 400 Cl⁻. A: Freundlich B: Langmuir

5.9.2 Teste do eluente

Com relação aos eluentes testados (1N NaCl, 1N HCl, 1N H₂SO₄ e 1N NaOH) pode-se observar na Tabela 12 que dois eluentes apresentaram desempenhos próximos quanto a recuperação: ácido clorídrico e cloreto de sódio. Considerando etapas posteriores do processo de purificação e polimerização do ácido láctico, optou-se por trabalhar com o ácido clorídrico, uma vez que este eluente pode ser facilmente removido no processo de evaporação à vácuo.

Tabela 12: Ácido láctico eluído a partir de diferentes solventes

	Quantidade de ácido láctico presente na resina (g/L)	Ácido láctico eluído (g/L)	Recuperação (%)
1N HCl	0,484	0,322	66,52
1N NaOH	0,493	0,026	5,27
1N NaCl	0,476	0,363	76,26
1N H ₂ SO ₄	0,502	0,322	64,14

5.9.3 Recuperação e purificação do ácido láctico utilizando coluna de troca iônica

A partir dos testes preliminares de capacidade de adsorção e também de eluição foi escolhida a resina amberlite IRA 67 na forma de cloro e como eluente ácido clorídrico 1N. Os caldos fermentados utilizados nestes estudos tiveram origem na purificação utilizando carvão ativado ou na purificação com carvão ativado e celite.

No primeiro experimento uma solução (170,00 ml) contendo 142,20 g/L de ácido láctico a pH 5 foi submetida a purificação utilizando coluna de troca iônica conforme descrito no item 4.5.2.4. Após a eluição do ácido láctico com ácido clorídrico foram obtidos 50,00 ml de solução com concentração de 63,70 g/L de ácido láctico. A concentração de proteínas se tornou indetectável pelo método de Lowy e a concentração de açúcar era de 0,4 g/L (Tabela 13). Desta maneira, a eficiência (recuperação do ácido láctico) desse processo foi de 13% e a presença de açúcar em relação ao ácido láctico foi de 0,62 %.

Com o objetivo de aumentar a porcentagem de recuperação do ácido láctico realizou-se um teste em menor escala e com fluxo de 0,70 mL/min e a solução utilizada foi aquela obtida pelo processo de filtração à vácuo com carvão ativado e celite. Desta maneira 27,50 ml da solução contendo 60,50 g/L de ácido láctico foram submetidos ao processo de purificação e ao fim desta etapa foi obtida uma solução de 43,00 ml (em razão das lavagens feitas com água

destilada) com 15,20 g/L de ácido lático, 0,33 g/L de açúcar e concentração de proteínas indetectável pelo método de Lowry. A eficiência deste processo foi de 45% e a presença de açúcar em relação ao ácido lático na solução foi de 2,2 % (Tabela 13).

No terceiro processo, aumentou-se o tempo de adsorção da solução contendo ácido lático com a resina, objetivando diminuir a perda de ácido lático durante a etapa de lavagem com água destilada. Assim, 10,00 mL da solução proveniente da filtração à vácuo com carvão ativado e celite com concentração de 92,04 g/L permaneceu em contato com a resina IRA 67 por 12 horas e após este período foi submetida ao processo na coluna de troca iônica. Ao final foram obtidos 52,60 ml de solução com concentração de 5,89 g/L de ácido lático e 0,17 g/L de açúcar. A eficiência deste processo foi de 47,00 % a percentagem de açúcar em relação ao ácido lático foi de 1,20 % (Tabela 13). Com este resultado foi possível verificar que o aumento do tempo de adsorção para 12 horas não melhorou a eficiência de recuperação do ácido lático, visto que foi obtido resultado semelhante à purificação anterior.

Por fim realizou-se o quarto processo, onde a quantidade de resina foi aumentada consideravelmente, em relação ao volume de solução utilizada na purificação. A hipótese aqui estudada foi de que durante os outros processos não haveria quantidade de resina suficiente para adsorver o grande volume de caldo adicionado. Para o estudo desta hipótese, 20,00 mL de solução contendo 76,06 g/L de ácido lático foi submetida ao processo na coluna de troca iônica com 50,00 g da resina em um fluxo de 0,50 ml/min. Ao final do processo foi obtido 110,5 ml de solução com concentração de 7,81 g/L de ácido lático e 0,07 g/L de açúcar. A eficiência deste processo foi de 71% e a presença de açúcar em relação ao ácido lático foi de 0,89 % (Tabela 13).

Tabela 13: Resultados obtidos nos experimentos de purificação de ácido láctico utilizando processos de troca iônica.

	1° Processo			2° Processo		
	Caldo	Carvão	Resina	Caldo	Carvão	Resina
Ácido láctico (g/L)	145,40	142,20	63,70	113,00	60,50	15,20
Açúcar (g/L)	7,01	1,24	0,40	7,00	0,78	0,33
Proteína (g/L)	10,28	0	0	11,50	0,20	0
Volume (mL)	320,00	170,00	50,00	20,00	27,50	43,00
Eficiência (%)		52	13		74	45
	3° Processo			4° Processo		
	Caldo	Carvão	Resina	Caldo	Carvão	Resina
Ácido láctico (g/L)	109,00	92,04	5,89	109,00	76,06	7,81
Açúcar (g/L)	7,00	0,76	0,17	7,00	1,17	0,07
Proteína (g/L)	11,51	0,24	0	11,51	0,17	0
Volume (mL)	10	10	52,6	15	20	110,5
Eficiência (%)		84	47		93	71

Para a purificação de um meio de fermentação composto por madeira de eucalipto Moldes et al. (2001) utilizaram a resina de base fraca IRA 67 na forma de cloreto e obtiveram recuperação de ácido láctico entre 98 e 100% em 4 ciclos. Utilizaram 42,00 g de resina e volume de caldo, em média, de 70,00 mL. Também utilizando resina de base fraca (IRA 92) para purificação de ácido láctico Tong et al. (2004) tiveram rendimento de 82,60 %. Os resultados para rendimento em coluna de troca iônica encontrados neste trabalho se encontram mais baixos (71%).

5.9.4 Nanofiltração

A fim de realizarmos o estudo sobre nanofiltração optamos por utilizar a solução proveniente do terceiro processo de purificação com a resina de troca iônica, pois neste a percentagem de açúcar em relação ao ácido láctico foi maior que 1% (1,18%). Dessa maneira 5,00 mL da solução com concentração de ácido láctico e açúcar de 5,89 g/L e 0,17 g/L, respectivamente, foi submetida ao processo de nanofiltração e após esta etapa a solução (5,00

mL) continha 4,37 g/L de ácido lático e 0,04 g/L de açúcar. O rendimento para essa etapa de purificação foi de 74,2% e a percentagem de açúcar em relação a ácido lático foi de 0,91%.

De acordo com este resultado foi possível verificar que a etapa de nanofiltração não foi muito vantajosa para este caso, pois houve pouca remoção de açúcar e perda de ácido lático.

Os resultados para rendimento do ácido lático encontrados neste trabalho são maiores que aqueles encontrados por Li et al (2008). Os autores trabalharam também com soro de queijo como fonte de carbono e obtiveram rendimento para ácido lático de 43,7% e 97%.

5.9.5 Rendimento do processo global de purificação

Ao longo deste trabalho diversas técnicas para a purificação do ácido lático foram estudadas: carvão ativado em pó, filtração com carvão ativado e celite, resina de troca iônica e nanofiltração. Algumas dessas técnicas foram combinadas e usadas em conjunto, outras foram usadas separadamente.

A Tabela 14 apresenta um resumo dos principais resultados obtidos nos processo de purificação que envolve: a de remoção de proteína e açúcar, a presença de açúcar em relação ao ácido lático (em porcentagem) e o rendimento global de cada processo (recuperação total de ácido lático), sendo que este envolve o rendimento individual de cada fase envolvida no processo.

Tabela 14 Resultados da purificação do ácido lático para todos os processos utilizados.

	Dupla filtração à vácuo (carvão e celite) (I)	Carvão ativado e troca iônica (II)	Filtração à vácuo (carvão e celite) e troca iônica (III)	Filtração à vácuo (carvão e celite), troca iônica e nanofiltração (IV)
Remoção de proteína (%)	100,00	100,00	100,00	100,00
Remoção de açúcar (%)	94,00	99,00	93,00	97,00
Relação açúcar/ ácido lático (%)	0,50	0,62	0,90	0,90
Rendimento global (%)	71,00	7,00	66,00	29,00

De acordo com a Tabela 14 foi possível verificar que em todos os casos a remoção de açúcar foi superior a 90% e as proteínas foram totalmente removidas.

Para a polimerização do ácido lático é ideal que a relação açúcar/ácido lático seja menor que 1,00 %, e em todos os casos esta relação foi observada, entretanto é possível observar que em alguns processos (I e II) esta relação foi expressivamente menor.

O processo II apresentou rendimento muito inferior (7%) quando comparado com os outros processos, o que pode ser explicado pela grande perda de ácido lático na separação do carvão ativado da solução, pela pouca quantidade de resina empregada em relação à concentração de ácido lático no processo de troca iônica e pela alta velocidade do fluxo.

O experimento IV também apresentou um baixo rendimento de recuperação do ácido lático, pois foi o processo com maior número de etapas associadas: filtração à vácuo, troca iônica e também nanofiltração. A cada etapa do processo de purificação do ácido lático há perdas que se acumulam e que é refletido na baixa recuperação global de ácido lático.

Os processos I e III apresentaram bons rendimentos de recuperação de ácido lático (71% e 66% respectivamente), entretanto as duas etapas seguidas de filtração a vácuo com celite e carvão (processo I) apresentou também uma baixa relação açúcar/ácido lático (0,5%), o que é ideal ao processo de polimerização.

Em suma, considerando as taxas de rendimento, a remoção de açúcares e proteínas e a relação açúcar/ácido lático é mais vantajoso a utilização do processo que envolve dupla filtração à vácuo com carvão em pó e celite, uma vez que este processo também reduz o tempo de operação. Não há até o momento nenhum dado na literatura que utilize celite no processo de purificação do ácido lático.

6 CONCLUSÕES

Nos processos fermentativos foram utilizados dois resíduos da agroindústria, o soro de queijo e a água de maceração de milho (AMM). A fermentação em batelada, com o microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* teve produção de 57,00 g/L de ácido lático. A fermentação em batelada alimentada por pulso teve aumento percentual, em relação a fermentação em batelada, de 73,50% e a fermentação em batelada alimentada com fluxo constante de 41,14%. Quanto as fermentações em batelada alimentada pH stat, quando lactose sintética foi usada como alimentação houve queda na produção de 29,92%, quando foi usado na alimentação soro de queijo, AMM e 10N NaOH o aumento foi de 31,05%; soro de queijo, AMM e 5N NaOH aumento de 96,49% e quando somente soro de queijo e AMM foram usados na alimentação o aumento percentual foi de 152,10%. Ressalta-se que neste trabalho foram usados dois resíduos da agroindústria como forma de controle de pH, o que dispensou o uso de bases durante a fermentação. Isso contribui com a redução dos custos do processo e com a baixo acúmulo de resíduos. O caldo proveniente desta última fermentação foi utilizado para os estudos de purificação do ácido lático.

Neste trabalho foram utilizadas diferentes técnicas de purificação como: carvão ativado em pó, filtração a vácuo com carvão e celite, coluna de resina de troca iônica e nanofiltração. Dentre as técnicas utilizadas o processo que envolve dupla filtração a vácuo com carvão e celite foi o que apresentou melhor rendimento, remoção de 100% das proteínas e baixa relação de açúcar/ácido lático, além de ser o processo que apresenta menores custos e tempo de operação. Este proceso também apresenta uma forma inovadora de purificação do ácido lático, pois não há dados na literatura de utilização de celite como reagente para purificação.

Os objetivos deste trabalho foram alcançados sendo que a melhor fermentação em batelada alimentada foi do tipo pH stat tendo soro de queijo e água de maceração de milho na alimentação, com aumento de 152,10% em relação a batelada e o melhor processo de purificação foi o processo que envolveu dupla filtração a vácuo com carvão e celite que teve rendimento de 71%, com remoção de 100% das proteínas e relação de açúcares e ácido lático de 0,5%.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**. In press, 2013.
- ALTAF, M.; NAVEENA, B.J.; REDDY, G. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, p.235–239, 2005.
- 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**. v.61, p.4-8, 2003.
- BAI, D.M.; WEI, Q.; YAN, Z.H.; 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.
- BAI, D.M.; YAN, Z.H.; WEI, Q.; ZHAO, X.M.; LI, X.G.; XU, S.M. Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 47–51, 2004
- BOUCHOUX, A.; BALMANNA, H. R.; LUTIN, F. Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electro dialysis operations. **Separation and Purification Technology**. v. 52, p. 266–273, 2006.
- BOUDRANT, J.; MENSHUTINA, N.V.; SLOROHODOV, A.V.; GUSEVA, E.V.; FICK, M. Mathematical modeling of cell suspension in high cell density conditions: Application to L-lactic acid fermentation using *Lactobacillus casei* in membrane bioreactor. **Process Biochemistry**. v.40, p. 1641-1647, 2005.
- 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.
- BUYUKKILECI, A.O.; HARSA, S. Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). **J Chem Technol Biotechnol** v.79 p,1036–1040, 2004.

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

CARDINAL, E.V.; HEDRICK, L.R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **J. Biol. Chem.** v.172, p. 609–612, 1948.

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

CHEN, X.; LIU, L.; LI,J.; LIU, J.; DU, G.; CHEN, J. Optimization of glucose feeding approaches for enhanced glucosamine and N-acetylglucosamine production by an engineered *Escherichia coli*. **J Ind Microbiol Biotechnol** v.39, p 359–365, 2012.

CHEN, S.Y.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Appl Microbiol Biotechnol** v,76, p, 67–74, 2007.

CHENG, L.K.; WANG, J.; ZHAO, Q.Y.; SHEN, Z.Q.; XIE, X.X.; CHEN, N. Strategy for pH control and pH feedback-controlled substrate feeding for high-level production of L-tryptophan by *Escherichia coli*. **World J Microbiol Biotechnol** v, 29, p, 883–890, 2013.

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

COELHO, L.F.; DE LIMA, C.J.B.; BERNARDO, M.P.; ALVAREZ, G.M.; CONTIERO, J. Improvement of L-(+) lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B103. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1944-1950, 2010.

COELHO,L. F.; DE LIMA, C. J. B.; RODOVALHO,C.M.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. Lactic acid production by new *lactobacillus plantarum* Lmism6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 28, p. 27 - 36, 2011 b.

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.; HENRY, M. Review Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. **J Chem Technol Biotechnol** v.81, p.1119–1129, 2006.

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

DE LIMA, C.J.B.; COELHO, L.F.; BLANCO, K.C.; CONTIERO, J. Response surface optimization of D-(-) lactic acid production from *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as nitrogen source. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.5842-5846, 2009.

DE LIMA, C.J.B.; COELHO, L.F.; SILVA, G.P.; ALVAREZ, G.M.; CONTIERO, J. L-(+) Lactic Acid Production by New *Lactobacillus rhamnosus* B103. **Journal of Microbial e Biochemical Technology**, v.2, p.64-69, 2010a.

DE LIMA, C.J.B.; CONTIERO, J.; COELHO, L.F. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: Focus on medium supplementation, temperature and pH control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 171-181, 2010b.

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

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. **Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo**. In: Actas da 6.a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. v. 3, p 271-280, 1999.

ERCOLINI, D.G.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, S.; COPPOL, A. 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.

FITZPATRICK, J.F.; AHRENS, M.; SMITH, S. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. **Process Biochemistry** v.36, p.671–675, 2001.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. 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.

GONZÁLEZ, T.; TERRÓN, M.; YAGÜE, S.; SILVA, R.; JUNCA, H.; ZAPICO, E.; TELLEZ, A. Melanoidin – containing wastewaters induce selective laccase gene expresión in the white-rot fungus *Trametes* sp. I – 62. **Research in Microbiology**, p.103-109, 2008.

GROSS, R.A.; KALRA, B. Biodegradable polymers for the environment. **Science**, v.297, p.803-807, 2002.

HAN, I.S.; CHERYAN, M. Nanofiltratio of model acetate solutions. **J. Memb. Sci.** v.107, p.107–113, 1995.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, **Enzyme Microb. Technol.** v.26 p. 87–107, 2000

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. 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.

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.

JOGLEKAR, H.G.; RAHMAN, I.; BABU, S.; KULKARNI B.D.; JOSHI, A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. **Separation and Purification Technology**. v.52, p.1–17, 2006.

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. L(+)-lactic acid recovery from cassava bagasse based fermented medium using anion exchange resins. **Braz. arch. biol. technol.** v.51, p.1241-1248, 2008.

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

- KULPRATHIPANJA, A.R.; OROSHA, R. Separation of lactic acid from fermentation broth with an anion polymeric absorbent, **US Patent 5 068 418**, 1991.
- KWON,S.; LEE, P.C.; LEE, E.G.; CHANG, Y.K.; CHANG, N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology** v, 26 p, 209–215, 2000.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 3a ed. Sarvier, 2002
- LI, Y.; SHAHBAZI, A.; WILLIAMS, K.; WAN, C. Separate and Concentrate Lactic Acid Using Combination of Nanofiltration and Reverse Osmosis Membranes. **Appl Biochem Biotechnol.** v.147, p.1–9, 2008.
- LI, Z.; LU, J.K.; 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.
- LIGGETT, R.W.; KOFFLER, H. **Corn steep liquor in microbiology**, 1984.
- LIZIEIRE, R.S.; DE CAMPOS, O.F. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. **Empraba**. ISSN nº: 1518-3254, 2006.
- MADZINGAIDZO, L.; DANNER, H.; BRAUN, R. Process development and optimization of lactic acid purification using electrodialysis. **J. Biotechnol.** v. 96, p. 223–239, 2002.
- MANI, K.N.; HADDEN, D.K. Process for the recovery of organic acids and ammonia from their salts. **U.S. Patent** No. 5,814,498, 1998.
- MASS, R.H.W.; BAKKER, R.R.; JANSEN, M.L.A.; VISSER, D.; DE JONG, E.; EGGINK, G. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.78, p. 751–758, 2008.
- MENG, Y.; XUE, Y.; YU, B.; GAO,C.; MA, Y. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20. **Bioresource Technology**. v. 116, p.334–339, 2012.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v,31, p. 426–428, 1959.

- MOLDES, A.B.; ALONSO, J.L.; PARAJO, J.C. Recovery of lactic acid from simultaneous saccharification and fermentation media using anion exchange resins. **Bioprocess and Biosystem Engineering**. v. 25, p.357–363, 2003.
- MOLDES, A.B.; ALONSO, J.L.; PARAJO, J.C. Resin Selection and Single-Step Production and Recovery of Lactic Acid from Pretreated Wood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.95, p.69-81, 2001.
- MU, W.; LIU, F.; JIA, J.; CHEN, C.; ZHANG, T.; JIANG, B. 3-Phenyllactic acid production by substrate feeding and pH-control in fed-batch fermentation of *Lactobacillus* sp. SK007 **Bioresource Technology**, v. 100, p.5226– 5229, 2009.
- NAVEENA, B.J.; ALTAF, M.D.; 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. **Bioresource Technology**, v.96, p. 485-490, 2005.
- NIEL, E.W.J.V.; HAHN-HÄGERDAL, B. Nutrients requirements of *Lactococci* in defined growth media, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v 52, p 617–627, 1999.
- 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.
- ORLA-JENSEN, S. **The Lactic Acid Bacteria**. Fred Host and Son. Copenhagen, 1919.
- OSHIRO, M.; HANADA, K.; TASHIRO, Y.; KENJI SONOMOTO, K. Efficient conversion of lactic acid to butanol with pH-stat continuous lactic acid and glucose feeding method by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. **Appl Microbiol Biotechnol** v.87, p, 1177–1185, 2010.
- 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. **Biotechnol Prog.** v.14, p.699–704, 1998.
- PETERSON G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochem.** v.83, p.346–356, 1977.
- PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48- 68, 2012.

- QUINTERO, J.; ACOSTA, A.; MEJÍA, C.; RÍOS, R.; TORRES, A.M. Purification of lactic acid obtained from a fermentative process of cassava syrup using ion Exchange resins. **Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia**. v. 65 p. 139-151, 2012.
- RAYA-TONETTI, G.; CÓRDOBA, P.; BRUNO-BÁRCENA, J.; SIÑERIZ, F.; PEROTTI, N. Fluidized bed ion exchange for improving purification of lactic acid from Fermentation. **Biotechnology Techniques**. v. 13, p. 201–205, 1999.
- RYU, H.W.; KIM, Y.M.; WEE, Y.J. Influence of Operating Parameters on Concentration and Purification of *L*-lactic Acid Using Electrodialysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** v.17, p.1261-1269, 2012.
- 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.; DUEK, E.A.R. Estudos da interação polímero/cartilagem/osso utilizando Poli (ácido láctico – co – ácido glicólico) e Poli (p-Dioxanona) em condilo femural de coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.24, n.3, p. 176-180, 2004.
- SEO, Y.; HONG, W.H.; HONG, T.H. Effects of operation variables on the recovery of lactic acid in a batch distillation process with chemical reactions. **Korean J. Chem. Eng.** v.16, p. 556–561, 1999.
- 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.
- SILVA, I. R.; MONTEIRO, N. K.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; DA SILVA, M. L. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; DA SILVA, G. V. J.; DE MORAES, L. A. B. Purificação e caracterização de uma gentioexaose obtida de botriosferana por hidrólise ácida parcial **Quim. Nova**, v.31, p.1015-1019, 2008.
- SNEATH, P.H.A.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. v. 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. **Prog. Polym. Sci.**, v.27, p.1123–1163, 2002.
- SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal** v. 39, p 369–375, 2008.
- SON, M.S.; KWON, Y.J. Direct Fermentation of Starch to L(+)-Lactic Acid by Fed-batch Culture of *Lactobacillus manihotivorans* **Food Sci. Biotechnol.** v, 22, p. 289-293 2013
- 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.
- SUN, X.H.; WANG, Q.; ZHAO, W.; MA,H.; SAKATA, K. Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method, **Sci. Technol.** v.49, p.43–48, 2006.
- TANAKA, T.; HOSHINA, M.; TANABE,S.; SAKAI, K.; OHTSUBO, S.; TANIGUCHI, M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 211-217, 2006.
- 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. **Biotechnol Bioeng**, v. 80, p. 1-12, 2002.
- TEJAYADI, S.; CHERYAN, M. Original paper: lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 43, p. 242-248, 1995.
- TIMMER, J.M.K.; HORST, H.C.V.D.; ROBBERTSEN, T. Transport of lactic acid through reverse osmosis and nanofiltration membranes, **J. Membr. Sci.** v. 85, p. 205–216, 1993.
- TONG, W.Y.; FU, X.Y.; LEE, S.M.; YU, J.; LIU, J.W.; WEI, D.Z.; KOO, Y.M. Purification of l(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA-92. **Biochemical Engineering Journal** v.18, p. 89–96, 2004.

TORTORA, G; FUNKE, B; CASE, C. **Microbiologia**: uma introdução. 10ª Edição. Artmed editora, 2010.

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

VICKROY, T.B. Lactic Acid. In: **Comprehensive Biotechnology**, M. Moo-Young (Ed.), Pergamon Press, New York, USA v. 3 p. 761–776, 1985.

WANGSA-WIRAWAN, N.D.; LEE, Y.S.; FALCONER, R.J.; MANSELL, C.J.; O'NEILL, B.K.; MIDDELBERG, A.P.J. Novel fed-batch strategy for the production of insulin-like growth factor 1 (IGF-1). **Biotechnology Letters**, v.19, p. 1079–1082, 1997.

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 Tecnology**, v.35, p.568-573, 2004.

WEE, Y.J.; YUN, J.S.; KIM, D.; RYU, H.W. Batch and repeated batch production of L-(+)-lactic acid by RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor *Enterococcus faecalis*. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v 33. p 431–5. 2006.

WU, J.; HU, Y.; ZHOU, J.; QIAN, W.; LIN, X.; CHEN, Y.; CHEN, X.; XIE, J.; BAIA, J.; YING, H. Separation of d-lactic acid from aqueous solutions based on the adsorption technology. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. v, 407, p.29– 37, 2012.

YE, L.; ZHOU, X.; HUDARI, M.S.B.; LI, Z.; WU, J.C. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. **Bioresource Technology**. v. 132, p.38–44, 2013.

ZHANG, Y.; CONG, W.; SHI, S.Y. Repeated fed-batch lactic acid production in a packed bed-stirred fermentor system using a pH feedback feeding method. **Bioprocess Biosyst Eng** v, 34 p, 67–73, 2011.

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

ZHOU, S.; CAUSEY, T.B.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K.T; INGRAM, L.O. Production of Optically Pure D-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically

Engineered *Escherichia coli* W3110. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, p. 399–407. 2003.

ZHOU, S.; SHANMUGAM, K.T.; YOMANO, L.P.; GRABAR, T. B.; INGRAM, L.O.
Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. **Biotechnology Letters**. v. 28, p. 663–670, 2006.