
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MICROBIOLOGIA APLICADA

PAOLA MONTEIRO DE OLIVEIRA

Produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus casei* Ke11 utilizando insumos agroindustriais

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.

Rio Claro - SP

2014

PAOLA MONTEIRO DE OLIVEIRA

Produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus casei* Ke11 utilizando insumos agroindustriais

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

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Fontes Coelho

Rio Claro – SP

2014

547.29 Oliveira, Paola Monteiro de
O48pr Produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus casei*
Ke11 utilizando insumos agroindustriais / Paola Monteiro de
Oliveira. - Rio Claro, 2014
94 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Fermentação. 2. Otimização da produção. 3. Sacarose. 4.
Extrato de levedura. 5. Batelada alimentada. 6. Purificação. I.
Título.

Dedico este trabalho à minha rainha e amada mãe Luciana, aos meus anjos e irmãos Eduarda e Marcelo, ao meu querido orientador Prof. Dr. Jonas Contiero e à minha querida co-orientadora Profa. Dra. Luciana Fontes Coelho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Fapesp pelo financiamento e apoio a este projeto, à Unesp Rio Claro pela minha formação e à pós-graduação em Microbiologia Aplicada da Unesp Rio Claro por todo aprendizado.

Serei eternamente grata ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Contiero por tudo o que aprendi com ele e por ele ser uma pessoa maravilhosa e acima de tudo um grande amigo. Serei para sempre grata também à minha co-orientadora Luciana Coelho por toda a ajuda e por sempre me apoiar e estar comigo nos momentos mais difíceis.

Minha eterna gratidão à minha mãe Luciana, que sempre foi minha mãe e meu pai, meu porto seguro. Sem ela com certeza não teria forças para concluir este enorme desafio. Minha enorme gratidão também aos meus irmãos Eduarda e Marcelo, por darem razão à minha vida e por me renovarem todos os dias quando chegava em casa cansada e via os seus rostinhos.

Obrigada à minha família, meus tios Rodrigo, Diego e Pamela, minha bisavó Maria, minha avó Angela e meu priminho Henrique por acima de tudo serem a minha família. Por serem meu alicerce, por sempre me apoiarem e me ampararem.

Agradeço aos técnicos do Departamento Beto, Fátima, Carmem e Adriano pela amizade e por serem sempre muito solícitos.

Obrigada minhas queridas amigas do grupo do ácido láctico Daiane e Susan pela amizade, pelas conversas e risadas e por sempre estarem dispostas a me ajudar e obrigada especialmente minha grande amiga Marcela, que foi amiga dentro e fora do laboratório e esteve comigo sempre que precisei.

Quero agradecer também aos meus amigos do Laboratório de Fermentações Industriais Roberta, que sempre foi um anjo e uma grande amiga, Vinícius, meu grande amigo e companheiro de graduação e que é muito especial pra mim e Paulo, um grande amigo que me ajudou demais na realização deste projeto. Agradeço a ele por todo tempo doado e pela noite em claro em prol dos resultados presentes neste trabalho.

Obrigada meus grandes amigos do Departamento de Bioquímica Rafael, Mariana, Jaqueline, Tássio, Sadala, Viviane, Danilo, Quimi, Ana Maria, Barbára, Giordanni e Alexandre pela amizade dentro e fora do departamento, pelas conversas e risadas, ter a companhia de vocês no dia a dia fez desses dois anos muito mais prazerosos. Sentirei muita saudades de cada minuto com vocês.

À minha grande amiga Tamires, obrigada por sempre estar ao meu lado e me apoiar nos momentos mais difíceis, cada dificuldade que passei ao longo desses dois anos pôde ser dividida com você e isso me ajudou muito.

Obrigada minhas eternas amigas-irmãs Daísys e Natália pelos mais de dez anos de amizade, por me deixarem fazer parte da família de vocês e por mesmo distante estarem sempre por perto. Obrigada a meus familiares e aos meus amigos que desde o início estiveram ao meu lado me apoiando neste desafio e me proporcionando momentos de alegrias nestes dois anos.

Obrigada especialmente e acima de tudo a Deus, pois foi Ele quem me deu minha família maravilhosa a qual eu tanto amo, meus preciosos amigos e também me fez forte para superar mais este desafio.

A todos vocês minha eterna gratidão.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

RESUMO

O ácido láctico é um ácido orgânico amplamente utilizado em vários setores da indústria mas atualmente tem recebido grande atração uma vez que pode ser usado na produção de plásticos renováveis e biodegradáveis a partir do ácido polilático (PLA). Além disso, por serem biorreabsorvíveis, os biopolímeros de PLA podem ser empregados na medicina, na regeneração de tecidos, suturas, fixações de fraturas, reposição óssea, reparo de cartilagem, fixação de ligamentos e implantes. Neste trabalho foram analisadas três fontes de carbono (sacarose PA, caldo de cana e soro de queijo) e quatro fontes de nitrogênio (água de maceração de milho – AMM, autolisado de levedura, extrato de levedura e farinha de algodão – Pro-floo®) para a produção de L(+)-ácido láctico utilizando-se o micro-organismo *Lactobacillus casei* Ke11. Para isto foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4, com quatro repetições. Os dados obtidos foram então submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quando a sacarose foi suplementada com extrato de levedura foram obtidos ótimos valores para produção de L(+)-ácido láctico e rendimento (87,09 g/L e 88%, respectivamente). O Planejamento de Plackett-Burman foi realizado com as variáveis sacarose, extrato de levedura, porcentagem de inóculo, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, acetato de sódio, citrato e Tween 80. As variáveis que tiveram efeito significativo na produção de L(+)-ácido láctico foram o extrato de levedura, a porcentagem de inóculo e o Tween 80. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado, utilizando essas três variáveis significativas e a sacarose, com a qual foi possível concluir, pelas análises das superfícies de resposta, que para a obtenção de maior concentração de L(+)-ácido láctico e menor concentração residual de sacarose os parâmetros sacarose, extrato de levedura e porcentagem de inóculo devem ser 120 g/L, 40 g/L e 10%, respectivamente. A validação do meio otimizado foi realizada em fermentação em *shaker* e os valores obtidos foram: 112,15 g/L para produção de L(+)-ácido láctico, 4,76 g/L/h para produtividade e 89% para rendimento. Foram então realizadas quatro bateladas em reator e os maiores valores obtidos foram: 103,9 g/L para produção de L(+)-ácido láctico, 4,34 g/L/h para produtividade e 84% para rendimento, quando CaCO₃ foi utilizado para controlar o pH e os sais do meio MRS foram adicionados. Depois dos resultados obtidos em reator batelada três estratégias de alimentação foram analisadas (alimentação por pulso, por fluxo constante e exponencial) e os melhores resultados de produção e rendimento foram obtidos na fermentação em batelada alimentada exponencial, na qual o fluxo foi regulado por software e o pH foi controlado com adição de NaOH 10N e CaCO₃. Esta fermentação apresentou aumento de 69,24% na concentração de L(+)-ácido láctico (175,84 g/L) quando esta foi comparada com a concentração obtida obtido na fermentação em batelada em reator e aumento de 11% no valor de rendimento (95%). Porém, o valor da produtividade obtido na fermentação em batelada alimentada exponencial foi 16,04% menor (3,74 g/L/h), quando comparado ao valor de produtividade obtido na fermentação em batelada realizada em reator. Para purificação e recuperação do ácido láctico produzido foi utilizada a filtração a vácuo com carvão e celite e posteriormente uma coluna de troca catiônica e os resultados obtidos foram satisfatórios: 84% de recuperação do ácido láctico, 97% de remoção dos açúcares, 100% de remoção de proteínas e porcentagem de açúcar em relação ao ácido láctico de 0,49%.

Palavras-chave: Ácido láctico. Sacarose. Extrato de levedura. Batelada alimentada. Purificação.

ABSTRACT

The lactic acid is a organic acid widely used in various industry sectors but currently has received great interest since it can be used in the production of renewable and biodegradable plastics made from polylactic (PLA). Moreover, it can be bioresorbable, PLA biopolymers can be used in medicine, tissue regeneration, sutures, fixation of fractures, bone replacement, repair cartilage, ligament fixation and implants. In this paper three carbon sources (sucrose PA, sugarcane juice and cheese whey) and four nitrogen sources (corn steep liquor – CSL, yeast autolyzate, yeast extract and cottonseed meal -Pro-floo®) were analyzed for the L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* Ke11. A completely randomized design was used in 3x4 factorial with four replications. The results were then subjected to analysis of variance by F test and the means were compared by Tukey test at 5% probability. When the sucrose and yeast extract were used great results of L(+)-lactic acid production and yield were obtained (87,09 g/L and 88%, respectively). The Plackett-Burman planning was performed with the variables sucrose, yeast extract, percentage of inoculum, potassium phosphate, magnesium sulfate, manganese sulfate, sodium acetate, citrate and Tween 80. The variables that increase the L(+)-lactic acid production were the yeast extract, percentage of inoculum and Tween 80. A rotational central composite experimental design (DCCR) was made by using these three significant variables and sucrose, then it is possible to conclude by observing the response surfaces that to obtain a greater amount of L(+)-lactic acid production and a smaller amount of residual sucrose the parameters of sucrose, yeast extract and percentage of inoculum should be 120 g/L, 40 g/L and 10%, respectively. The validation of the optimized medium was carried out in a shaker fermentation and the values obtained were: 112, g/L of L(+)-lactic acid production, 4,76 g/L/h of productivity and 89% of yield. Four batches were done in reactors and the major values obtained were: 103,9 g/L for the L(+)-lactic acid production, 4,34 g/L/h for the productivity and 84% for the yield. Then, three fed-batch strategies were analyzed (pulse fed-batch, constant feed rate fed-batch and exponential fed-batch) and the best results to L(+)-lactic acid production and yield were obtained in the exponential fed-batch with the feed rate controlled by software and the pH was adjusted by addition of NaOH 10 N and CaCO₃. Compared with the batch culture this fed-batch showed 69,24% improvement in L(+)-lactic acid production (175,84 g/L) and 11% improvement in yield (95%). However, the productivity had a decrease of 16,04% in the fed-batch (3,74 g/L/g) when this was compared with the batch culture in reactor. For the lactic acid produced purification and recovery a vacuum filtration with charcoal and celite and then a column of cationic exchange were used and the obtained results were satisfactory: 84% of lactic acid recovery, 97% of removal of sugar and 100% of removal proteins and the percentage of sugar/lactic acid was 0,49%.

Key-words: Lactic acid. Sucrose. Yeast extract. Fed batch. Purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estereoisômeros do ácido lático.	16
Figura 2 - Metabolismo dos carboidratos pelas bactérias lácticas.	21
Figura 3 – Curva padrão para determinação da concentração celular.....	41
Figura 4 - Curva de crescimento do <i>Lactobacillus casei</i> Ke11 no meio MRS, a 35 °C, 150 rpm.....	43
Figura 5 - Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados (valores de t_{calc}) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a produção de ácido lático após 24 horas por <i>Lactobacillus casei</i> Ke11.	49
Figura 6 - Distribuição dos resíduos relativos à produção de ácido lático (A) e ao açúcar residual (B).	57
Figura 7 - Valores preditos em função dos observados relativos à produção de ácido lático (A) e ao açúcar residual (B).....	57
Figura 8 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de ácido lático pelo <i>Lactobacillus casei</i> Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e extrato de levedura (X_2).....	58
Figura 9 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de ácido lático pelo <i>Lactobacillus casei</i> Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e porcentagem de inóculo (X_4).	58
Figura 10 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de ácido lático pelo <i>Lactobacillus casei</i> Ke11, como uma função das variáveis: extrato de levedura (X_2) e porcentagem de inóculo (X_4).	59
Figura 11 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o açúcar residual (ART residual) na produção de ácido lático pelo <i>Lactobacillus casei</i> Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e extrato de levedura (X_2).	60
Figura 12 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o açúcar residual (ART Residual) na produção de ácido lático pelo <i>Lactobacillus casei</i> Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e porcentagem de inóculo (X_4).	60
Figura 13 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o açúcar residual (ART Residual) na produção de ácido lático pelo <i>Lactobacillus casei</i> Ke11, como uma função das variáveis: extrato de levedura (X_2) e porcentagem de inóculo (X_4).	61
Figura 14 - Cinética da produção de L(+)-ácido lático e consumo do açúcar por <i>L. casei</i> Ke11 em fermentação em <i>shaker</i> a 35°C, 150 rpm.	62
Figura 15 - Cinética da produção de ácido lático, consumo de açúcar e crescimento do <i>L. casei</i> Ke11 em reator de 0,5 L por batelada utilizando NaOH 10 N para o controle do pH. Concentração inicial de açúcar 120 g/L e ausência de sais do meio MRS (A) e presença dos sais do meio MRS (B).	64
Figura 16 - Cinética da produção de L(+)-ácido lático, consumo de açúcar e crescimento do <i>L. casei</i> Ke11 em reator de 0,5 L por batelada utilizando CaCO_3 para o controle do pH. Concentração inicial de açúcar de 120 g/L e ausência de sais do meio MRS (A) e presença dos sais do meio MRS (B).	65
Figura 17 - Esquema da formação do lactato por $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH e NaOH em uma homofermentação de glicose por <i>Lactobacillus debruekii</i>	68
Figura 18 - Cinética da produção de L(+)-ácido lático, consumo de açúcar e crescimento do <i>L. casei</i> Ke11 em reator de 0,5 L em fermentação em batelada alimentada por pulso com valor de concentração inicial de açúcar de 80 g/L (A) e 120 g/L (B), batelada alimentada por fluxo constante com valor de concentração inicial de açúcar de 80 g/L (C) e 120 g/L (D).	70

Figura 19 - Monitoramento dos parâmetros e do fluxo de alimentação nas bateladas alimentadas exponenciais feito por software. A: Batelada alimentada exponencial com pH controlado somente por NaOH 10N; B: Batelada alimentada exponencial com pH controlado por NaOH e CaCO ₃ e C: Batelada alimentada exponencial com pH controlado por CaCO ₃	73
Figura 20 - Cinética da produção de L(+)-ácido láctico, consumo do açúcar e crescimento do <i>L. casei</i> Ke11 em reator de 0,5 L em fermentação em batelada alimentada exponencial com fluxo controlado manualmente (A), com fluxo controlado por software e controle de pH feito por NaOH 10 N (B), com fluxo controlado por software e controle de pH feito por NaOH 10 N e CaCO ₃ (C) e com fluxo controlado por software e controle de pH feito por CaCO ₃ (D). As flechas indicam o início da alimentação. Na Figura 19-D - 1: Início da alimentação com fluxo constante; 2: Início da alimentação exponencial.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substratos utilizados na produção de ácido láctico.....	19
Tabela 2 - Características de bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas.....	21
Tabela 3 - Concentrações das fontes de nitrogênio (extrato de levedura, autolisado de levedura, AMM e proflo®).	34
Tabela 4 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman.	35
Tabela 5 - Valores reais das variáveis independentes codificadas.	36
Tabela 6 - Médias da concentração de L(+)-ácido láctico produzido (g/L) em 48 horas por <i>Lactobacillus casei</i> Ke11 utilizando, três fontes de carbono, suplementadas com diferentes fontes de nitrogênio: autolisado de levedura (AL), água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL) e proflo (PF).	44
Tabela 7 - Média dos rendimentos obtidos (g de L(+)-ácido láctico/ g de açúcar), em 48 horas, na produção de ácido láctico por <i>Lactobacillus casei</i> Ke11 utilizando três fontes de carbono suplementadas com diferentes fontes de nitrogênio: autolisado de levedura (AL), água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL) e proflo (PF).	44
Tabela 8 - Médias das produtividades de L(+)-ácido láctico (g/L/h), em 24 horas, por <i>Lactobacillus casei</i> Ke11 utilizando três fontes de carbono suplementadas com diferentes fontes de nitrogênio: autolisado de levedura (AL), água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL) e proflo (PF).	44
Tabela 9 - Concentração de L(+)-ácido láctico e rendimento obtidos no experimento com sacarose e açúcar cristal em 24 horas de fermentação utilizando <i>Lactobacillus casei</i> Ke11.....	47
Tabela 10 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman com os valores reais e a resposta para produção de L(+)-ácido láctico por <i>Lactobacillus casei</i> Ke11 após 24 horas de fermentação.....	48
Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental composto central com os valores reais e as respectivas respostas produção de ácido láctico (g/L), sacarose residual (g/L) e produtividade (g/L/h) utilizando <i>L. casei</i> Ke11 durante 24 horas.	52
Tabela 12 - Coeficiente do modelo estimado pela regressão linear para a produção de L(+)-ácido láctico por <i>L. casei</i> Ke11 e açúcar residual.	55
Tabela 13 - Análise de variância do modelo polinomial de segunda ordem.	56
Tabela 14 - Valores das cinéticas obtidos nas fermentações em batelada com controle do pH feito por NaOH, CaCO ₃ com e sem adição dos sais do meio MRS.	66
Tabela 15 - Parâmetros cinética obtidos nas fermentações em batelada alimentada por pulso e por fluxo constante com valor de concentração inicial de açúcar de 80 e 120 g/L.	71
Tabela 16 - Parâmetros determinados nas bateladas alimentadas exponenciais.....	75
Tabela 17 - Concentração, produtividade e rendimento de L(+)-ácido láctico e concentração de biomassa de <i>L. casei</i> Ke11 em fermentações em batelada em <i>shaker</i> , batelada e batelada alimentada em reator de 0,5 L.	77
Tabela 18 - Purificação de L(+)-ácido láctico produzido por <i>L. casei</i> Ke11 utilizando carvão com celite.....	81
Tabela 19 - Purificação de L(+)-ácido láctico produzido por <i>L. casei</i> Ke11 utilizando carvão com celite e caldo com pH 3,2.	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O Ácido Lático	16
2.2 Produção de ácido lático via fermentação.....	17
2.3 <i>Lactobacillus casei</i>	19
2.4 O poli ácido lático (PLA).....	22
2.5 Produção industrial.....	22
2.5.1 <i>Produção de ácido lático por batelada</i>	25
2.5.2 <i>Produção de ácido lático por batelada alimentada</i>	26
2.6 Seleção de componentes do meio através de métodos estatísticos.....	27
2.7 Extração e Purificação do ácido lático.....	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Micro-organismo	32
4.2 Curva de crescimento	32
4.3 Substratos	33
4.4 Fermentações	33
4.4.1 <i>Fermentações com diferentes fontes de carbono e diferentes fontes de nitrogênio</i>	33
4.4.2 <i>Comparação entre açúcar cristal e sacarose PA</i>	34
4.4.3 <i>Planejamento do tipo Plackett-Burman</i>	34
4.4.4 <i>Planejamento do tipo composto central e metodologia da superfície de resposta</i>	35
4.4.5 <i>Batelada e batelada alimentada</i>	36
4.4.6 <i>Cinética do processo fermentativo e parâmetros estequiométricos</i>	39
4.4.7 <i>Purificação utilizando carvão ativado e celite</i>	39
4.4.8 <i>Troca catiônica</i>	40

4.5 Metodologia Analítica	40
4.5.1 <i>Quantificação do ácido lático</i>	40
4.5.2 <i>Quantificação do consumo do substrato</i>	40
4.5.3 <i>Determinação da concentração celular</i>	41
4.5.4 <i>Determinação de proteínas</i>	42
4.5.5 <i>Análises estatísticas.....</i>	42
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
 5.1 Micro-organismo e curva de crescimento	43
5.2 Fermentação com diferentes fontes de carbono e nitrogênio	43
5.2.1 <i>Comparação entre açúcar cristal e sacosore PA.....</i>	47
5.3 Efeito da composição do meio de fermentação por planejamento do tipo Plackett-Burman.....	47
5.4 Otimização da produção de L-(+) ácido lático por superfície de resposta.....	51
5.5 Validação do ponto escolhido como ótimo e cinética da fermentação em <i>shaker</i>.....	61
5.6 Batelada em reator	63
5.7 Batelada alimentada	69
5.8 Extração e purificação do ácido lático.....	80
 6 CONCLUSÕES.....	84

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O ácido láctico 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 é utilizado na produção de bases químicas e solventes orgânicos e na indústria alimentícia atua como acidulantes, flavorizantes, aromatizantes e emulsificantes (WEE et al., 2004; ALTAF; NAVEENA; REDDY, 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 biorreabsorvíveis, podem ser empregados na medicina, na regeneração de tecidos, suturas, fixações de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, fixação de ligamentos e implantes (SAKATA; RINCON; DUEK, 2004).

Os polímeros produzidos a partir de ácido láctico D(-) e L(+) têm mostrado propriedades físico-mecânicas comparáveis à dos 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. Porém, os processos fermentativos são mais vantajosos por serem mais econômicos (SILVA; MANCILHA, 1991). Em 2006, aproximadamente 90% do total do ácido láctico produzido no mundo já era obtido por fermentação utilizando bactérias (ZHOU et al., 2006). Além disso, a síntese química do ácido láctico sempre produz uma mistura racêmica. A produção fermentativa de ácido láctico oferece ótima vantagem na obtenção de L(+) e D(-)-ácido láctico opticamente puro e também DL ácido láctico, dependendo da estirpe selecionada para fermentação, a pureza ótica do ácido láctico é fator crucial nas propriedades físicas do PLA (SODEGARD; STOLT, 2002).

Diversos subprodutos e matérias-primas da agroindústria têm sido empregados para a produção de ácido láctico, pela alta disponibilidade e baixo custo, tais como bagaço, melaço, caldo de cana de açúcar, soro de queijo, manipueira além da água de maceração de milho (AMM) e do autolisado de levedura.

Para otimizar a produção de ácido láctico, 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).

O estudo da produção e extração do ácido láctico se justifica na medida em que este é um produto com ampla aplicação no mercado e cujo potencial tem crescido devido a sua importância na área médica, em próteses ortopédicas, bem como na área ambiental como plástico biodegradável. O fato do ácido láctico apresentar, segundo a literatura, elevada produtividade a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais sugere a viabilidade de produção desse insumo no Brasil.

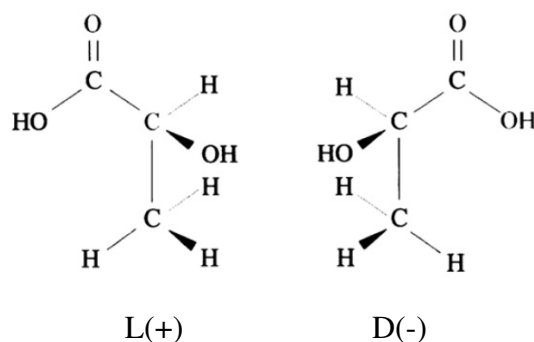
No Brasil, várias empresas já despertaram interesse para a produção de ácido láctico e do polímero PLA (entre outras a Braskem). Essas empresas nos têm procurado com intuito de produção e pesquisa desse insumo, uma vez que os isômeros são importados da Holanda, o que encarece o custo do produto final.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Ácido Lático

O ácido lático (ácido 2-hidroxiopropanóico), $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ (DATTA; HENRY, 2006) é um ácido orgânico e tem um átomo de carbono assimétrico com quatro grupos diferentes ligados a ele: $-\text{COOH}$, $-\text{H}$, $-\text{OH}$ e CH_3 . Ele existe em duas formas enantiômicas: D(-) e L(+)-ácido lático (Figura 1).

Figura 1 - Estereoisômeros do ácido lático.



Fonte: Martinez, Balciunas, Salgado et al. (2013, p.71)

De acordo com Datta e Henry (2006), o ácido lático é o ácido hidroxicarboxílico mais abundante e foi primeiramente descoberto em 1780 na Suíça pelo químico Scheele que inicialmente o considerou um componente do leite (WEE; KIM; RYU, 2006).

Em 1789, Lavoisier nomeou esse "componente do leite" como "acide latique", termo que se tornou a possível origem da terminologia "ácido lático". Em 1857, Pasteur descobriu que ele não era um componente do leite, mas um metabólito fermentativo gerado por certos micro-organismos (BENNINGA, 1990).

O ácido lático é o principal metabólito intermediário em vários organismos vivos, de procariotos anaeróbios a humanos e está presente em vários alimentos, seja em sua forma natural, seja como produto de fermentação microbiana, como chucrutes, iogurtes, manteiga e vários outros alimentos fermentados (DATTA; HENRY, 2006). É um composto versátil usado como acidulante em alimentos, em produtos farmacêuticos e na indústria têxtil, para a

produção de bases químicas e na formação de polímeros biodegradáveis de poli ácido láctico (PLA) (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Ele é também matéria-prima importante na produção de solventes e de substâncias com atividades biológicas (RICHTER; BERTHOLD, 1998).

Por ter um ácido carboxílico e um grupo hidroxila, o ácido láctico pode sofrer uma variedade de conversões químicas potencialmente úteis como produtos químicos como óxido de propileno, glicol propileno, ácido acrílico, 2-3, pentanodiona e éster de lactato (LITCHFIELD, 1996; RICHTER; BERTHOLD, 1998).

O ácido láctico pode ser obtido tanto pela ação fermentativa de bactérias, fungos e leveduras quanto por síntese química. Porém, os processos fermentativos são mais vantajosos por serem mais econômicos (SILVA; MANCILHA, 1991). Além disso, a produção via fermentação tem a vantagem porque uma cepa produtora de somente um dos isômeros pode ser escolhida e assim um isômero opticamente puro pode ser obtido, enquanto a síntese química sempre resulta em mistura racêmica de ácido láctico (DL-ácido láctico) (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A pureza enantiomérica do ácido láctico é fator crucial nas propriedades físicas do PLA (SODEGARD; STOLT, 2002).

2.2 Produção de ácido láctico via fermentação

Em 2000, cerca de 80 mil toneladas de ácido láctico eram produzidas no mundo por ano, sendo que 90% era produzido por fermentação de bactérias lácticas e o restante produzido sinteticamente por hidrólise da lactonitrila (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Durante a fermentação do açúcar, dependendo da espécie de bactéria, ela pode produzir exclusivamente L(+)-ácido láctico, exclusivamente D(-)-ácido láctico, quantidades aproximadamente iguais de ambos isômeros ou produzir predominantemente uma forma em relação à outra (GARVIE, 1980; KANDLER; WEISS, 1986; SCHLEIFER, 1986). A maioria das bactérias lácticas produz as duas formas enantioméricas do ácido láctico. A redução enzimática do piruvato a lactato é processada por desidrogenases estereoespecíficas, sendo que o L(+)-lactato é formado pela enzima LdhL, enquanto o D(-)-lactato é formado pela enzima LdhD. Algumas bactérias possuem a lactato racemase (LR), que converte o L(+)-ácido láctico em D(-)-ácido láctico. As bactérias lácticas (BLs) podem ser agrupadas de acordo com a proporção dos isômeros produzidos, assim, aquelas que produzem mais de 75% do

isômero L(+)-lactato são referidas como do tipo L; as que produzem mais que 75% do isômero D(-)-lactato são referidas como tipo D e aquelas que produzem os dois isômeros em proporções intermediárias são classificadas como tipo DL (CURRY; CROW, 2003; KANDLER, 1983; MANOME et al., 1998; VIANA et al., 2005).

A quantidade do isômero predominante pode ser incrementada com o aumento do pH e da quantidade de substrato. Processos em batelada também favorecem a formação do isômero predominante. Altas temperaturas e pH não controlado desfavorecem a produção de apenas um isômero (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Diversos subprodutos e matérias-primas da agroindústria têm sido empregados para a produção de ácido láctico, pela alta disponibilidade e baixo custo, tais como bagaço, melaço, caldo de cana de açúcar (COELHO et al., 2011a,b; DE LIMA et al., 2009; DE LIMA et al., 2010), soro de queijo (DE LIMA; CONTIERO; COELHO, 2010), manipueira (COELHO et al., 2010), água de maceração de milho (AMM) (COELHO, 2011), autolisado de levedura, dentre outros (Tabela 1).

Tabela 1 - Substratos utilizados na produção de ácido láctico.

Substrato	Cepa	Ácido láctico			Referência
		C*	Y(%)	P	
		(g/L)		(g/L/h)	
Fibras de alfalfa	<i>Lactobacillus delbreuckii</i>	35,4	35	0,75	Sreenath et al. (2001)
Fibras de alfalfa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	46,4	46	0,64	Sreenath et al. (2001)
Bagaço de maçã	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 (CECT288)	32,5	88	5,41	Gullón et al. (2008)
Resíduos de banana	<i>Lactobacillus casei</i>		0,10	0,13	Chan-blanco, Bonilla-Leiva e Velazquez (2003)
Bagaço de mandioca	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NCIM 2025	81,9	94	1,36	John, Nampoothiri e Pandey (2006)
Celulose	<i>Bacillus coagulans</i> 36D1	80	80		Ou, Ingram e Shanmugam (2011)
Suco de tâmara	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> NRRL-B445 e <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC19435	60,3		3,20	Nancib, Nancib e Boudrant (2009)
Chifre de carneiro hidrolisado	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 10863	44	44	1,22	Kurbanoglu e Kurbanoglu (2003)
Bagaço de cana de açúcar	<i>Lactococcus lactis</i> IO-1	10,9	36	0,17	Laopaiboon et al. (2010)

*C: Concentração de ácido láctico em g/L.

Y: Rendimento da fonte de carbono em ácido láctico (%).

P: Produtividade em g/L/h.

Fonte: Adaptado de Abdel-Rahman, Tashiro e Sonomoto (2013, p. 883)

2.3 *Lactobacillus casei*

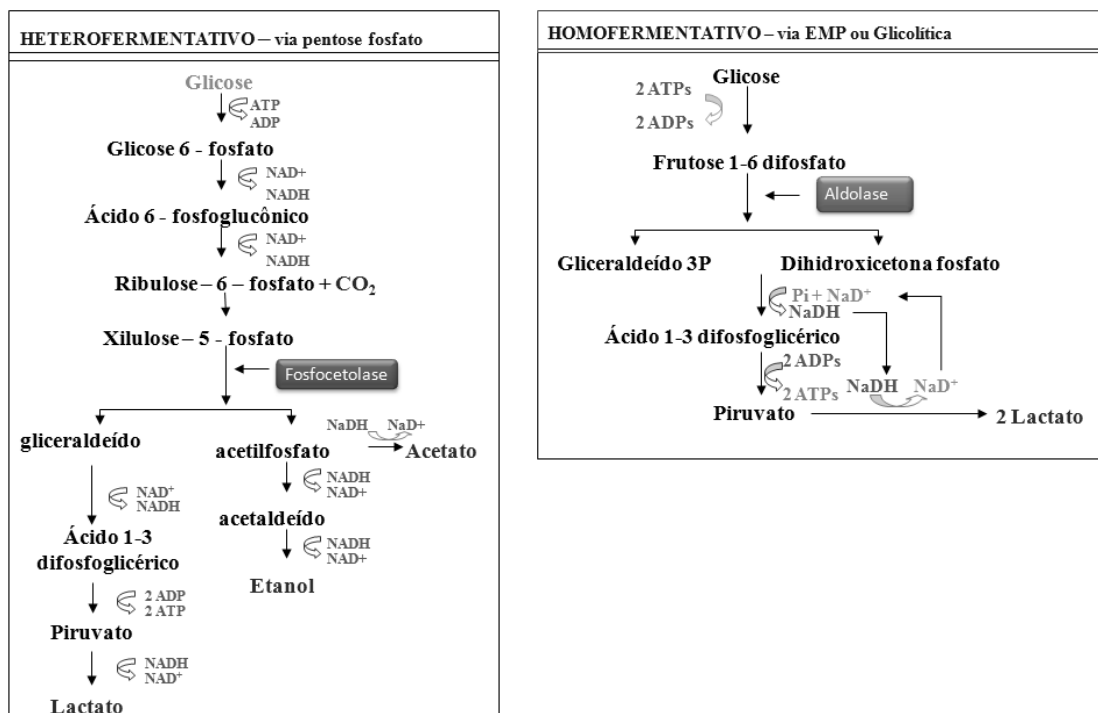
Os *Lactobacillus* pertencem a um grupo de bactérias denominadas bactérias lácticas (BL), as quais são muito utilizadas pela indústria de alimentos. Os metabólitos finais produzidos por estes micro-organismos, tais como o ácido láctico, o ácido acético, enzimas como as β -galactosidases e substâncias antimicrobianas chamadas bacteriocinas são amplamente aplicados como conservantes nas indústrias de alimentos (ZACHAROF; LOVITT; RATANAPONGLEKA, 2009).

Entre as bactérias lácticas, o *Lactobacillus* é o gênero mais numeroso com mais de 125 espécies e subespécies (AXELSSON, 2004; EUZEBY, 1997; LIMSOWTIN; BROOME; POWELL, 2003).

De maneira geral, uma típica bactéria láctica pode ser descrita como anaeróbica facultativa, gram-positiva, não formadora de esporos, pode apresentar forma de cocos ou bacilos, não apresentam catalase, motilidade, são desprovidas de citocromos, fastidiosas, ácido tolerantes, estritamente fermentativas, e apresentam inabilidade de sintetizar grupos porfirinas. Além disso, o ácido láctico é o principal produto final durante a fermentação do açúcar (AXELSSON, 2004).

As bactérias lácticas necessitam de nutrientes complexos como vitaminas, aminoácidos e, até, pequenos peptídios pois possuem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos e vitaminas do grupo B (MUSSATTO et al., 2008; VAIDYA et al., 2005).

O metabolismo dos carboidratos pelas bactérias lácticas pode ser classificado como homofermentativo ou heterofermentativo (Figura 2). A fermentação homofermentativa ou glicólise segue a rota de Embden-Meyerhof-Parnas e fornece, exclusivamente, lactato como produto final. Já a fermentação heteroláctica segue a rota do fosfogliconato fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e CO₂ em quantidades equimolares (Tabela 2) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Figura 2 - Metabolismo dos carboidratos pelas bactérias lácticas.

Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (2002).

Tabela 2 - Características de bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas.

Características	BL* homofermentativas	BL* heterofermentativas
Produtos	Ácido láctico	Ácido láctico, etanol, diacetil, acetoina ou ácido acético e dióxido de carbono
Rotas metabólicas	Hexose: Rota de Embden-Meyerhof Pentose: Rota de pentose fosfato	Hexose: Rota de fosfogliconato e fosfoetolase Pentose: Rota de fosfoetolase
Rendimento teórico de açúcares em ácido láctico	Hexose: 1,0 g/g (2,0 mol/mol) Pentose: 1,0 g/g (1,67 mol/mol)	Hexose: 0,5 g/g (1,0 mol/mol) Pentose: 0,6 (1,0 mol/mol)
Gêneros	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , algumas espécies de <i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , algumas espécies de <i>Lactobacillus</i>
Utilidade para produção comercial de ácido láctico	Útil devido a alta seletividade do produto	Não é útil devido a elevada formação de subprodutos

*BL: Bactérias lácticas.

Fonte: Abdel-Rahman, Tashiro e Sonomoto (2013, p. 880).

Lactobacillus casei são bactérias lácticas homofermentativas e produzem principalmente L(+)-ácido láctico e por isso é um dos micro-organismos mais utilizados na produção de L(+)-ácido láctico (BUVUKKILECI, 2000).

2.4 O poli ácido láctico (PLA)

Os produtos de PLA podem ser usados numa grande variedade de aplicações que vão desde embalagens a fibras, porém a produção de PLA em escala industrial é considerada relativamente nova quando comparada a produção do plástico petroquímico. Isto se deve ao fato do elevado custo de produção do ácido láctico que é a matéria-prima na produção do PLA (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

O poli ácido láctico (PLA) pertence à família de poliésteres alifáticos geralmente feitos a partir de alfa-hidroxi ácidos, que incluem o ácido poliglicólico ou ácido polimandélico e são considerados biodegradáveis e compostáveis (GARLOTTA, 2001).

PLA é um polímero termoplástico de alta resistência que pode ser feito a partir de recursos renováveis anuais para produzir artigos de uso, tanto na área de indústria de embalagens ou no campo da medicina como dispositivos médicos biocompatíveis/bioabsorvíveis (GARLOTTA, 2001).

2.5 Produção industrial

A preocupação com a produção microbiana de produtos com valores comerciais cresceram nos últimos anos devido principalmente ao estímulo de pesquisadores para o desenvolvimento de métodos para produção a partir dos chamados “métodos verdes”, o qual foi desencadeado pelo aumento dos problemas energéticos e ambientais. Dentre esses produtos, o ácido láctico é um dos mais importantes e atrai muito interesse devido a suas diversas aplicações, principalmente em indústrias alimentícias, químicas, cosméticas e farmacêuticas (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013), tradicionalmente, o principal uso do ácido láctico é em indústria alimentícia ou em aplicações relacionadas a essas indústrias, sendo que nos Estados Unidos cerca de 85% da produção de ácido láctico era voltada pra esta finalidade e os outros 15% era voltada para finalidades relacionadas a outros ramos (DATTA; HENRY 2006).

Existe um interesse crescente na produção de L(+)-ácido láctico porque ele pode ser usado na produção de poli ácido láctico, um polímero usado especialmente na medicina e na produção de plástico biodegradáveis, os quais podem substituir plásticos sintéticos derivados do petróleo (AMASS; AMASS; TIGHE, 1998; DATTA et al., 1995; LUNT, 1998;).

O preço do ácido láctico em 2006, com 50% de pureza, era de US\$ 1,38/Kg e com 88% de pureza era US\$ 1,54/Kg (WEE; KIM; RYU, 2006). A demanda de ácido láctico tem aumentado e em 2006 era estimado crescimento de 19% ao ano, principalmente devido ao seu emprego na produção de polímeros biodegradáveis como o ácido polilático (PLA) (DATTA et al., 1995, WEE; KIM; RYU, 2006). O ácido polilático tem sido considerado um dos plásticos biodegradáveis mais promissores (GROSS; KALRA, 2002; SAKAI et al., 2004). A elevada resistência química desse composto é vantajosa para a 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 essa ação facilitada quando exposto a alta temperatura e umidade (AURAS; HARTE; SELKE, 2003; TUOMINEN, 2003).

De acordo com Datta e Henry (2006) com o desenvolvimento e comercialização dos biopolímeros em 2005, de 20 a 30% da produção de ácido láctico passou a ser voltada para esta aplicação. Os biopolímeros de ácido polilático são biodegradáveis e biocompatíveis e são os responsáveis por impulsionar a expansão do mercado atual do ácido láctico (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Por volta de 1990, a produção mundial do ácido láctico era de aproximadamente 40.000 toneladas por ano, com dois principais produtores: CCA Biochem na Holanda com filiais no Brasil e na Espanha e Sterling Chemicals na cidade do Texas, no estado do Texas nos Estados Unidos (DATTA, 2005). CCA usava a tecnologia de fermentação de carboidratos e Sterling usava síntese química (DATTA; HENRY, 2006).

Novas aplicações do ácido láctico, como monômero em plásticos ou como intermediários na síntese de grande volume de produtos químicos oxigenados, gerou grande aumento em sua demanda (LIPINSKY; SINCLAIR, 1986).

Em 2003, grandes mudanças ocorreram nos EUA. Sterling saiu do ramo do ácido láctico e duas novas indústrias, Archer Daniels Midland (ADM) e Cargill Dow (uma fusão entre Dow Chemical Company e Cargill Corporation) entraram no negócio, ambas usando a tecnologia de fermentação de carboidratos. No início de 2005, a Cargill comprou a Dow e assim se estabeleceu a Natureworks LLC como subsidiária integral (DATTA; HENRY, 2006).

Segundo Datta e Henry (2006), o foco da ADM está no ácido láctico e seus derivados para usos convencionais, enquanto a Natureworks LLC tem sido o principal líder no negócio de polímero a base láctica. No Extremo Oriente, Musashino possui fabricação de ácido láctico por tecnologia de fermentação de carboidratos com parceiros chineses.

A produção de ácido láctico cresceu consideravelmente a partir da última década principalmente devido ao desenvolvimento de novos usos e a tecnologia de produção é agora principalmente baseada em fermentação de carboidratos (DATTA; HENRY, 2006).

Dois fatores principais devem ser considerados por limitar a biossíntese e afetar o crescimento do micro-organismo e a produtividade: as condições limitantes dos nutrientes e o efeito inibidor causado pela produção do ácido láctico no meio de cultura (OLMOS-DICHA et al., 1997).

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

Além disso, a seleção de um nutriente de baixo custo tem sido geralmente considerado um aspecto importante para a melhoria e desenvolvimento da produção de ácido láctico (TINOI; RAKARIYATHAM; DEMING, 2005).

Liew et al. (2005) utilizaram técnicas estatísticas para otimizar a produção da biomassa por *Lactobacillus rhamnosus*, variando as concentrações de extrato de levedura, glicose e vitaminas em diferentes valores de pH, estudando os efeitos individuais ou de interação desses parâmetros a fim de alcançar uma condição ótima. Os autores concluíram que os efeitos causados pelo extrato de levedura, pela vitamina, pela glicose e pelo pH no crescimento de *L. rhamnosus* foram significativos, sendo que o maior efeito foi determinado pela concentração do extrato de levedura. As condições ótimas de crescimento para *Lactobacillus rhamnosus* foram pH 6,9, solução de vitamina a 1,28% (v/v), glicose a 5%

(m/v) e extrato de levedura a 6% (m/v) e a resposta ótima estimada correspondente a estes fatores foi de $9,5052 \log_{10}$ (UFC/mL).

Para uma fermentação rápida e completa, o pH ótimo deve estar entre 5,5–6,5 dependendo do micro-organismo usado. A fermentação é fortemente inibida por pH baixo e cessa em pH com valor abaixo de 4,5 (PANESAR et al., 2007). Mussatto et al. (2008) utilizando meio MRS suplementado com cevada hidrolisada e de pH controlado, obteve produção máxima de 35,54 g/L de ácido lático, enquanto que o mesmo meio sem controle de pH atingiu 13,02 g/L. Observaram, também, menor consumo de substrato e menor crescimento celular na fermentação realizada sem controle de pH. Assim, o ácido lático produzido durante a fermentação tem que ser constantemente neutralizado. Para controlar o pH durante a fermentação são adicionados ao meio alguns agentes neutralizantes, como carbonato de cálcio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio.

O ácido lático possui um valor de pKa de 3,86 a 30°C. Assim, lactato em vez de ácido lático é formado em pH elevado, o que resultará em aumento dos custos de purificação, devido a necessidade de recuperação do ácido lático (YANG; ZHONG; TSAO, 1995). Além disso, quando o carbonato de cálcio é utilizado, o sulfato de cálcio pode ser produzido no processo de reconversão do lactato a ácido lático, o que pode causar consideráveis problemas ambientais, além de custos extras.

O ácido lático é geralmente produzido por batelada, porém vários outros processos são utilizados, como batelada alimentada e processos contínuos. Segundo Hofvendahl e Hahn-hägerdal (2000), o processo em batelada leva a maiores concentrações de produto na maioria dos casos, pois há consumo praticamente total do substrato, enquanto que nos processos contínuos permanece uma concentração residual.

2.5.1 Produção de ácido lático por batelada

A fermentação em batelada é o processo mais comum de fermentação. Neste tipo de fermentação todos os substratos e outros componentes não são adicionados durante a fermentação, apenas os agentes de neutralização para o controle do pH são adicionados (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Segundo Ding e Tan (2006), o processo de fermentação em batelada tem sido o método utilizado industrialmente para a produção de L(+)-ácido lático.

Como o sistema de batelada é um sistema fechado ele tem a vantagem da redução dos riscos de contaminação e a obtenção de altas concentrações de ácido láctico quando comparado a outros métodos de fermentação (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Em 2012, Moon, Wee e Choi (2012) utilizando o micro-organismo *Lactobacillus paracasei* subspécie *paracasei* CB2 121 isolado do solo próximo a uma indústria produtora de etanol conseguiram produzir 192 g/L de ácido láctico total, sendo 185,47 g/L de L(+)-ácido láctico, a partir de 200 g/L de glicose, com produtividade de 3,99 g/L/h e rendimento de 96%.

No entanto, na fermentação em batelada são obtidas, geralmente, concentrações celulares baixas devido aos níveis limitados de nutrientes, além da diminuição da concentração de ácido láctico e a sua produtividade devido a inibição pela alta concentração de produto e/ou substrato (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; DING; TAN, 2006).

2.5.2 Produção de ácido láctico por batelada alimentada

A inibição por substrato das cepas ocorre quando a concentração do substrato esta acima do nível critico, ocasionando assim a lise celular e extensão da fase lag de crescimento, o que pode resultar na redução na taxa de fermentação e utilização do açúcar (DING; TAN, 2006).

De acordo com Ding e Tan (2006), a fermentação por batelada alimentada é uma fermentação em batelada que é continuamente ou sequencialmente alimentada com substrato sem a remoção do meio de fermentação.

A fermentação em batelada alimentada é considerada a melhor fermentação para reduzir a inibição por substrato quando comparada com as bateladas e fermentações contínuas, pois mantem a concentração de substrato a um nível baixo pela adição de nutrientes ao meio de fermentação (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011).

No trabalho de Ding e Tan (2006) os autores analisaram diferentes métodos de batelada alimentada utizando o micro-organismo *Lactobacillus casei*. As seguintes estratégias foram analisadas: batelada alimentada por pulso, batelada alimentada por fluxo constante, batelada alimentada com concentração residual de glicose constante e batelada alimentada exponencial. Observaram que as menores concentrações de L(+)-ácido láctico, peso seco celular e produtividade foram obtidos em fermentação em batelada (112,5 g/L; 2,55 g/L e 1,34 g/L/h, respectivamente) e as maiores foram obtidas na fermentação em batelada

alimentada exponencial, na qual o meio de alimentação continha 850 g/L de glicose e 1% de extrato de levedura. Esta fermentação quando comparada a fermentação em batelada apresentou aumento de 56,5% no valor de produção de L(+)-ácido láctico (180 g/L), 68,6% de aumento no valor de peso seco celular (4,30 g/L) e 59,7% de aumento no valor da produtividade (2,14 g/L/h).

Choi, Al-zahrani e Lee (2013) realizaram diferentes estratégias de fermentação (alimentação por pulso, alimentação exponencial e alimentação exponencial modificada) utilizando o micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus*, suco de tâmara como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. O meio de alimentação utilizado era composto por suco de tâmara com 300 g/L de glicose e 288,7 g/L de frutose e 1% de extrato de levedura. Os autores desenvolveram um modelo de cinética para fermentação alimentada a partir dos resultados obtidos com as fermentações alimentadas realizadas e esse novo modelo foi usado para controlar uma alimentação antecipada. A produção de ácido láctico nesta fermentação com alimentação antecipada foi a maior obtida pelos autores e foi de 171,79 g/L (95,35% maior que a obtida na batelada), com produtividade de 1,58 g/L/h e rendimento de 87% (5,3% maior que o rendimento obtido na batelada).

Os mesmos autores conseguiram produção de 163,03 g/L de ácido láctico, rendimento de 88,1% e produtividade de 1,39 g/L/h na fermentação com alimentação exponencial e 160,72 g/L de ácido láctico, rendimento de 88% e 1,49 g/L/h de produtividade na fermentação alimentada exponencial modificada.

Na fermentação alimentada exponencial modificada e alimentada exponencial houve aumento de 82,76 e 85,39% na produção e 6% e 6,1% no rendimento, respectivamente. Porém, a produtividade obtida na batelada foi bem maior em relação a todas fermentações alimentadas (6,28 g/L/h).

2.6 Seleção de componentes do meio através de métodos estatísticos

De acordo com Chauhan, Trivedi e Patel (2007), o desenvolvimento de um meio econômico para a produção de metabólitos microbianos requer a seleção de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e metais e os nutrientes requeridos podem ser manipulados por métodos convencionais ou através de métodos estatísticos.

Métodos convencionais envolvem a mudança de uma variável independente de cada vez, mantendo as outras variáveis fixas. No entanto os métodos estatísticos oferecem várias vantagens em relação aos métodos convencionais por serem mais rápidos e viáveis, por mostrar os nutrientes mais importantes, ajudar a entender a relação entre os nutrientes em várias concentrações e reduzir o número total de experimentos, economizando assim tempo, vidraria, reagentes e mão de obra (CARVALHO et al., 1997; SRINIVAS; CHAND; LONSANE, 1994).

Segundo Stanbury, Whitaker e Hall (1986), o Planejamento Plackett-Burman é um planejamento multifatorial de dois níveis baseado na lógica conhecida como blocos incompletos balanceados. Esta técnica consiste em formar várias combinações (as quais são chamadas de conjuntos) dos componentes em quantidades variáveis. Realizar este planejamento é uma maneira eficiente de selecionar os fatores mais importantes entre um grande número de variáveis com um número reduzido de ensaios.

2.7 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). Sabe-se que aproximadamente uma tonelada de sulfato de cálcio, de reduzido valor econômico, deve ser utilizado para a produção de uma tonelada de ácido lático puro (DATTA et al., 1995).

Por esta razão há procura por métodos alternativos e ecologicamente corretos para sua purificação, como por exemplo, métodos envolvendo: troca-iônica, adsorventes em geral, destilação a vácuo, esterificação e métodos de hidrólise; separação por membrana (LI et al., 2008); eletrodialise, nanofiltração (BOUCHOUX; BALMANN; LUTIN, 2006) e osmose reversa (TIMMER; VAN DER HORST; ROBBERTSEN, 1993).

A purificação de ácido láctico a partir de colunas de troca iônica tem se mostrado como opção tecnológica para o processo (GONZÁLEZ et al., 2008), uma vez que os equipamentos necessários são relativamente simples e baratos, entretanto o uso é recomendado quando a solução de ácido láctico possui baixa concentração de sais (QUINTERO et al., 2012). Muitos estudos se concentram na recuperação de ácido láctico 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 (KULPRATHIPANJA; OROSHAR, 1991; MOLDES; ALONSO; PARAJO, 2003).

O processo de nanofiltração (NF) também tem se mostrado como opção para o processo de separação do ácido láctico do meio de fermentação. 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 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 retenção de mono e dissacarídeos e íons divalentes (Ex.: Ca^{+2} e Mg^{+2}) (KANG; CHANG; CHANG, 2004), além disso é possível obter alta taxa de recuperação do ácido láctico e boa clarificação do caldo fermentado.

A utilização de carvão ativado, que também é adsorvente, é ótima alternativa para a clarificação e para a remoção de quantidades significativas de açúcares e proteínas do caldo de fermentação de produção de ácido láctico, pois a adsorção de açúcares e proteínas no carvão ativado é bem maior que a adsorção do ácido láctico (CHEN; JU, 1998). Além disso, o processo é de fácil manipulação e apresenta baixo custo, podendo ser realizado em qualquer laboratório. Na maioria dos estudos de purificação de ácido láctico a utilização deste método sempre vem acompanhada de outros processos de purificação (FILACHIENE; FISHER, 1946; SARHADDAR et al., 1997; YIN et al., 1997).

Na maioria dos estudos mencionados nas patentes verifica-se que para obtenção do ácido láctico purificado e eliminação de parte ou de todos os íons residuais (sulfato, fosfato),

proteínas e açúcares remanescentes (lactose, glicose) é sempre necessário a nanofiltração (NF), carvão ativado e coluna de troca iônica (MANI; HADDEN, 1998).

A necessidade de se estudar procedimento para purificação do ácido láctico envolve operações unitárias, sendo que as etapas críticas são avaliadas em relação ao rendimento na recuperação do ácido láctico, remoção de contaminantes como proteínas, açúcares e cor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é produzir L(+)-ácido láctico utilizando insumos agroindustriais e aumentar a sua produção pela utilização de batelada alimentada, além disso, pretende-se estudar a recuperação e purificação do ácido láctico do caldo fermentado.

3.2 Objetivos específicos

1. Estudo da influência de diferentes fontes de carbono e fontes de nitrogênio, assim como dos componentes do meio de cultivo na produção de ácido láctico por fermentação, utilizando Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta.
2. Avaliação de diferentes métodos de batelada alimentada, tais como batelada alimentada por pulso, por fluxo constante e exponencial.
3. Cinética dos processos fermentativos em bioreatores.
4. Extração e recuperação do ácido láctico produzido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi o *Lactobacillus casei* Ke11, micro-organismo isolado de Kefir no Laboratório de Microbiologia Industrial, que se caracteriza por ser excelente produtor de L-(+)-ácido láctico. O isolado encontrava-se em estoque em tubos criogênicos a -20°C. Os tubos criogênicos continham 1:1 de meio introduzido por De Man, Rogosa e Sharpe (1960) para cultivo e isolamento de espécies de *Lactobacillus* (MRS) e glicerol a 40%. Os componentes do meio MRS são (g/L): glicose (20,0), peptona (10,0), extrato de levedura (5,0), extrato de carne (10,0), acetato de sódio (5,0), citrato de amônio (2,0), K₂HPO₄ (5,0), MgSO₄·7H₂O (0,1) e MnSO₄·4H₂O (0,05). Primeiramente foi feita a ativação do micro-organismo. Para isso, 0,5 mL do estoque foi adicionado em 4,5 mL de caldo MRS, e incubado a 35°C, por 24 horas. Após este período, 2 mL da suspensão bacteriana formada foi transferida para um Erlenmeyer contendo 18 mL de caldo MRS. O Erlenmeyer foi mantido em incubadora, a 35°C, 150 rpm, por 24 horas. O preparo do inóculo foi feito de acordo com o volume necessário para cada experimento e foi inoculado sempre 10% do volume de meio. O inóculo foi incubado a 35°C, 150 rpm por 18 horas. O tempo para o crescimento do micro-organismo no inóculo (18 horas) foi determinado a partir do perfil de crescimento do mesmo, projetando-se uma curva da biomassa em função do tempo (item 4.2).

4.2 Curva de crescimento

Uma curva de crescimento foi realizada para analisar o padrão de crescimento do *Lactobacillus casei* Ke11. Para isto o micro-organismo foi inoculado em três frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio MRS. O volume inoculado foi de 10% deste volume. Amostras foram retiradas em 6 tempos diferentes.

Após 48 horas, 30 mL do meio foram amostrados para a confecção da curva padrão. As amostras diluídas foram analisadas por densidade ótica (DO) no comprimento de onda de 600 nm. Outros 30 mL foram transferidos para cadinhos previamente pesados. Os cadinhos foram mantidos a 100°C em estufas por 24 horas para secagem e pesados com o objetivo de se obter a massa seca do micro-organismo após o tempo de 48 horas.

A partir das leituras da DO e dos valores de massa seca foi confeccionada a curva padrão que correlacionava a biomassa em g/L com os valor de absorbância.

As seis (6) amostras retiradas foram então analisadas e a partir dos valores obtidos foi traçada a curva de crescimento para o micro-organismo.

4.3 Substratos

O soro de queijo em pó foi fornecido pelo laticínio Tavalaro (Brotas-SP). Primeiramente foi realizado a desproteinização do soro, por meio da dissolução em água e posterior aquecimento por 5 minutos. Este processo provocou a coagulação das proteínas. Em seguida, a solução foi resfriada naturalmente até atingir a temperatura ambiente, e então centrifugada a 7000 x g por 10 minutos para a remoção das proteínas (soro de queijo desproteinizado).

O caldo de cana foi adquirido na Usina Sta. Lúcia, situada na região de Araras-SP e a sacarose utilizada foi da marca Synth e o açúcar cristal da marca Purinha.

4.4 Fermentações

4.4.1 Fermentações com diferentes fontes de carbono e diferentes fontes de nitrogênio

O experimento foi conduzido segundo esquema fatorial 3x4, inteiramente casualizado com 4 repetições, para estudar três fontes de carbono com concentração inicial de 100 g/L de açúcar redutor total (ART) - soro de queijo, caldo de cana de açúcar e sacarose- e 4 fontes de nitrogênio, na concentração inicial de 1,72 g/L de nitrogênio - extrato de levedura, farinha da proteína da semente de algodão (Proflo da ®Traders Protein), autolisado de levedura e água de maceração de milho (Tabela 3). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram realizados 12 experimentos, sendo 4 repetições, totalizando 48 frascos de 150 mL contendo 50 mL de meio suplementado com os sais do meio MRS, Tween 80 a 1mL/L além de 60g/L de carbonato de cálcio e 10% de inóculo. Para analisar-se a concentração de ácido láctico e a concentração de substrato, 1 mL de amostra de cada frasco foi retirado em 24 e em 48 horas.

Tabela 3 - Concentrações das fontes de nitrogênio (extrato de levedura, autolisado de levedura, AMM e proflo®).

Fonte de nitrogênio ^a	Concentração (g/L ou mL/L)
Extrato de levedura	15,0
Autolisado de levedura	12,75
AMM ^b	36,75
Proflo ^c	15,47

^a A quantidade de cada fonte de nitrogênio foi adicionada para fornecer a concentração de 1,725 g/L de nitrogênio.

^b Água de Maceração de Milho.

^c Farinha da proteína da semente de algodão.

4.4.2 Comparação entre açúcar cristal e sacarose PA

Verificou-se a possibilidade de substituir a sacarose quimicamente pura (PA) pelo açúcar cristal comum adquirido em estabelecimentos comerciais, com o objetivo de se diminuir os custos do processo visto que a sacarose PA tem custo mais elevado. A marca de açúcar cristal escolhida foi a “Purinha”, por apresentar menor custo.

Também foi avaliada a diferença entre autoclavar a sacarose ou o açúcar cristal junto com o meio de cultivo ou autoclavá-los separadamente e adicioná-los posteriormente.

Frascos de 125 mL contendo 20 mL de meio de produção mais o inóculo foram utilizados. O experimento foi feito em duplicata totalizando 8 frascos. A concentração utilizada dos açúcares foi de 100 g/L e além do açúcar os meios continham os sais do meio MRS e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Também foi adicionado 60 g/L de carbonato de cálcio para controle do pH. Os frascos foram incubados em *shaker* a 150 rpm, 35°C, por 24 horas.

Em 4 frascos a sacarose química ou o açúcar cristal foram adicionados ao meio antes da esterilização por autoclave. Em outros 4 frascos, a sacarose química ou o açúcar cristal foram autoclavados em frascos separados e adicionados posteriormente no fluxo laminar ao frasco contendo o meio.

4.4.3 Planejamento do tipo Plackett-Burman

Após selecionar a melhor fonte de carbono e de nitrogênio, o segundo passo da otimização foi avaliar os componentes do meio MRS que possuem efeito significativo na produção de ácido lático por *Lactobacillus casei* Ke11 utilizando-se estas fontes. Foi realizado um planejamento do tipo Plackett-Burman (PB) analisando-se as seguintes

variáveis: fonte de carbono, fonte de nitrogênio, porcentagem de inóculo, os sais fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, acetato, citrato e o Tween 80. O planejamento foi realizado com três repetições no ponto central, totalizando 15 experimentos. As variáveis com nível de confiança maior que 95 % foram consideradas como variáveis que influenciam significativamente a produção de ácido lático. O planejamento experimental PB foi baseado no modelo de primeira ordem sem interações entre os fatores. As variáveis e níveis utilizados no planejamento estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman.

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Tween80 (mL/L)	X ₁	0	0,5	1
Citrato (g/L)	X ₂	0	1	2
Acetato (g/L)	X ₃	0	2,5	5
MnSO ₄ (g/L)	X ₄	0	0,05	0,1
MgSO ₄ (g/L)	X ₅	0	0,1	0,2
K ₂ HPO ₄ (g/L)	X ₆	0	1	2
Inóculo (%)	X ₇	2	6	10
Sacarose (g/L)	X ₈	50	100	150
Extrato de Levedura (g/L)	X ₉	0	15	30

O experimento foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL de meio de produção. Cada frasco continha 60 g/L de carbonato de cálcio para controle de pH e foi colocado em *shaker* em 150 rpm por 24 horas. Após 24 horas, amostras foram retiradas para quantificação do ácido lático.

4.4.4 Planejamento do tipo composto central e metodologia da superfície de resposta

Com as variáveis que aumentaram significativamente a produção de ácido lático, avaliados pelos experimentos citados acima, foi realizado um planejamento fatorial composto central com quatro replicas do ponto central, totalizando 28 experimentos. O experimento foi realizado em duplicata.

As variáveis independentes foram codificadas segundo a equação 1:

Equação geral:

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (1)$$

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

X é o valor real da variável a ser calculada;

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

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

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

Os níveis reais e codificados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores reais das variáveis independentes codificadas.

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-2	-1	0	+1	+ 2
Sacarose (g/L)	X_1	0	60	120	180	240
Extrato de levedura (g/L)	X_2	0	15	30	45	60
Tween80 (ml/L)	X_3	0	0,5	1	1,5	2
Inóculo (%)	X_4	0	5	10	15	20

O experimento foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL, com 20 mL de meio de produção sendo 10% de inóculo. Foram adicionados 60 g/L de carbonato de cálcio em todos os frascos, para controle de pH. Os frascos foram incubados em *shaker* a 150 rpm por 24 horas.

4.4.5 Batelada e batelada alimentada

As fermentações em batelada e em batelada alimentada foram conduzidas em fermentador (Modelo Multifors 2, Infors, USA), composto de seis vasos com capacidade de 500 mL, com controle independente de pH, temperatura, agitação e aeração. A temperatura, agitação e pH utilizados foram de 35°C, 150 rpm e 6,2 respectivamente. O volume de trabalho inicial foi de 300 mL.

Foram realizadas quatro (4) fermentações em batelada simples, sendo uma com controle do pH feito por NaOH 10 N e o meio de fermentação contendo sais do meio MRS, outra com o controle do pH também por NaOH 10 N mas dessa vez os sais do meio MRS não foram adicionados ao meio.

Uma terceira fermentação foi feita na qual o controle do pH foi feito por CaCO_3 e no meio de fermentação não havia sais do meio MRS e uma última batelada simples na qual o controle do pH também foi feito por CaCO_3 e sais do meio MRS foram adicionados ao meio de fermentação.

O meio de fermentação utilizado foi o meio otimizado anteriormente e obtido através da análise da superfície de resposta com base nas maiores concentrações de ácido láctico e menores concentrações residuais de açúcar: 120 g/L de sacarose e 40 g/L de extrato de levedura, sem adição de Tween 80 e 10% de inóculo. Quando o CaCO_3 foi utilizado, a concentração deste foi de 60 g/L.

Essas bateladas foram realizadas com o objetivo de se visualizar os efeitos da adição ou não dos sais do meio MRS bem como dos diferentes métodos para controle do pH (NaOH e CaCO_3).

Além dessas bateladas foram feitas oito (8) bateladas alimentadas, sendo duas bateladas alimentadas por pulso, com concentração de sacarose inicial de 80 g/L e outra com concentração de sacarose inicial de 120 g/L, duas bateladas alimentadas por fluxo constante, também com concentrações iniciais de sacarose de 80 g/L e 120 g/L.

O meio de alimentação tinha concentração de sacarose de 500 g/L além de 1% de extrato de levedura. Nas bateladas alimentadas por pulso foram gerados dois pulsos de 50 mL, um logo no início da fermentação e outro após 12 horas de fermentação. Nas bateladas alimentadas por fluxo constante a alimentação ocorreu por fluxo constante de 5 mL/hora que se iniciou após 12 horas de fermentação e foi desligada em 24 horas de fermentação, tendo assim duração total de 12 horas.

Foi feito também uma batelada alimentada do tipo exponencial na qual o fluxo de alimentação foi calculado pela equação 2 e o controle do fluxo foi feito de forma manual e outras três bateladas alimentadas do tipo exponencial, nas quais os fluxos de alimentação também foram calculado pela fórmula 2, entretanto o controle foi feito de forma automática por meio do software Iris 6.

Os pH's das bateladas alimentadas por pulso, fluxo constante e exponencial manual foram controlados por NaOH 10 N. As três fermentações em batelada alimentada do tipo exponencial automáticas tiveram seus pH's controlados por maneiras diferentes cada uma. Uma fermentação teve o pH controlado por adição de somente NaOH 10 N, outra por adição somente de CaCO_3 (60 g/L) e a terceira por adição tanto de NaOH 10 N quanto de CaCO_3 (60 g/L). O objetivo era avaliar os efeitos de cada método de manutenção do pH em cada fermentação em batelada alimentada exponencial.

Para a batelada alimentada exponencial, a vazão de alimentação (F) foi determinada pela equação 2, em que μ é a velocidade específica de crescimento constante dada por:

$$VX = V_0X_0 \exp(\mu t)$$

$$F = \frac{\mu}{Y_{X/S}(S_i - S)} V_0X_0 \exp(\mu t) \quad (2)$$

Onde: V e V_0 são os volumes de cultivo e volume inicial, μ é a velocidade específica de crescimento, X_0 e X são as concentrações das células no início da fermentação e no início da alimentação, respectivamente, e $Y_{X/S}$ é o rendimento teórico da célula por substrato, S_i e S são as concentrações dos substratos na solução de alimentação e no reator no início da alimentação e t é o tempo de alimentação.

Nas bateladas alimentadas exponenciais em que o pH foi controlado por NaOH 10 N e por NaOH 10 N e CaCO_3 a alimentação se iniciou após 12 horas de fermentação. Já a batelada alimentada exponencial em que o pH foi controlado somente por CaCO_3 a alimentação teve início após 12 horas de fermentação e somente após 18 horas de fermentação a alimentação exponencial se iniciou.

4.4.6 Cinética do processo fermentativo e parâmetros estequiométricos

A cinética do consumo de substrato e da produção de L(+)-ácido láctico foi realizada nos experimentos em *shaker* e em reator, sendo que neste último também foi avaliada a cinética de crescimento do micro-organismo nos ensaios em que não houve adição de CaCO_3 para controle de pH, uma vez que a adição deste prejudicou a determinação da biomassa. O objetivo foi a comparação entre os processos fermentativos em batelada simples e batelada alimentada.

Os fatores de conversão de substrato em produto, $Y_{p/s}$ (g de ácido láctico/g de lactose) foram avaliados em todas as fermentações. O fator de conversão de substrato em biomassa, $Y_{x/s}$ (g de células/ g de substrato) e a relação entre a produção de ácido láctico e a produção de células, $Y_{p/x}$ (g de ácido láctico/g de células) foram avaliados nos ensaios nos quais não houve adição de CaCO_3 para controle do pH.

A partir dos perfis de concentração celular (dos ensaios nos quais foi possível a sua determinação), formação de produto e consumo do substrato com o tempo foi possível determinar as velocidades instantâneas e/ou específicas de crescimento microbiano, formação de produto e consumo de substrato.

4.4.7 Purificação utilizando carvão ativado e celite

A purificação foi realizada em funil de placa sinterizada (3,50 cm de diâmetro e 5,00 cm de altura) onde foi adicionado uma camada de celite (Sigma-Aldrich) e uma camada de carvão ativado em pó, ambas com aproximadamente 1,00 cm de espessura. Inicialmente, foi passada água destilada para a completa compactação do carvão e da celite, em seguida, o caldo centrifugado foi filtrado a vácuo na funil contendo a mistura de celite e carvão ativado. Após a filtração foi realizada lavagem com água destilada e o filtrado foi submetido à uma nova etapa de filtração em carvão e celite e posterior lavagem.

Para a purificação dos caldos com pH 3, a lavagem foi realizada com solução de HCl (1N) ao invés de água.

Nos dois casos a solução final resultante foi filtrada em uma membrana de ultrafiltração de acetato de celulose.

4.4.8 Troca catiônica

A solução contendo lactato obtida da purificação com carvão e celite foi adicionada a uma seringa contendo a resina de troca catiônica: IRA 120 (hydrogen form). Antes da utilização, as resinas foram lavadas com solução de HCl (1N).

4.5 Metodologia Analítica

4.5.1 Quantificação do ácido láctico

A quantificação do ácido láctico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector Ultra-violeta a 210 nm. 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.

4.5.2 Quantificação do consumo do substrato

Em todo o planejamento experimental e nas bateladas realizadas tanto em *shaker* quanto em reator o substrato foi quantificado pelo método DNS (REF). O reagente de DNS foi preparado com 1g de DNS dissolvido em 50 mL de água destilada, adição de 20 mL de NaOH 2N e 30 g do sal de Rochelle – tartarato duplo de sódio e potássio. Após homogeneização completa o volume foi completado para 100 mL com água destilada .

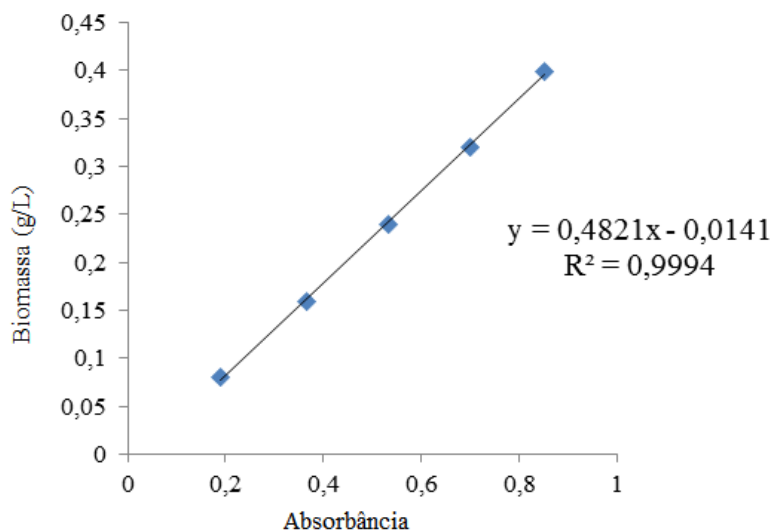
Para a análise dos açúcares redutores totais, as amostras eram diluídas e a seguir hidrolisadas: 250 µL de HCl 2N foram adicionados a 250µL da amostra diluída e fervidos por 5 minutos. Após resfriar em temperatura ambiente, o conteúdo foi neutralizado com 250 µL de NaOH 2N e então homogeneizados. A seguir, 250 µL de DNS eram adicionados a 250 µL deste hidrolisado e fervidos novamente por mais 5 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente 2,5 mL de água destilada foi adicionado e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm. A absorbância obtida foi convertida em g/L (g de substrato/litro de meio) por meio de curva padrão.

Nas fermentações em batelada alimentada a sacarose foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de índice de refração. Foi utilizada a coluna 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.

4.5.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por densidade ótica, no comprimento de onda de 600 nm. Após a centrifugação da amostra e separação do sobrenadante, o precipitado foi lavado uma vez com água destilada. A amostra foi então diluída, antes da leitura no espectrofotômetro. A diluição foi feita de modo que a absorbância permanecesse na faixa de 0,1 - 0,7 unidades de absorbância. A medida da absorbância foi convertida em concentração celular (g de massa seca/litro de meio) por meio de curva padrão (Figura 3).

Figura 3 – Curva padrão para determinação da concentração celular.



As concentrações celulares dos experimentos nos quais havia adição de CaCO₃ não foram analisadas.

4.5.4 Determinação de proteínas

As proteínas foram quantificadas através da metodologia de Lowry (PETERSON, 1977).

4.5.5 Análises estatísticas

Os dados relacionados ao experimento fatorial 3x4, em que se avaliou 3 fontes de carbono e 4 fontes de nitrogênio foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5%, para comparação de médias entre os tratamentos, usando o software Sisvar 5.1 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, LAVRAS, MG).

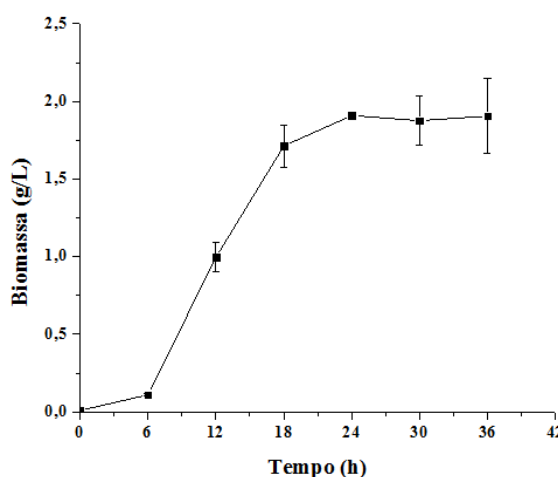
A análise estatística dos dados relacionados ao planejamento experimental foi realizada pelo programa *Statistica 7*, a partir da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros, os termos isolados, de interação e quadráticos das variáveis estudadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Micro-organismo e curva de crescimento

A fase exponencial de crescimento do micro-organismo *Lactobacillus casei* Ke11 inicia 6 horas após a inoculação (Figura 4). Em 24 horas após a inoculação, o micro-organismo está no fim da fase exponencial iniciando a fase estacionária. Devido a isso, o micro-organismo sempre foi inoculado durante sua fase exponencial, com 18 horas de crescimento.

Figura 4 - Curva de crescimento do *Lactobacillus casei* Ke11 no meio MRS, a 35 °C, 150 rpm.



5.2 Fermentação com diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Os resultados obtidos durante fermentação de *Lactobacillus casei* Ke11 estão apresentados nas Tabelas 6 a 8, que mostram os valores de produção (g/L) e de rendimento (g de ácido lático/ g de substrato) de L(+)-ácido lático após 48 horas, e da produtividade (g/L de ácido lático/ hora) após 24 horas.

Tabela 6 - Médias da concentração de L(+)-ácido láctico produzido (g/L) em 48 horas por *Lactobacillus casei* Ke11 utilizando, três fontes de carbono, suplementadas com diferentes fontes de nitrogênio: autolisado de levedura (AL), água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL) e proflo (PF).

Fontes de carbono	Fontes de nitrogênio			
	AL	AMM	EL	PF
Caldo de cana	73,60 aA*	73,69 bA	83,01 aA	39,18 bB
Sacarose	1,92 bC	72,21 bB	87,09 aA	3,08 cC
Soro de queijo	63,56 aC	92,61 aA	77,26 aB	59,41 aC

*As médias seguidas por letras distintas minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey. Coeficiente de variação (CV) = 11,79 %

Tabela 7 - Média dos rendimentos obtidos (g de L(+)-ácido láctico/ g de açúcar), em 48 horas, na produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei* Ke11 utilizando três fontes de carbono suplementadas com diferentes fontes de nitrogênio: autolisado de levedura (AL), água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL) e proflo (PF).

Fontes de carbono	Fontes de nitrogênio			
	AL	AMM	EL	PF
Caldo de cana	0,98 aA*	0,98 aA	0,84 aA	0,82 aA
Sacarose	0,05 cB	0,99 aA	0,88 aA	0,07 bB
Soro de queijo	0,74 bB	0,95 aA	0,79 aB	0,78 aB

*As médias seguidas por letras distintas minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey. CV= 12,93%

Tabela 8 - Médias das produtividades de L(+)-ácido láctico (g/L/h), em 24 horas, por *Lactobacillus casei* Ke11 utilizando três fontes de carbono suplementadas com diferentes fontes de nitrogênio: autolisado de levedura (AL), água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL) e proflo (PF).

Fontes de carbono	Fontes de nitrogênio			
	AL	AMM	EL	PF
Caldo de cana	1,26 aC*	1,74 bB	4,04 aA	0,71 aD
Sacarose	0,09 cC	1,46 bB	3,77 aA	0,09 bC
Soro de queijo	0,52 bC	2,29 aA	1,82 bB	0,62 aC

*As médias seguidas por letras distintas minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal diferem entre si ao nível de 5% indicadas pelo teste de Tukey. CV=12,73%

O maior valor para produção de L(+)-ácido láctico foi de 92,61 g/L em 48 horas (Tabelas 6 – 8) e foi obtido quando o soro de queijo foi usado como fonte de carbono suplementado com água de maceração de milho (AMM) como fonte de nitrogênio, diferindo

estatisticamente das demais fontes de carbono e nitrogênio. O segundo maior valor (87,09 g/L) foi obtido quando a sacarose foi usada como fonte de carbono suplementada com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Amrane e Prigent (1994) relatam a importância do extrato de levedura nos meios de pré-cultura. Segundo estes autores, a principal contribuição do extrato de levedura no meio é das bases purinas e pirimidinas e das vitaminas do grupo B.

Segundo Ohleyer, Wilke e Blanch (1985), o extrato de levedura é uma mistura complexa de nitrogênio, vitaminas e co-fatores necessários para o crescimento celular, manutenção celular e produção de ácido láctico e uma certa quantidade de extrato de levedura é necessária para produção do mesmo.

No trabalho de Buvukkileci (2000) foi analisado o efeito do extrato de levedura, utilizando lactose como fonte de carbono e o micro-organismo *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Com adição de 0,5% de extrato de levedura no meio, toda a lactose foi consumida em 30 horas de fermentação e a produção de ácido láctico foi de 50 g/L. A produção do ácido láctico aumentou com o aumento da concentração de extrato de levedura.

Após 48 horas (Tabela 7), os maiores valores de rendimento foram obtidos quando a AMM foi utilizada como fonte de nitrogênio (0,99 ou 99% quando utilizada juntamente com sacarose; 0,98 ou 98% quando utilizada com caldo de cana e 0,95 ou 95% quando utilizada com soro de queijo) e quando o caldo de cana foi utilizado como fonte de carbono suplementado com autolisado de levedura (0,98, ou 98%). Outro valor alto para rendimento em 48 horas foi obtido quando a sacarose foi usada como fonte de carbono suplementada com extrato de levedura como fonte de nitrogênio (0,88 ou 88%).

Aeschlimann e Stockar (1990), utilizando o micro-organismo *Lactobacillus helveticus* e meio contendo 60 g/L de soro em pó, observaram que quando a concentração de extrato de levedura utilizada passou de 1,5 g/L para 3,0 g/L, o rendimento do ácido láctico aumentou de 83% para 92%, mostrando que o extrato de levedura pode influenciar o rendimento. Estes experimentos tiveram produção de ácido láctico de 36,2 g/L e 42,4 g/L, respectivamente.

Eldeleklioglu, Bayraktar e Mehmetoglu (2013) estudaram o efeito do extrato de levedura na produção do ácido láctico utilizando o micro-organismo *L. casei* NRRL-1922 e soro de queijo e observaram que após 48 horas de fermentação, com adição de 5 g/L a 10 g/L de extrato de levedura no meio, o rendimento obtido no final da fermentação foi entre 90 e 99%. Já quando o extrato de levedura não foi adicionado, o rendimento obtido foi de 57%.

Os maiores valores para produtividade em 24 horas (Tabela 8) foram obtidos quando o caldo de cana foi usado como fonte de carbono suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio (4,04 g/L/h), sendo que não houve diferença significativa quando a sacarose foi usada como fonte de carbono suplementada com extrato de levedura como fonte de nitrogênio (3,77 g/L/h).

No trabalho de Roy, Goulet e Leduy (1986), os autores utilizaram o micro-organismo *Lactobacillus helveticus* e soro ultrafiltrado como fonte de carbono e observaram que uma produtividade maior foi obtida quando se utilizou extrato de levedura na concentração de 0,5% (m/v) no meio de cultura, comparado com o meio de cultivo contendo AMM na mesma concentração. No entanto, a produtividade máxima de ácido láctico foi dobrada (2,70 g/L/h) quando o extrato de levedura foi usado em concentração de 1,5% (m/v).

Buvukkileci (2000) em seu trabalho concluiu que quanto maior a concentração de extrato de levedura no meio, menor o tempo de fermentação. Para produzir a mesma concentração de ácido láctico sem adição do extrato de levedura a fermentação durou 60 horas, com adição do extrato de levedura a fermentação demorou 40 horas.

O mesmo foi concluído por Eldeleklioglu, Bayraktar e Mehmetoglu (2013) que observaram que quando a concentração de extrato de levedura no meio aumentou de 2 g/L para 10 g/L o tempo de fermentação para a obtenção da máxima produção de ácido láctico passou de 96 horas para 48 horas.

Os valores de produtividade obtidos por Buvukkileci (2000) foram 0,84; 1,45; 1,75; 1,90 e 1,98 g/L/h para 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1% de extrato de levedura, respectivamente. Em todas as fermentações a lactose foi totalmente consumida e os rendimentos obtidos foram em torno de 92-94%.

A sacarose, utilizada como fonte de carbono, suplementada com extrato de levedura, como fonte de nitrogênio, gerou bons resultados, tanto de produção, como de rendimento e também de produtividade; assim, optou-se por utilizar estes substratos como fontes de carbono e nitrogênio, uma vez que estas fontes poderão facilitar o processo de purificação e recuperação do ácido láctico, pois segundo Eldeleklioglu, Bayraktar e Mehmetoglu (2013), o ácido láctico mais puro pode ser obtido com baixos custos de purificação quando um açúcar puro é fermentado.

5.2.1 Comparação entre açúcar cristal e sacarose PA

Os dados obtidos após 24 horas de fermentação nos experimentos com sacarose PA e açúcar cristal podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de L(+)-ácido láctico e rendimento obtidos no experimento com sacarose e açúcar cristal em 24 horas de fermentação utilizando *Lactobacillus casei* Ke11.

Experimentos	Ácido Láctico (g/L)	Rendimento (%)
Sacarose adicionada antes de autoclavar	86,66	94
Sacarose adicionada depois de autoclavar	80,94	86
Açúcar cristal adicionado antes de autoclavar	89,75	99
Açúcar cristal adicionado depois de autoclavar	86,23	91

Como pode ser visualizado na Tabela 9, não houve muita diferença entre as concentrações de produção de L(+)-ácido láctico obtidos após 24 horas, com diferença entre o maior e o menor valor de apenas 10,88%, já os valores de rendimento obtidos tiveram uma diferença ligeiramente maior (13% de diferença entre os valores de maior e menor rendimento).

A maior produção de L(+)-ácido láctico (89,75 g/L) e o maior rendimento (99%) foram observados no experimento em que o açúcar cristal foi adicionado ao meio antes do processo de autoclavagem, assim para os outros ensaios optou-se pela utilização do açúcar cristal como fonte de sacarose e este foi adicionado ao meio sempre antes do processo de esterilização por autoclavagem.

5.3 Efeito da composição do meio de fermentação por planejamento do tipo Plackett-Burman

Após a determinação da melhor fonte de carbono e nitrogênio, foi realizado o planejamento do tipo Plackett Burman para avaliar o efeito dos diferentes componentes do meio de fermentação. A Tabela 10 apresenta a matriz do Planejamento com os valores reais e a produção de ácido láctico.

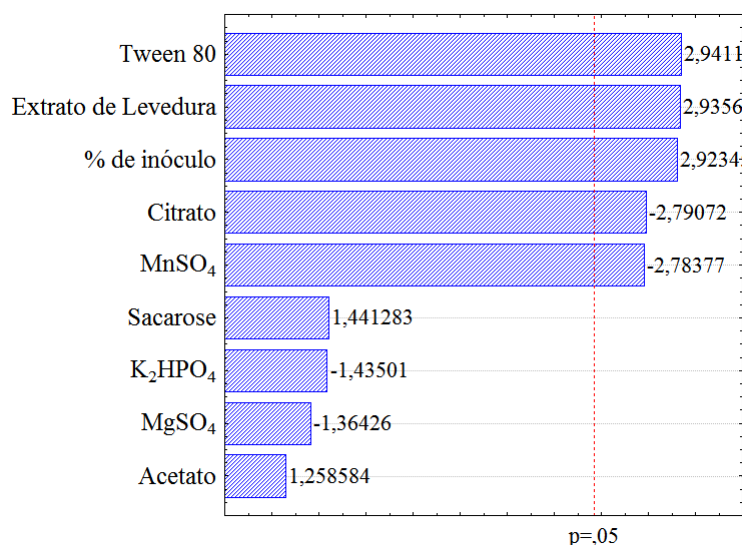
Tabela 10 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman com os valores reais e a resposta para produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus casei* Ke11 após 24 horas de fermentação.

Exp *	Parâmetros							Respost a		
	Tween 80 (mL/L)	Citrat o (g/L)	Acetat o (g/L)	MnSO 4 (g/L)	MgSO 4 (g/L)	K ₂ HPO 4 (g/L)	Inócul o %	Sac* (g/L)	EL* (g/L)	Ácido Lático (g/L)
1	1	0	5	0	0	0	10	150	30	145,5
2	1	2	0	0,1	0	0	2	150	30	6,05
3	0	2	5	0	0,2	0	2	50	30	1,12
4	1	0	5	0,1	0	2	2	50	0	0,45
5	1	2	0	0,1	0,2	0	10	50	0	2,8
6	1	2	5	0	0,2	2	2	150	0	1,15
7	0	2	5	0,1	0	2	10	50	30	1,8
8	0	0	5	0,1	0,2	0	10	150	0	3
9	0	0	0	0,1	0,2	2	2	150	30	1,3
10	1	0	0	0	0,2	2	10	50	30	54,45
11	0	2	0	0	0	2	10	150	0	2,25
12	0	0	0	0	0	0	2	50	0	0,57
13	0,5	1	2,5	0,05	0,1	1	6	100	15	0,9
14	0,5	1	2,5	0,05	0,1	1	6	100	15	1,6
15	0,5	1	2,5	0,05	0,1	1	6	100	15	1,6

*Exp: experimentos; Sac: sacarose; EL: extrato de levedura

Os fatores que tiveram influência no aumento da produção de ácido láctico pelo micro-organismo *Lactobacillus casei* Ke11 foram o extrato de levedura, o Tween 80 e a porcentagem de inóculo. Este fato pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 - Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados (valores de t_{calc}) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a produção de ácido láctico após 24 horas por *Lactobacillus casei* Ke11.



O Tween 80, o extrato de levedura e a porcentagem de inóculo exerceram efeitos positivos ao nível de confiança de 95%, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumentam do nível -1 para o +1, ocorre aumento na concentração de ácido láctico.

Naveena et al. (2005) relatam o Tween 80 como componente significativo no aumento da produção de ácido láctico utilizando o micro-organismo *Lactobacillus amylophilus* GV6 e farelo de trigo em fermentação no estado sólido. Coelho et al. (2011b) trabalhando com o micro-organismo *Lactobacillus plantarum* LMISM6, também observaram que o Tween 80 foi significativo no aumento da produção de ácido láctico.

Segundo Zou et al. (2013) o Tween 80 é um osmoprotetor usado para proteger as bactérias lácticas do estresse osmótico. Ele aumenta a taxa de crescimento e a tolerância osmótica dos lactobacilos em fermentações lácticas.

O Tween 80 contém mais de 90% de ácido oleico, o qual é incorporado na membrana dos lactobacilos e assim aumenta a sua tolerância ao estresse osmótico (CORCORAN et al., 2007).

Eldeleklioglu, Bayraktar e Mehmetoglu (2013) estudaram o efeito do MnSO₄ e MgSO₄ na produção de ácido láctico por *L. casei* NNRL-1922 utilizando soro de queijo como fonte de carbono e concluíram que ambos não exercem efeito significativo na produção de ácido láctico.

Quando diferentes concentrações de MnSO_4 e MgSO_4 foram adicionadas no meio de fermentação, a concentração de ácido láctico obtida ao longo da fermentação não mudou.

Já Buvukkileci (2000) analisou os efeitos de diferentes sais em fermentação por *L. casei* utilizando lactose de soro de queijo e 0,5% de extrato de levedura. O autor adicionou diferentes sais em direntes fermentações com o objetivo de se encontrar o sal mais importante para o micro-organismo em meio contendo soro de queijo e extrato de levedura. Depois de 24 horas de fermentação observou que quando somente MnSO_4 foi adicionado, o resultado foi similar ao obtido quando todos os sais foram adicionados ao meio de fermentação e concluiu que somente MnSO_4 era essencial para a produção de ácido láctico a partir de soro de queijo utilizando-se o micro-organismos *L. casei*.

Por outro lado, Lew et al. (2013) estudaram os efeitos de Mn^{2+} e Mg^{2+} na produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* FTDC 8313 e observaram que tanto Mn^{2+} quanto Mg^{2+} precisam estar simultaneamente presentes para estimular a produção de ácido láctico. Foi observado também que a presença de ambos em sítos de ligação nas enzimas do ciclo da hexose monofosfato aumentaram a afinidade da ligação enzima-substrato em cinco enzimas, afetando assim diferentes estágios deste ciclo.

Neste trabalho MgSO_4 não foi significativo e MnSO_4 exerceu efeito negativo na produção de L(+)-ácido láctico o que pode estar de acordo com Kotzamanidis, Roukas e Skaracis (2002) que dizem que em altas concentrações no meio o cálcio, cobre, ferro, zinco, assim como o magnésio e o manganês, podem inibir o crescimento do micro-organismo, influenciar o pH do substrato além de estarem envolvidos na inativação de enzimas responsáveis pela biossíntese do produto.

Como pode ser observado na Figura 5, o sal K_2HPO_4 não foi significativo no aumento da produção do ácido láctico e além disso exerceu efeito negativo. Segundo Honorato et al. (2007), a adição de fosfato ao meio de cultura aumenta o crescimento do micro-organismo e aumenta a produção de ácido láctico, uma vez que mantém o pH próximo do valor ideal de crescimento, permitindo assim a realização da fermentação por um longo tempo. Porém isto não foi observado neste trabalho.

Depois da obtenção dos fatores significativos para produção de L(+)-ácido láctico (Tween 80, extrato de levedura e porcentagem de inóculo), a próxima etapa foi otimizar as concentrações do Tween 80 e do extrato de levedura bem como a porcentagem de inóculo no

meio. A concentração de sacarose também foi avaliada. Para isto, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, utilizando planejamento composto central.

5.4 Otimização da produção de L-(+) ácido láctico por superfície de resposta

As concentrações dos componentes extrato de levedura, Tween 80, sacarose bem como a influência da porcentagem de inóculo na produção de ácido láctico foram otimizadas através da superfície de resposta.

A matriz do planejamento, assim como as respostas (produção de ácido láctico em g/L, açúcar residual em g/L e produtividade em g/L/h) está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental composto central com os valores reais e as respectivas respostas produção de ácido láctico (g/L), sacarose residual (g/L) e produtividade (g/L/h) utilizando *L. casei* Ke11 durante 24 horas.

Experimento s	Parâmetros				Respostas		
	Sacaros e	Extrato de Levedur a	Tween8 0	Inócul o	Produçã o g/L	Sacaros e Residua l g/L	Produtividad e g/L/h
	g/L	g/L	mL/L	%		24 h	
1	60	15	0,5	5	42,63	4,06	1,78
2	60	15	0,5	15	50,18	2,93	2,09
3	60	15	1,5	5	50,18	1,66	2,09
4	60	15	1,5	15	54,43	2,31	2,27
5	60	45	0,5	5	48,90	2,23	2,04
6	60	45	0,5	15	46,10	3,27	1,92
7	60	45	1,5	5	44,73	2,09	1,86
8	60	45	1,5	15	46,95	3,07	1,96
9	180	15	0,5	5	74,20	103,11	3,09
10	180	15	0,5	15	79,00	97,87	3,29
11	180	15	1,5	5	60,25	114,52	2,51
12	180	15	1,5	15	91,70	87,28	3,82
13	180	45	0,5	5	127,40	57,63	5,31
14	180	45	0,5	15	139,50	45,40	5,81
15	180	45	1,5	5	119,10	49,31	4,96
16	180	45	1,5	15	121,40	38,52	5,06
17	0	30	1	10	4,09	0	0,17
18	240	30	1	10	104,70	112,25	4,36
19	120	0	1	10	4,85	106,26	0,20
20	120	60	1	10	111,80	3,85	4,66
21	120	30	0	10	88,10	3,26	3,67
22	120	30	2	10	95,15	3,4	3,96
23	120	30	1	0	1,62	109,42	0,07
24	120	30	1	20	107,45	4,57	4,48
25	120	30	1	10	103,10	3,44	4,30
26	120	30	1	10	96,30	5,85	4,01
27	120	30	1	10	109,20	3,62	4,55
28	120	30	1	10	107,50	3,86	4,48

A maior concentração de ácido láctico (139,50 g/L) foi obtida no experimento 14 (180 g/L de sacarose, 45 g/L de extrato de levedura, 0,5 mL de Tween 80 e 15% de inóculo -

Tabela 11) que também possuiu o valor mais alto de produtividade em 24 horas (5,81 g/L/h), porém, a concentração de açúcar residual foi de 45,40 g/L.

De acordo com a Tabela 11, o experimento que apresentou concentrações ótimas tanto para produção de ácido láctico como para açúcar residual e produtividade foi o experimento 20, no qual foi utilizado 120 g/L de sacarose, 60 g/L de extrato de levedura, 1 mL/L de Tween 80 e 10% de inóculo. Nesse experimento foi obtido os valores de 111,80 g/L de L(+)-ácido láctico, 3,85 g/L de açúcar residual e produtividade de 4,66 g/L/h.

No trabalho realizado por Hujanen et al. (2001), a maior concentração de ácido láctico em fermentação em batelada pelo micro-organismo *Lactobacillus casei* NRRL B-441 foi de 118,6 g/L com 74% de rendimento. Esta concentração foi obtida quando foi utilizada 160 g/L de glicose. O melhor rendimento obtido por eles foi de 84% e ocorreu quando a concentração de glicose era de 80 g/L. Já o maior valor de produtividade foi de 4,4 g/L/h em 15 horas e foi obtido com 100 g/L de glicose.

Já Yun, Wee e Ryu (2003) obtiveram concentração máxima de ácido láctico de 185 g/L após 50 horas de fermentação quando a concentração inicial de glicose foi de 200 g/L. Porém, os valores de rendimento e produtividade diminuíram quando o valor de concentração de glicose inicial foi maior que 150 g/L, o que segundo os autores foi devido a inibição pela alta concentração do substrato, uma característica comum de fermentação em batelada. Os valores para rendimento obtidos foram de 0,97; 0,97; 0,96; 0,92 e 0,89 quando os valores de concentração de glicose inicial foram de 50, 100, 150, 200 e 250 g/L, respectivamente. O aumento da concentração inicial de glicose de 200 g/L para 250 g/L ocasionou aumento na concentração de glicose residual, porém o autores não mostram esses dados.

A partir dos dados experimentais, apresentados na Tabela 11, foram feitas as análises de regressão múltipla que geraram as equações de regressão apresentadas abaixo.

Produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus casei* Ke11:

$$Y = 104,02 + 26,24x_1 + 16,89x_2 - 0,21x_3 + 11,40x_4 - 10,73x_1x_1 + 13,31x_1x_2 - 2,26x_1x_3 + 2,46x_1x_4 - 9,75x_2x_2 - 2,52x_2x_3 - 2,14x_2x_4 - 1,42x_3x_3 + 1,16x_3x_4 - 10,69x_4x_4 \quad (3)$$

Açúcar residual da produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei* Ke11:

$$Y = 4,19 + 33,19x_1 - 17,38x_2 - 0,73x_3 - 10,98x_4 + 12,25x_1x_1 - 13,23x_1x_2 - 0,69x_1x_3 - 3,56x_1x_4 + 11,98x_2x_2 - 0,83x_2x_3 + 0,75x_2x_4 - 0,95x_3x_3 - 1,18x_3x_4 + 12,46x_4x_4 \quad (4)$$

Sendo que Y é a resposta predita, que é a concentração de ácido láctico e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são as variáveis codificadas para sacarose, extrato de levedura, Tween 80 e porcentagem de inóculo, respectivamente.

O teste de Fisher foi usado para checar a significância estatística das equações 3 e 4. A Tabela 12 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 ferramenta para verificar a significância de cada um dos coeficientes. Foi estabelecida probabilidade máxima de erro no teste de 5%, desta forma, os parâmetros com valor de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Tabela 12 - Coeficiente do modelo estimado pela regressão linear para a produção de L(+)-ácido lático por *L. casei* Ke11 e açúcar residual.

Produção				
Fator	Coeficiente	Erro padrão	t-valor	P-valor
Intercepto	104,0250	9,594702	10,84192	0,000000
X ₁	26,2362	3,917021	6,69801	0,000015
X ₂	16,8921	3,917021	4,31248	0,000844
X ₃	-0,2112	3,917021	-0,05393	0,957810
X ₄	11,3971	3,917021	2,90963	0,012181
X ₁ ²	-10,7291	3,917021	-2,73909	0,016886
X ₁ X ₂	13,3119	4,797351	2,77484	0,015771
X ₁ X ₃	-2,2581	4,797351	-0,47070	0,645653
X ₁ X ₄	2,4644	4,797351	0,51369	0,616084
X ₂ ²	-9,7466	3,917021	-2,48826	0,027184
X ₂ X ₃	-2,5169	4,797351	-0,52464	0,608665
X ₂ X ₄	-2,1394	4,797351	-0,44595	0,662971
X ₃ ²	-1,4216	3,917021	-0,36292	0,722498
X ₃ X ₄	1,1606	4,797351	0,24193	0,812609
X ₄ ²	-10,6941	3,917021	-2,73015	0,017177
ART Residual				
Fator	Coeficiente	Erro padrão	t-valor	P-valor
Intercepto	4,1925	8,933009	0,46933	0,646610
X ₁	33,1883	3,646886	9,10046	0,000001
X ₂	-17,3767	3,646886	-4,76480	0,000369
X ₃	-0,7275	3,646886	-0,19949	0,844970
X ₄	-10,9858	3,646886	-3,01239	0,009998
X ₁ ²	12,2460	3,646886	3,35795	0,005142
X ₁ X ₂	-13,2262	4,466505	-2,96121	0,011032
X ₁ X ₃	-0,6888	4,466505	-0,15420	0,879818
X ₁ X ₄	-3,5650	4,466505	-0,79816	0,439114
X ₂ ²	11,9785	3,646886	3,28459	0,005921
X ₂ X ₃	-0,8337	4,466505	-0,18667	0,854803
X ₂ X ₄	0,7475	4,466505	0,16736	0,869665
X ₃ ²	-0,9527	3,646886	-0,26124	0,798001
X ₃ X ₄	-1,1775	4,466505	-0,26363	0,796198
X ₄ ²	12,4635	3,646886	3,41758	0,004585

A partir da Tabela 12 observa-se que para o *L. casei* Ke11 as variáveis independentes X_1 (sacarose), X_2 (extrato de levedura) e X_4 (porcentagem de inóculo) tiveram efeito significativo, a interação X_1X_2 , assim como as quadráticas X_1^2 , X_2^2 além da quadrática X_4^2 , também foram significativas tanto para a produção de ácido láctico como para açúcar residual.

O modelo quadrático da superfície de resposta foi determinado na forma de análise de variância (ANOVA) e os resultados estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise de variância do modelo polinomial de segunda ordem.

Produção					
Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p
Regressão	35289,13	14	2520,65	6,84	0,00
Residual	4787,03	13	368,23		
Falta de ajuste	4687,64	10	468,76	14,15	0,03
Erro puro	99,39	3	33,13		
Total	40076,16	27			

$R^2 = 0,88055163$; Ajustado $R^2 = 0,75191493$; $R = 0,93837713$
Ftabelado= 2,554

ART Residual					
Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p
Regressão	48195,83	14	3442,56	10,78	0,00
Residual	4149,53	13	319,19		
Falta de ajuste	4145,78	10	414,58	331,50	0,00
Erro puro	3,75	3	1,25		
Total	52345,36	27			

$R^2 = 0,92072784$; Ajustado $R^2 = 0,83535783$; $R = 0,95954564$
Ftabelado= 2,554

No quadro de ANOVA do modelo de regressão quadrático para os dados de produção observa-se que o modelo é significativo, como é evidente pelo teste de Fisher, teste-F ($F_{calc}(14,13) = 6,845260 > F_t(14,13) = 2,554$ e tem valor de probabilidade muito baixo ($p < 0,000664$). 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 (0,88) indica que 88 % da variabilidade dos dados foram explicados pela equação. O coeficiente de determinação ajustado ($R^2 = 0,75$) também foi satisfatório para confirmar a significância do modelo.

Com relação ao quadro de ANOVA para os dados de ART Residual observa-se que o modelo também foi significativo, teste-F ($F_{calc}(14,13) = 10,78514 > F_t(14,13) = 2,554$ e tem

valor de probabilidade muito baixo ($p < 0,000058$). 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 (0,92) indica que 92% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo. O coeficiente de determinação ajustado ($R^2 = 0,83$) também foi satisfatório.

A Figura 6 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero da produção de L(+)-ácido láctico e do açúcar residual e a Figura 7 o gráfico de valores predito em função dos observados de ambos os dados. Observa-se que tanto para os dados de produção de L(+)-ácido láctico quanto para os dados de açúcar residual a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a tendência constante e a distribuição normal dos mesmos.

Figura 6 - Distribuição dos resíduos relativos à produção de ácido láctico (A) e ao açúcar residual (B).

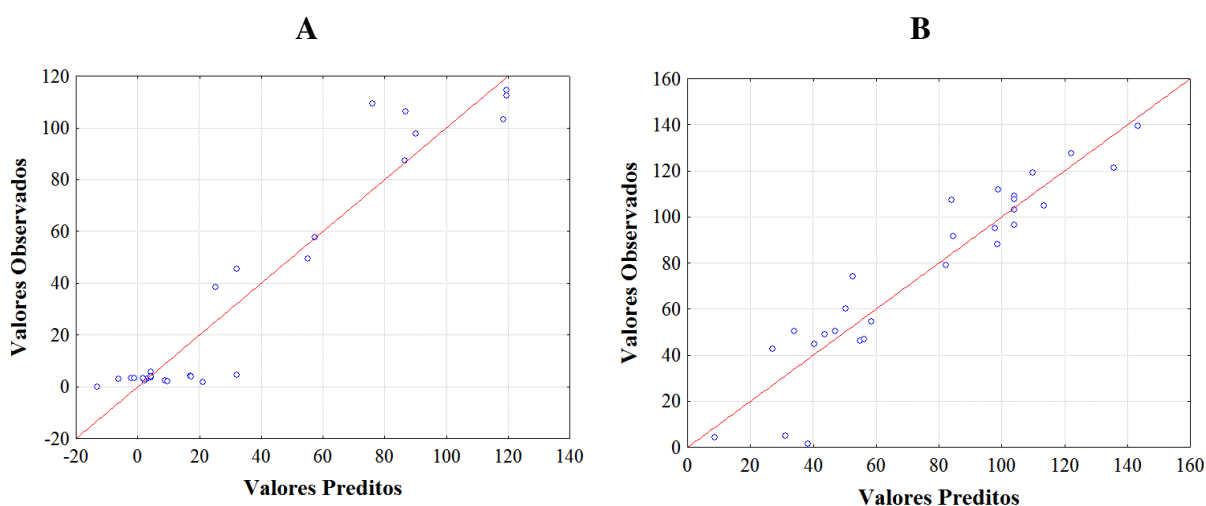
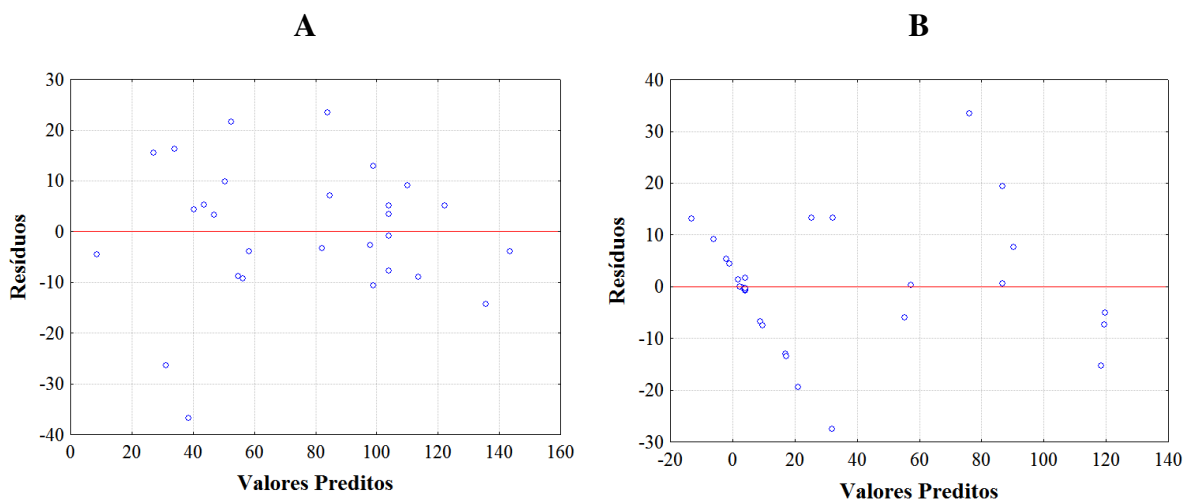


Figura 7 - Valores preditos em função dos observados relativos à produção de ácido láctico (A) e ao açúcar residual (B).



A partir da equação de regressão 3 foram construídas as superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas nas figuras 8, 9 e 10 que ajudam a entender as interações das variáveis sacarose (X_1), extrato de levedura (X_2) e porcentagem de inóculo (X_4) na produção de ácido láctico pelo micro-organismo *L. casei* Ke11, que auxiliam na localização da região ótima de cada variável para a máxima resposta.

Figura 8 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e extrato de levedura (X_2).

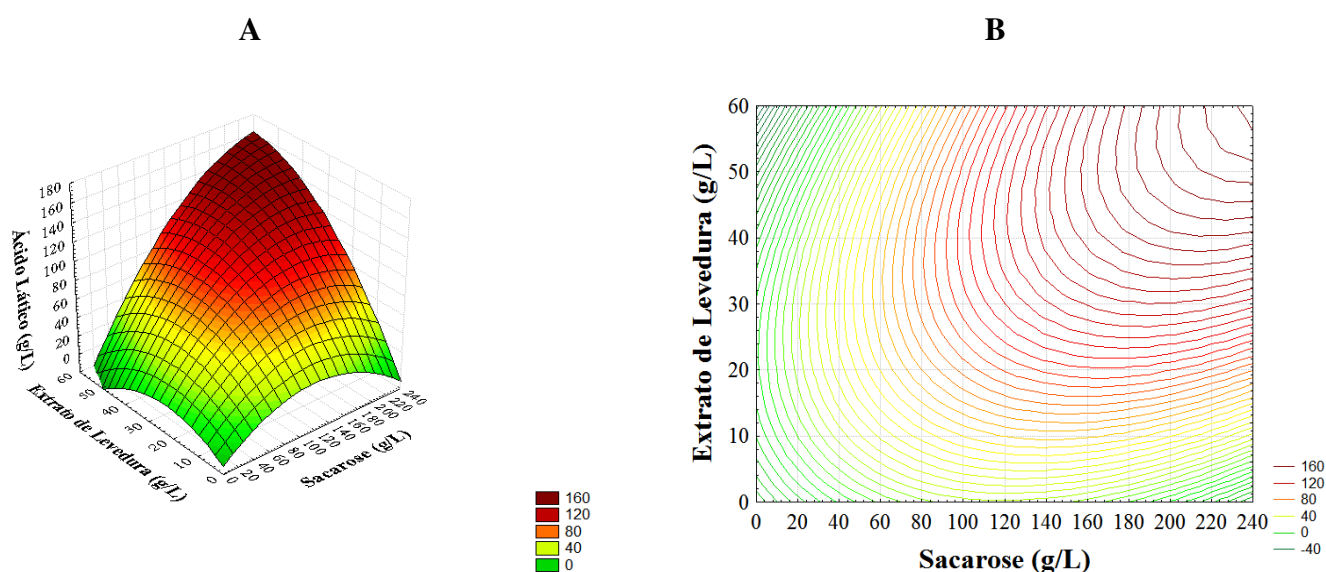


Figura 9 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e porcentagem de inóculo (X_4).

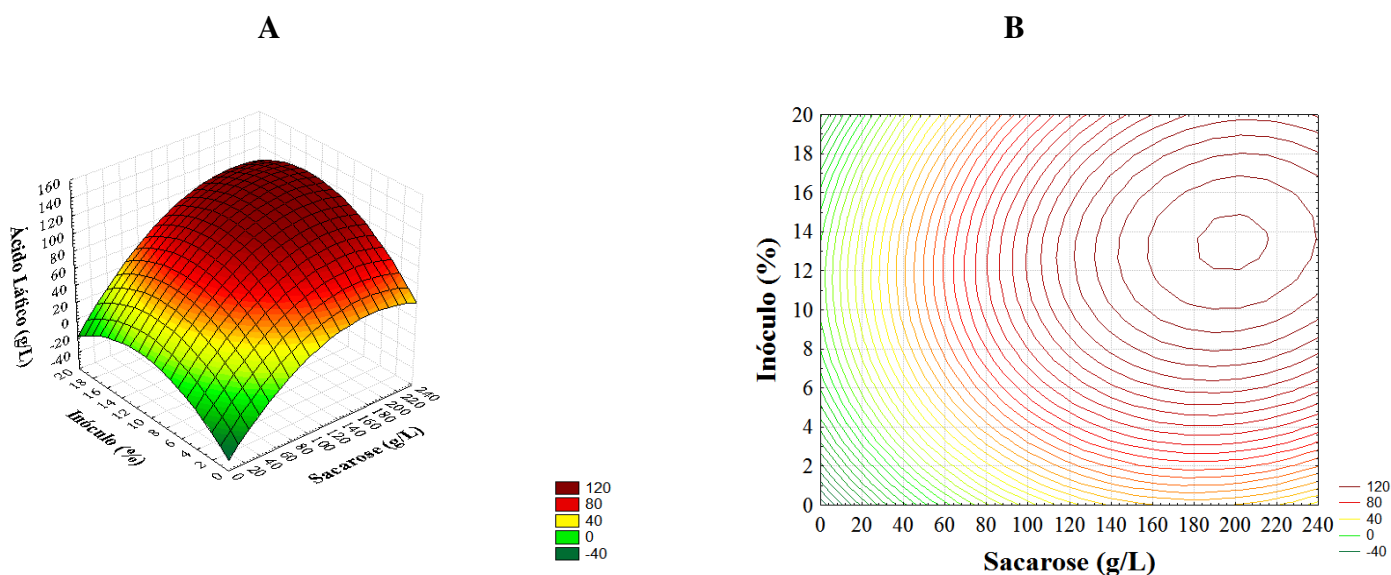
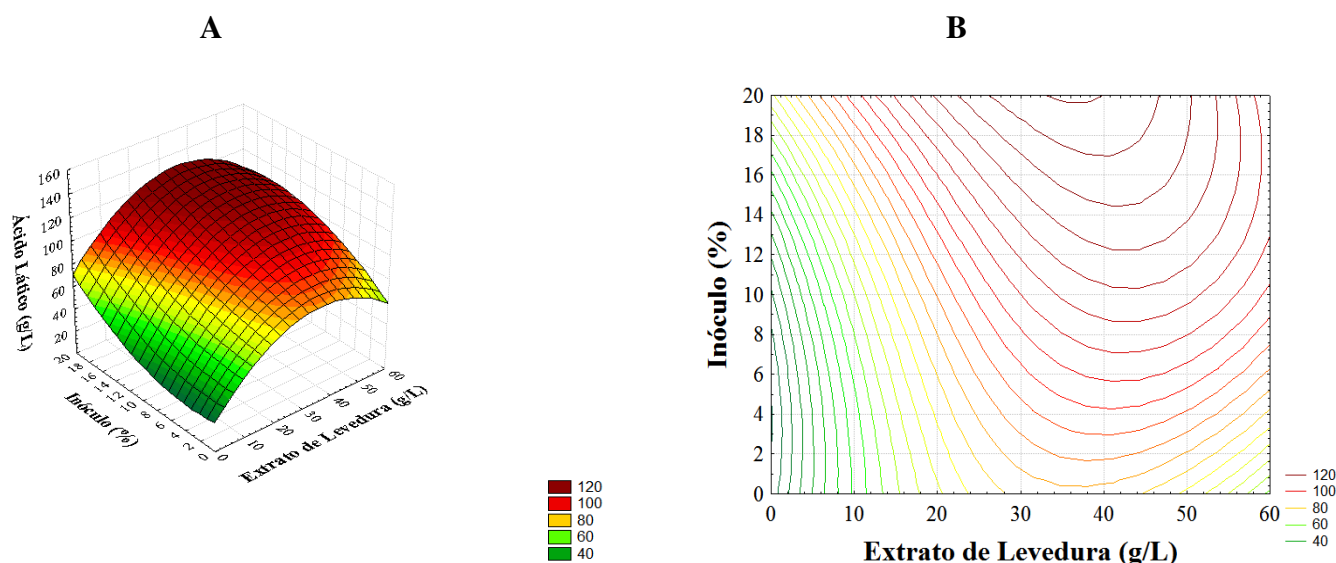


Figura 10 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* Ke11, como uma função das variáveis: extrato de levedura (X_2) e porcentagem de inóculo (X_4).



Observando-se a Figura 8, pode-se concluir que quando a concentração de sacarose aproximou-se de 240 g/L e a concentração de extrato de levedura aproximou-se de 60g/L, maior foi a concentração de L(+)-ácido láctico produzido. Já a Figura 9 mostra que a concentração ótima de sacarose para a produção de ácido láctico está entre 180 e 220 g/L e a porcentagem de inóculo ideal está entre 10 e 16%.

Estudos da cinética de produção do ácido láctico mostram que a concentração final de ácido láctico aumenta com o aumento da concentração inicial de glicose até concentrações de 200 g/L (GONÇALVES et al., 1991; KADAM et al., 2006; YUN; WEE; RYU, 2003).

Na Figura 10 pode ser visualizado que para maior produção de ácido láctico a concentração ideal de extrato de levedura está entre 30 e 50 g/L e a porcentagem de inóculo entre 10 e 20%.

A partir da equação de regressão 4 foram construídas as superfícies de resposta para o açúcar residual (ART residual) na produção de ácido láctico pelo micro-organismo *L. casei* Ke11. Essas superfícies de resposta estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13 e ajudam a entender as interações das variáveis sacarose (X_1), extrato de levedura (X_2) e porcentagem de inóculo (X_4) no açúcar residual na produção de ácido láctico, além de auxiliar na localização da região ótima de concentração de cada variável para a máxima resposta.

Figura 11 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o açúcar residual (ART residual) na produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e extrato de levedura (X_2).

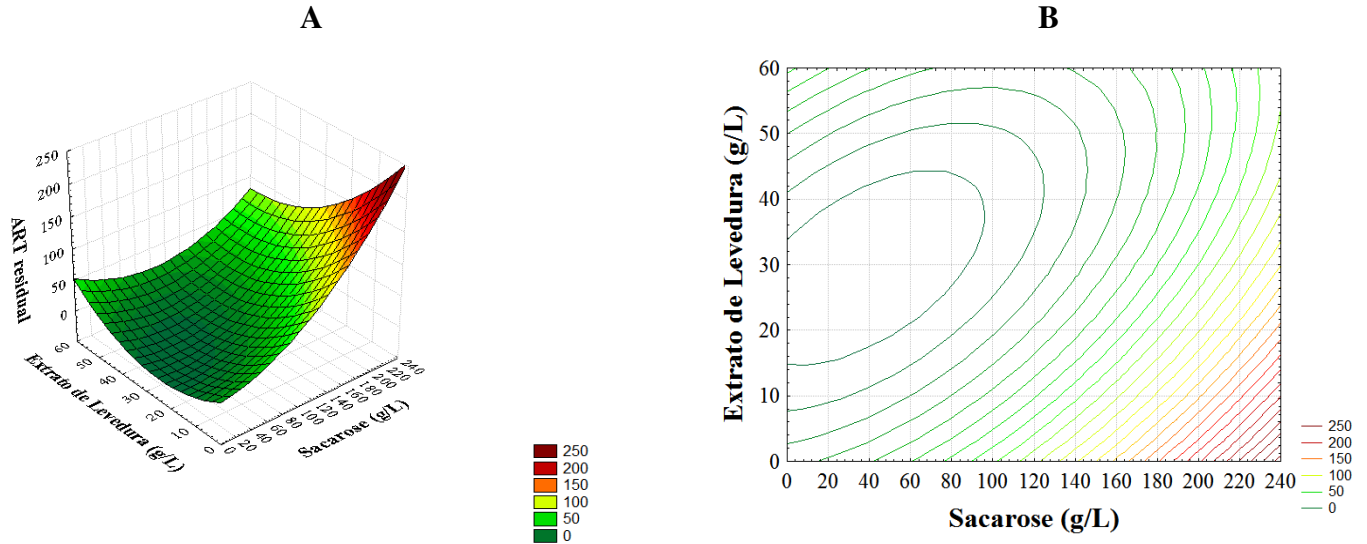


Figura 12 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o açúcar residual (ART Residual) na produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* Ke11, como uma função das variáveis: sacarose (X_1) e porcentagem de inóculo (X_4).

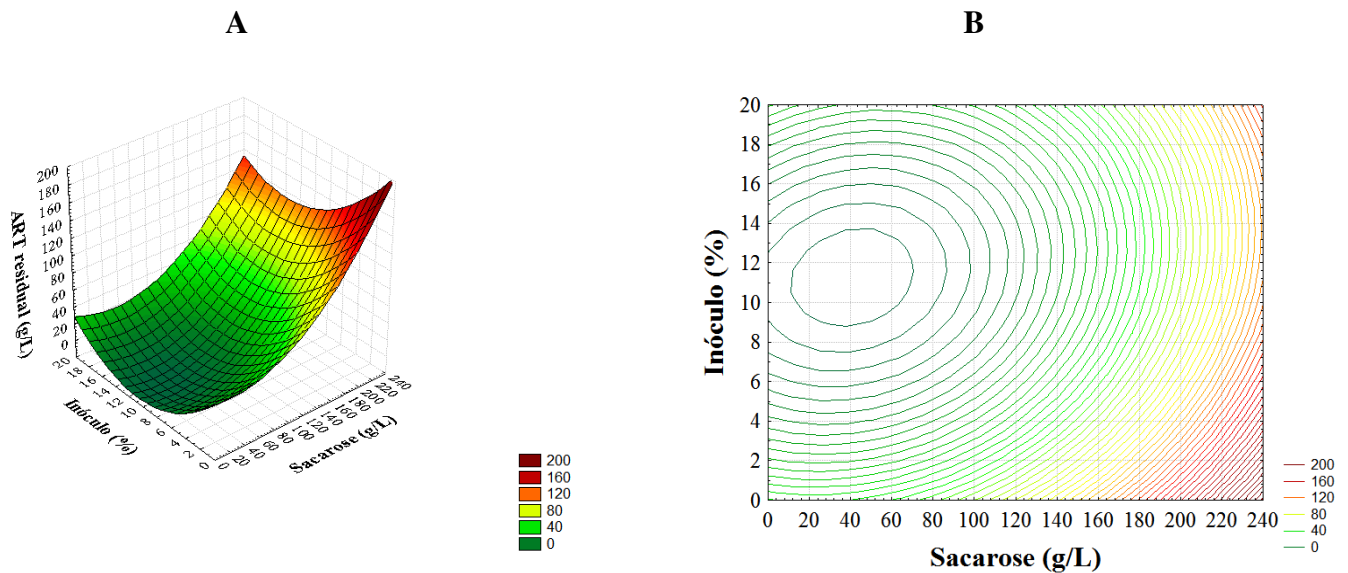
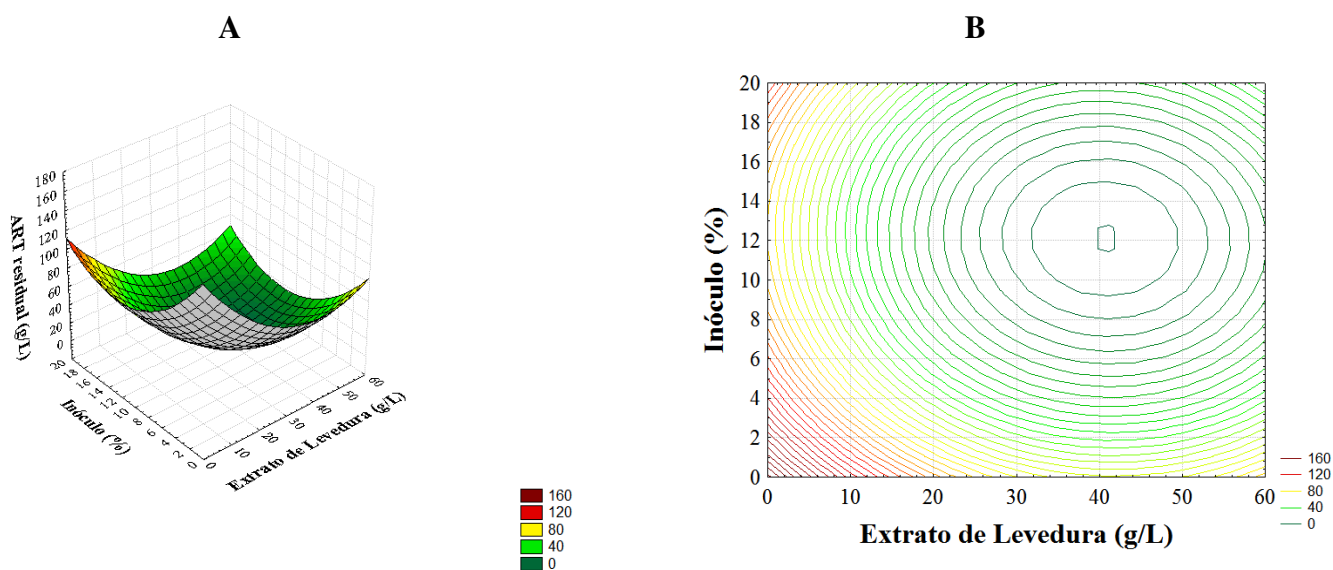


Figura 13 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o açúcar residual (ART Residual) na produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* Ke11, como uma função das variáveis: extrato de levedura (X_2) e porcentagem de inóculo (X_4).



A Figura 11 mostra que para que haja menos açúcar residual no meio a concentração do extrato de levedura deve estar entre 10 e 40 g/L e a concentração de sacarose deve ser de até 120 g/L. Quando compara-se a interação entre porcentagem de inóculo e concentração de sacarose (Figura 12), o inóculo deve estar entre 8 e 14% enquanto a concentração de sacarose deve ser também de até 120 g/L. Comparando-se a interação entre concentração de extrato de levedura e porcentagem de inóculo (Figura 13), tem-se que o primeiro deve ter concentração entre 30 e 50 g/L e a porcentagem de inóculo deve estar entre 8 e 16%.

Com estes dados e considerando que uma ótima fermentação deve apresentar concentração máxima de ácido láctico e concentração mínima para açúcar residual, os parâmetros escolhidos foram de 120 g/L de sacarose, 40 g/L de extrato de levedura e 10% de inóculo. Como o Tween 80 não foi uma variável significativa para produção, produtividade e rendimento de ácido láctico, ele não foi adicionado ao meio otimizado.

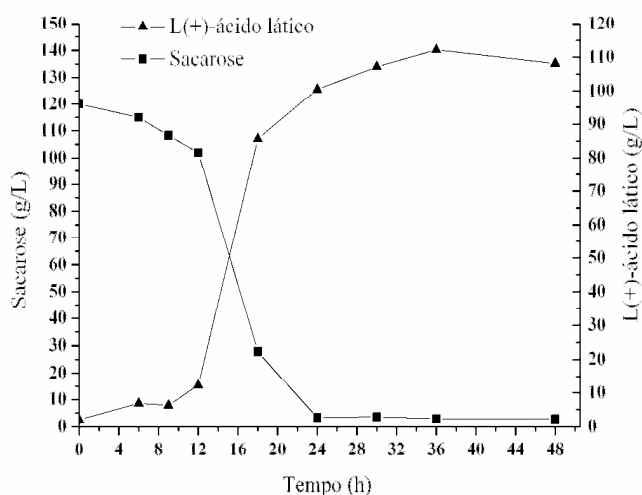
5.5 Validação do ponto escolhido como ótimo e cinética da fermentação em *shaker*

Após a obtenção dos melhores parâmetros para a produção de ácido láctico e concentração de açúcar residual no Planejamento Composto Central, realizou-se uma

fermentação em *shaker* para a confirmação desses resultados. Foi feita, também, a cinética dessa fermentação, com o objetivo de se visualizar o comportamento do micro-organismo *L. casei* Ke11 em relação à produção de L(+)-ácido láctico e ao consumo do açúcar ao longo do tempo.

A Figura 14 mostra o gráfico da cinética da fermentação realizada em *shaker* utilizando-se os parâmetros nos quais foram obtidos os melhores resultados no Planejamento Composto Central (120 g/L de sacarose, 40 g/L de extrato de levedura e 10% de inóculo).

Figura 14 - Cinética da produção de L(+)-ácido láctico e consumo do açúcar por *L. casei* Ke11 em fermentação em *shaker* a 35°C, 150 rpm.



Como pode ser visualizado na Figura 14, em 12 horas o *L. casei* Ke11 inicia a fase exponencial de produção de ácido láctico.

A produção total de L(+)-ácido láctico em 48 horas foi de 108,15 g/L, mas a maior concentração de ácido láctico foi obtida no tempo de 36 horas (112,15 g/L). Assim, pode-se observar que quando há esgotamento da fonte de carbono o micro-organismo passa a consumir o ácido láctico.

O rendimento nessa fermentação foi de 0,89 ou 89% e a concentração do açúcar residual foi de 2,75 g/L. A produtividade em 24 horas foi de 4,19 g/L/h, porém, a maior produtividade ocorreu no tempo de 18 horas e foi de 4,76 g/L/h. HUIJANEN et al. (2001), utilizando 160 g/L de glicose obtiveram, utilizando o micro-organismo *L. casei* NRRL B-

441, produção de 118,6 g/L de ácido láctico com um rendimento de 74%. O maior valor de produtividade obtido por eles foi de 4,4 g/L/h em 15 horas, utilizando 100 g/L de glicose.

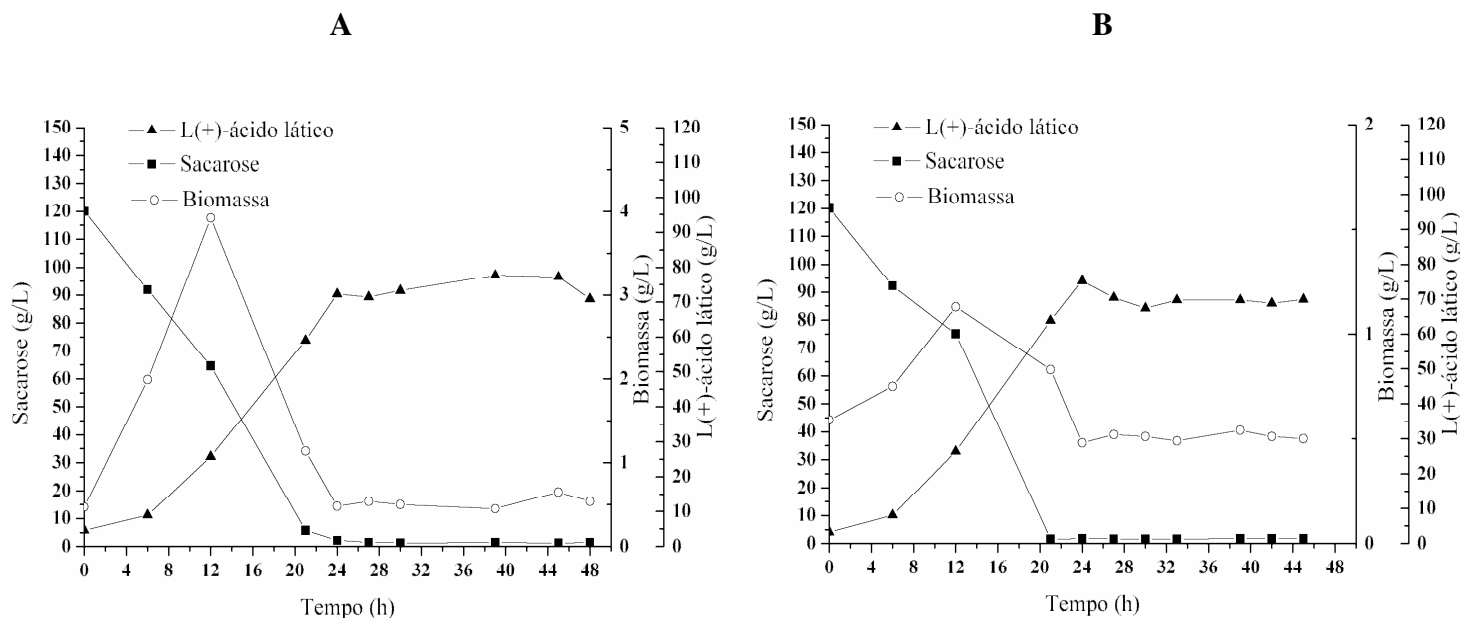
O maior valor de velocidade instantânea de produção de ácido láctico ocorreu no intervalo de tempo entre 12 e 18 horas e o valor obtido foi de 12,22 g/L/h. A maior velocidade instantânea de consumo da sacarose também ocorreu neste mesmo intervalo de tempo e o valor obtido foi de 12,35 g/L/h. O fato de as velocidades instantâneas de produção e consumo do substrato ocorrerem no mesmo intervalo de tempo pode indicar que o micro-organismo consumiu o açúcar para a produção de ácido láctico. A partir do tempo de 36 horas pode ser visualizado um pequeno declínio na concentração de ácido láctico.

Com esses dados, foi possível a posterior análise dos efeitos da alimentação em batelada alimentada em reator utilizando o micro-organismo *L. casei* Ke11 e o meio otimizado.

5.6 Batelada em reator

Com a confirmação do ponto escolhido como ótimo e construção da cinética de produção e consumo do substrato em *shaker*, foi possível realizar a batelada em reator. A cinética de produção de L(+)-ácido láctico, consumo do açúcar e crescimento do micro-organismo para os meios com controle de pH com NaOH 10N foram obtidas. As fermentações em que o pH foi controlado por CaCO_3 foram avaliados apenas a cinética da produção de ácido láctico e consumo do substrato. As cinéticas destas fermentações podem ser visualizadas na Figura 15.

Figura 15 - Cinética da produção de ácido láctico, consumo de açúcar e crescimento do *L. casei* Ke11 em reator de 0,5 L por batelada utilizando NaOH 10 N para o controle do pH. Concentração inicial de açúcar 120 g/L e ausência de sais do meio MRS (A) e presença dos sais do meio MRS (B).



A Figura 15 mostra que os perfis da cinética de produção de L(+)-ácido láctico, consumo do açúcar e crescimento do *L. casei* Ke11 para ambos os ensaios foi semelhante. Em ambas fermentações a concentração máxima para biomassa foi obtido em 12 horas, a partir daí o micro-organismo já inicia sua fase de declínio. Porém, quando não houve adição dos sais foi obtido maior concentração de biomassa (3,92 g/L - Figura 15-A), comparado com a concentração obtida quando os sais foram adicionados (1,13 g/L – Figura 15-B). Ou seja, a concentração de biomassa teve aumento de 3,47 vezes quando os sais do meio MRS não foram adicionados ao meio de fermentação.

Pode-se observar que a concentração de biomassa decresce depois de 12 horas de fermentação, enquanto a concentração de L(+)-ácido láctico aumenta exponencialmente até 24 horas de fermentação, mostrando que o crescimento do micro-organismo e a produção de L(+)-ácido láctico estão parcialmente associados. No início da fermentação a produção de L(+)-ácido láctico está associada ao crescimento do micro-organismo, mas depois a concentração de biomassa começa a diminuir e a concentração de L(+)-ácido láctico ainda aumenta. O desacoplamento do crescimento do micro-organismo e produção de ácido láctico pode ser visto no trabalho de Gonçalves et al. (1991), no qual o valor de concentração máxima de células foi obtido quando a concentração inicial de glicose foi de 100 g/L, sendo

que a concentração de células diminuiu com valores de concentração inicial de glicose acima desse valor. Já a concentração máxima de ácido láctico (140 g/L) foi obtido quando a concentração inicial de açúcar foi de 200 g/L.

O mesmo ocorreu no trabalho de Yun, Wee e Ryu (2003) a concentração de massa seca celular aumentou até concentração de glicose de 100 g/L, sendo que a partir desse valor de concentração a concentração de massa seca começou a diminuir. A concentração máxima de massa seca celular (19,4 g/L) ocorreu quando a concentração inicial de glicose foi de 100 g/L. Já a concentração máxima de ácido láctico (185 g/L) foi obtida quando a concentração inicial de glicose foi de 200 g/L.

Os perfis das cinéticas das fermentações em batelada com controle do pH feito por adição de CaCO_3 podem ser visualizados na Figura 16 e Tabela 14.

Figura 16 - Cinética da produção de L(+)-ácido láctico, consumo de açúcar e crescimento do *L. casei* Ke11 em reator de 0,5 L por batelada utilizando CaCO_3 para o controle do pH. Concentração inicial de açúcar de 120 g/L e ausência de sais do meio MRS (A) e presença dos sais do meio MRS (B).

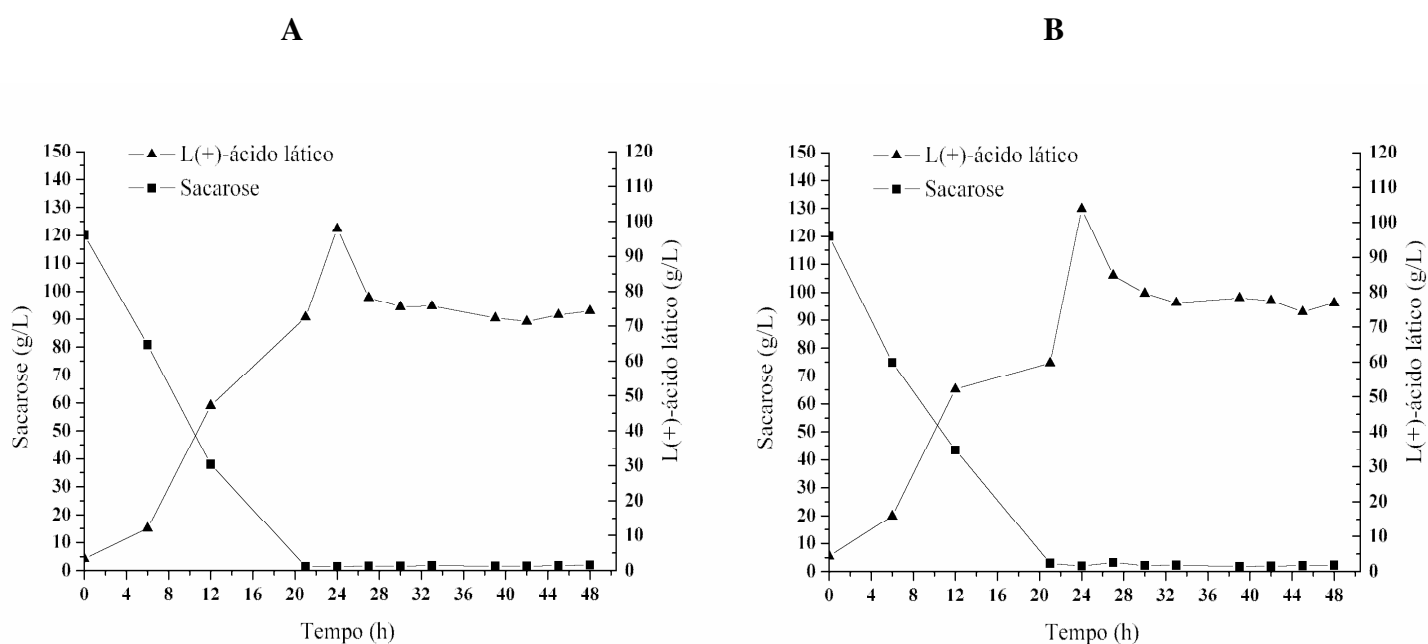


Tabela 14 - Valores das cinéticas obtidos nas fermentações em batelada com controle do pH feito por NaOH, CaCO₃ com e sem adição dos sais do meio MRS.

Experimento	B* (g/L)	AL (g/L)	Prod (g/L/h)	γ (%)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$	μ_x (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)
Batelada com controle de pH feito por NaOH sem adição de sais	3,92	77,7	2,82	62	0,06	6,1	0,21	5,43	3,81
Batelada com controle de pH feito por NaOH com adição de sais	1,13	75,2	3,0	61	0,01	42,78	0,07	5,75	8,34
Batelada com controle de pH feito por CaCO ₃ sem adição de sais	-	97,9	3,94	80	-	-	-	8,5 (inst)	7,1 (inst)
Batelada com controle de pH feito por CaCO ₃ com adição de sais	-	103,9	4,15	84	-	-	-	14,7 (inst)	7,52 (inst)

*B: biomassa

AL: L(+)-ácido láctico

Prod: produtividade

γ : rendimento ($Y_{p/s}$)

$Y_{x/s}$: conversão de substrato em biomassa

$Y_{p/x}$: conversão de biomassa em produto

μ_x : velocidade específica de crescimento do micro-organismo *L. casei* Ke11

μ_p : velocidade específica de produção de L(+)-ácido láctico

μ_s : velocidade específica de consumo da sacarose

inst: velocidades instantâneas

De acordo com a Tabela 14 é possível observar que as maiores concentrações de L(+)-ácido láctico foram obtidas após 24 horas de fermentação, quando o CaCO₃ foi utilizado como controlador do pH: 97,9 g/L de L(+)-ácido láctico quando os sais do meio MRS não foram adicionados (Figura 16-A) e 103,9 g/L de L(+)-ácido láctico quando os sais foram adicionados (Figura 16-B).

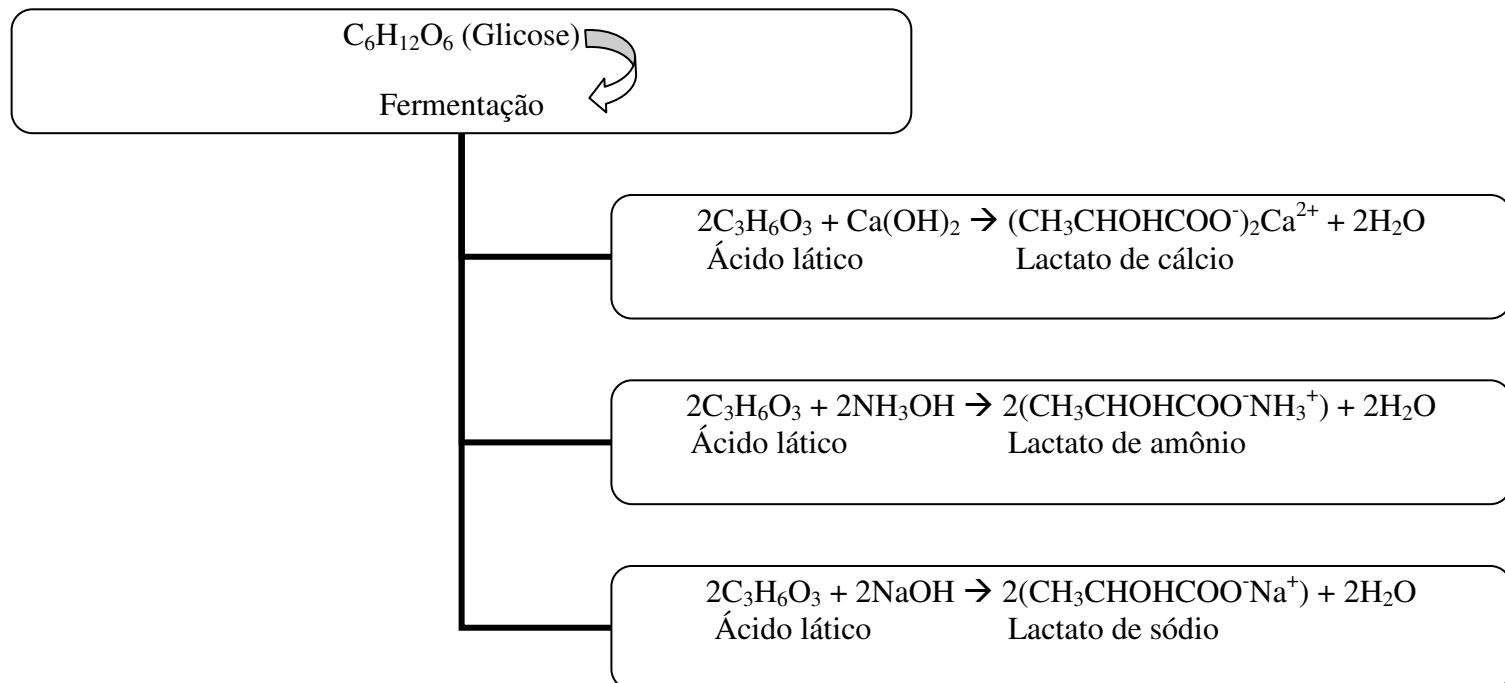
Nakano, Ugwu e Tokiwa (2012) estudaram os efeitos de Ca(OH)₂, NH₄OH e NaOH como agentes neutralizantes para a recuperação eficiente do ácido láctico produzido a partir de arroz quebrado em processo simultâneo de sacarificação e fermentação (SSF), utilizando o micro-organismo *Lactobacillus delbrueckii*. No trabalho destes autores, o consumo da glicose derivada do arroz quebrado e o crescimento celular foram maiores quando Ca(OH)₂ foi utilizado para controle do pH. Segundo os autores, a molaridade do lactato no meio de fermentação é menor quando Ca(OH)₂ é utilizado e isso resulta em alta produtividade do ácido láctico. Além disso, cátions divalentes (Ca²⁺) são mais eficientes na neutralização em meios de cultivo quando comparados a cátions monovalentes (Na⁺ e NH₄³⁺) (NAKANO; UGWU; TOKIWA, 2012).

Segundo Giraud, Lelong e Raimbault (1991), o crescimento das bactérias lácticas é normalmente inibido por acúmulo de lactato. Esta inibição pode ser explicada pelo colapso da membrana celular do micro-organismo devido a alteração no seu potencial, a acidificação do citosol ou devido ao acúmulo de ânions dentro da célula (AXE; BAILEY, 1995; HARTKE et al., 1996).

Segundo alguns autores como Senthuran et al. (1999) e Timbuntan, Sriroth e Tokiwa (2006), substâncias solúveis em altas concentrações provocam efeitos diversos na fermentação de ácido láctico.

A Figura 17 mostra os lactatos formados quando a glicose é utilizada como fonte de carbono com diferentes agentes neutralizantes. Como pode ser visualizado, quando Ca(OH)_2 é utilizado, 1M de lactato de cálcio composto por dois íons lactatos e um cátion de cálcio é formado a partir de 2M de ácido láctico e 1M de glicose. Quando NH_4OH é utilizado como agente neutralizante, 2M de lactato de amônio composto por um íon lactato e um cátion de amônio é obtido a partir de 2M de ácido láctico e 1M de glicose. Já quando NaOH é utilizado, 2M de lactato de sódio composto por um íon lactato e um cátion de sódio é formado a partir de 2M de ácido láctico e 1M de glicose. Conclui-se assim que a molaridade do lactato de cálcio é menor do que a molaridade do lactato de amônio e do lactato de sódio (NAKANO; UGWU; TOKIWA, 2012).

Figura 17 - Esquema da formação do lactato por $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH e NaOH em uma homofermentação de glicose por *Lactobacillus debruekii*.



Fonte: adaptado de Nakano, Ugwu e Tokiwa (2012, p. 793)

Porém, de acordo com o trabalho de Buyukkileci (2000), no qual foi analisada a capacidade neutralizante de NaOH e de CaCO_3 na produção de ácido láctico pelo micro-organismo *Lactobacillus casei* NRRL B-441, o NaOH foi mais eficiente na produção de ácido láctico do que o CaCO_3 e a produtividade foi 33% maior quando o primeiro foi utilizado. O autor explica que quando o CaCO_3 foi utilizado o pH do meio caiu para 5 em 12 horas de fermentação e permaneceu neste valor até o final da fermentação, assim, a produção ineficaz de ácido láctico em pH 5 pelo micro-organismo utilizado poderia ser a razão pela baixa produtividade obtida quando CaCO_3 foi utilizado.

Entre as bateladas com controle de pH feito por NaOH (Figura 15) a maior velocidade específica máxima de produção foi obtida quando houve adição dos sais do meio MRS, ocorreu entre 21 e 24 horas e foi de $5,75 \text{ h}^{-1}$. A velocidade específica máxima de consumo do substrato também ocorreu nesta fermentação e foi de $8,34 \text{ h}^{-1}$ entre 12 e 21 horas.

Já a velocidade específica de crescimento foi maior na fermentação sem adição dos sais do meio MRS, ocorreu entre 0-6 horas de fermentação e foi de $0,21 \text{ h}^{-1}$, três vezes maior

do que o valor obtido na fermentação em que os sais do meio MRS foram adicionados ao meio.

Nas bateladas com controle do pH por CaCO_3 a maior velocidade máxima instantânea para produção e consumo de substrato foram obtidos quando os sais do meio MRS foram adicionados (Figura 16-B) e foram de 14,70 g/L/h entre 21-24 horas e 7,52 g/L/h entre 0-6 horas de fermentação, respectivamente.

O rendimento e a produtividade também foram maiores na fermentação com controle de pH feito por CaCO_3 com adição dos sais do meio MRS e foram de 84% e 4,15 g/L/h, respectivamente (Figura 16-B).

5.7 Batelada alimentada

Os perfis da cinética de produção de L(+)ácido láctico, consumo de açúcar e crescimento do *L. casei* Ke 11 obtidos nas fermentações em batelada alimentada podem ser visualizados na Figura 18 e Tabela 15.

Figura 18 - Cinética da produção de L(+)-ácido láctico, consumo de açúcar e crescimento do *L. casei* Ke11 em reator de 0,5 L em fermentação em batelada alimentada por pulso com valor de concentração inicial de açúcar de 80 g/L (A) e 120 g/L (B), batelada alimentada por fluxo constante com valor de concentração inicial de açúcar de 80 g/L (C) e 120 g/L (D).

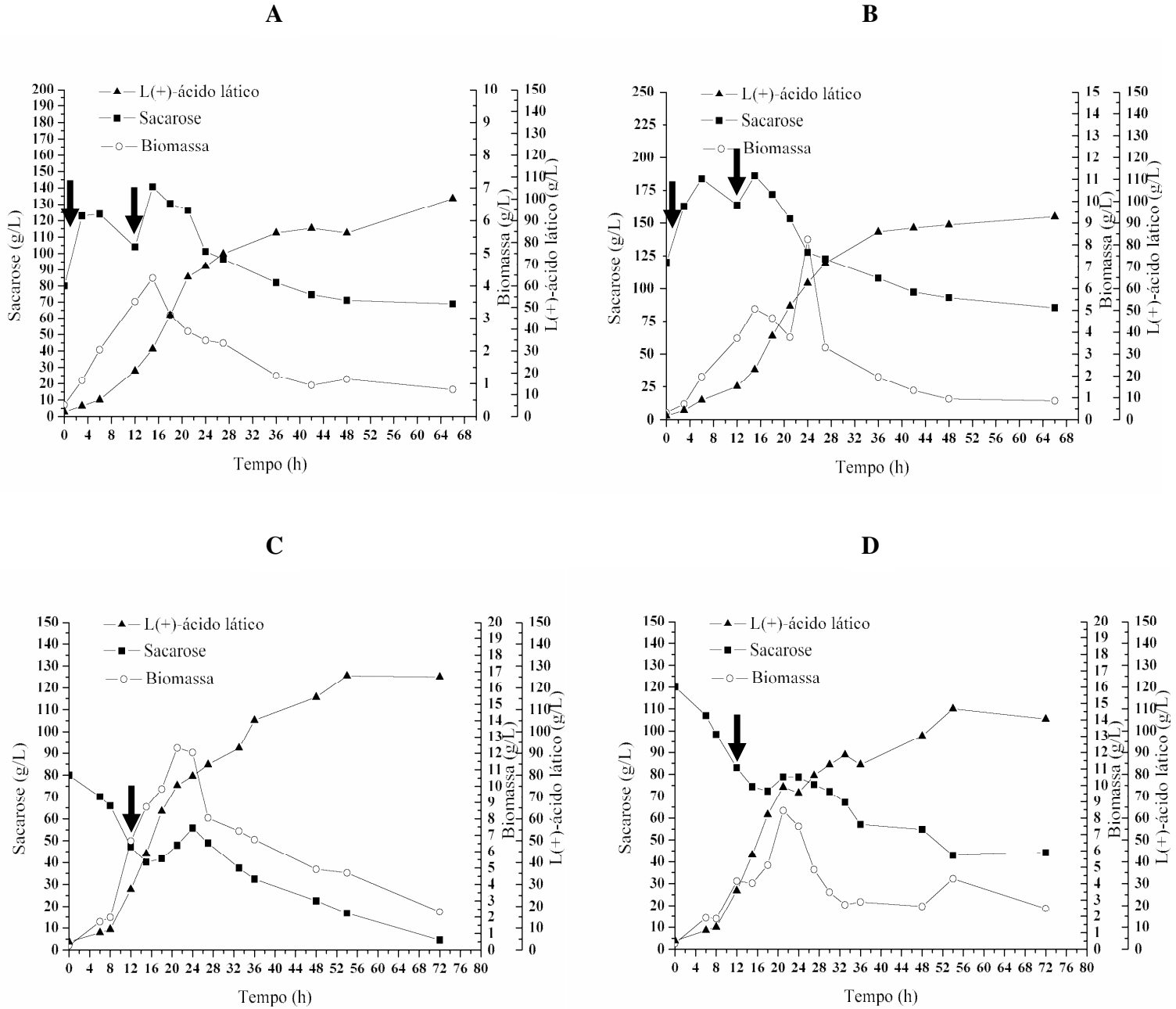


Tabela 15 – Parâmetros cinética obtidos nas fermentações em batelada alimentada por pulso e por fluxo constante com valor de concentração inicial de açúcar de 80 e 120 g/L.

Experimento	B* (g/L)	AL (g/L)	Prod (g/L/h)	γ (%)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$	μ_x (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)
Batelada alimentada por pulso com açúcar inicial de 80 g/L	4,24	100,15	3,05	84	0,09	7,4	0,34	2,07
Batelada alimentada por pulso com açúcar inicial de 120 g/L	8,25	92,82	2,66	70	0,09	7,66	0,31	1,59
Batelada alimentada por fluxo constante com açúcar inicial de 80 g/L	12,32	125,53	3,59	91	0,12	5,95	0,27	1,07
Batelada alimentada por fluxo constante com açúcar inicial de 120 g/L	8,45	110	3,54	76	0,07	8,7	0,23	1,40

*B: biomassa

AL: L(+)-ácido lático

Prod: produtividade

γ : rendimento ($Y_{p/s}$)

$Y_{x/s}$: conversão de substrato em biomassa

$Y_{p/x}$: conversão de biomassa em produto

μ_x : velocidade específica de crescimento do micro-organismo *L. casei* Ke11

μ_p : velocidade específica de produção de L(+)-ácido lático

μ_s : velocidade específica de consumo do açúcar

Na Tabela 15 acima pode-se observar que a maior concentração de L(+)-ácido lático foi de 125,53 g/L e ocorreu após 54 horas de fermentação, quando esta foi alimentada por fluxo constante de 5 mL/hora e a concentração inicial de açúcar no meio foi de 80 g/L (Figura 18-C), seguida pela concentração obtida na batelada alimentada por fluxo constante de 5 mL/hora, em que a concentração inicial de açúcar foi de 120 g/L (110 g/L após 54 horas de fermentação – Figura 18-D).

A menor concentração de L(+)-ácido lático foi obtida na fermentação em batelada alimentada por pulso com concentração inicial de açúcar de 120 g/L e foi de 92,82 g/L após 66 horas de fermentação (Figura 18-B). Quando a concentração inicial de açúcar foi de 80 g/L o a concentração de ácido lático teve um aumento de 7,9% (100,15 g/L – Figura 18-A). O perfil de crescimento do micro-organismo nessas duas fermentações foi similar até 24 horas, quando a fermentação com concentração inicial de açúcar de 120 g/L apresentou um pico de concentração de biomassa de 8,25 g/L. Porém após 24 horas a concentração de biomassa começou a decrescer novamente.

A maior concentração de biomassa (12,32 g/L) e rendimento (91%) foram observados na fermentação em batelada alimentada por fluxo constante com concentração inicial de açúcar de 80 g/L, em 21 horas de fermentação.

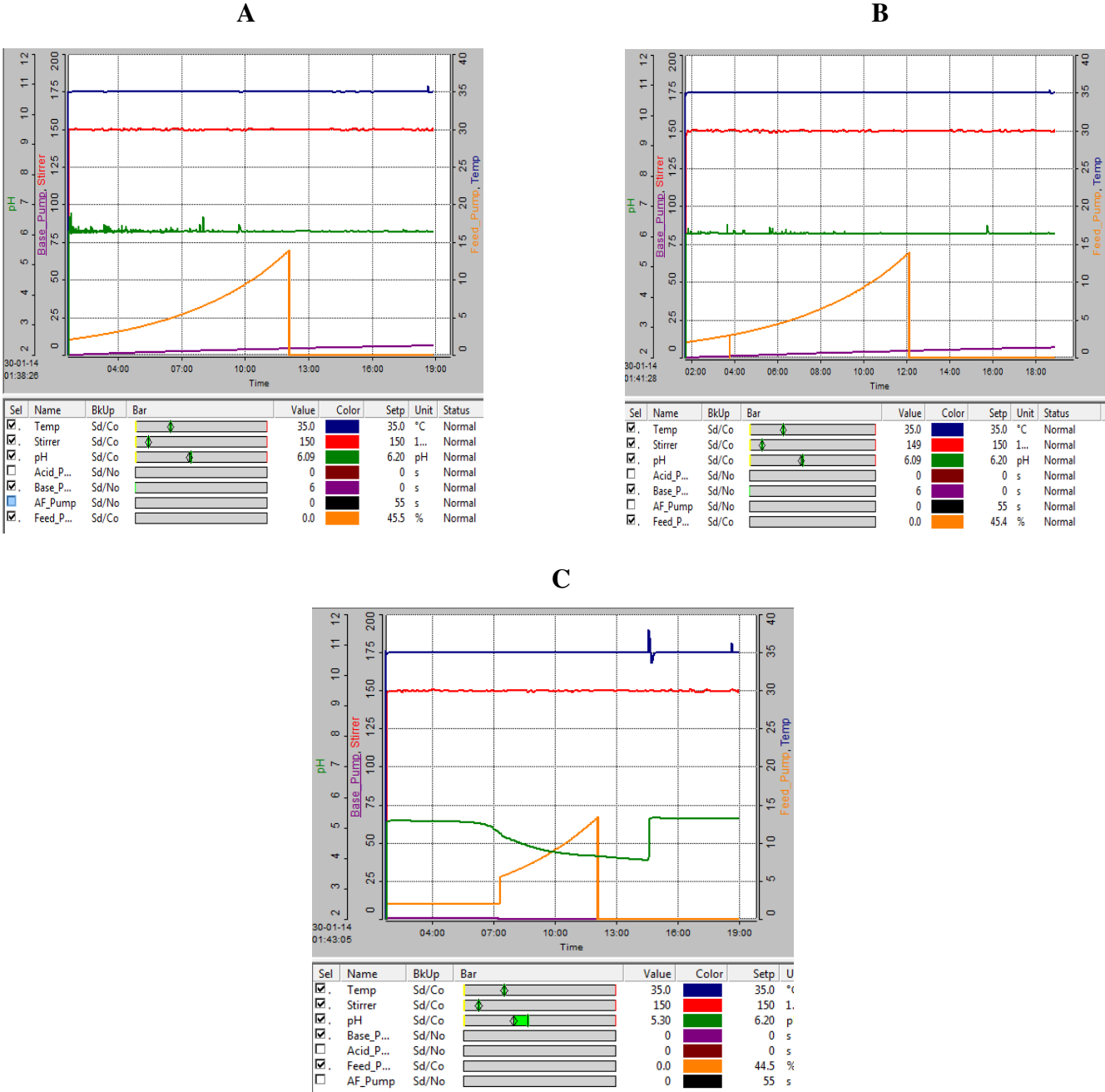
Quando se compara as fermentações alimentadas por fluxo constante (Figuras 18-C e 18-D), pode-se observar que o micro-organismo cresceu mais (45,80% a mais) quando a concentração inicial de açúcar no meio era de 80 g/L (Figura 18-C), sugerindo que possa ter ocorrido inibição do crescimento do micro-organismo pelo substrato na fermentação em que se utilizou 120 g/L de açúcar, além disso, a concentração de açúcar ao longo dessa fermentação foi mantida alta, o que ocasionou também alta concentração de açúcar residual no final da fermentação (44,22 g/L), enquanto que com 80 g/L de açúcar observou-se valor de açúcar residual de apenas 4,51 g/L.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que quando a concentração inicial de açúcar foi maior (120 g/L), menor foi a concentração de L(+)-ácido láctico e quando a concentração inicial de açúcar foi menor (80 g/L), maior foi a concentração de ácido láctico, indicando não necessariamente inibição do crescimento mas inibição da produção do ácido láctico pelo açúcar.

O maior valor para máxima velocidade específica de produção de ácido láctico foi obtido na fermentação em batelada alimentada por pulso com concentração inicial de açúcar de 80 g/L (Figura 18-A), que ocorreu entre 18 e 21 horas de fermentação e foi de $2,07 \text{ h}^{-1}$. O maior valor para velocidade máxima específica de crescimento do micro-organismo também foi obtido nessa fermentação e ocorreu logo no início da fermentação, entre 0 e 3 horas e foi de $0,34 \text{ h}^{-1}$. Após 15 horas de fermentação a concentração de biomassa começou a decrescer enquanto a concentração de ácido láctico continuou a aumentar sugerindo novamente que o crescimento do micro-organismo e formação do produto são parcialmente associados.

Os parâmetros estipulados e os fluxos de alimentação das fermentações em batelada alimentada exponencial com fluxo controlado por software podem ser visualizados na Figura 19.

Figura 19 - Monitoramento dos parâmetros e do fluxo de alimentação nas bateladas alimentadas exponenciais feito por software. A: Batelada alimentada exponencial com pH controlado somente por NaOH 10N; B: Batelada alimentada exponencial com pH controlado por NaOH e CaCO₃ e C: Batelada alimentada exponencial com pH controlado por CaCO₃.



A Figura 19 mostra os parâmetros temperatura em azul, agitação em vermelho, pH em verde e fluxo de alimentação em laranja durante a alimentação. Pode-se observar na Figura 19-C o perfil do fluxo de alimentação, que foi constante (2%) durante 6 horas de alimentação (de 12 a 18 horas de fermentação) e depois foi exponencial (de 18 a 24 horas de fermentação).

Em 26 horas de fermentação foi observado que o pH estava muito baixo (3,93), então foram adicionados 40 mL de solução de CaCO_3 com concentração de 500 g/L e o valor de pH subiu para 5,29.

Os perfis da cinética de produção de L(+)-ácido láctico, consumo do açúcar e crescimento do *L. casei* Ke11 obtidos nas fermentações em batelada alimentada podem ser visualizados na Figura 20 e Tabela 16.

Figura 20 - Cinética da produção de L(+)-ácido láctico, consumo do açúcar e crescimento do *L. casei* Ke11 em reator de 0,5 L em fermentação em batelada alimentada exponencial com fluxo controlado manualmente (A), com fluxo controlado por software e controle de pH feito por NaOH 10 N (B), com fluxo controlado por software e controle de pH feito por NaOH 10 N e CaCO_3 (C) e com fluxo controlado por software e controle de pH feito por CaCO_3 (D). As flechas indicam o início da alimentação. Na Figura 19-D - 1: Início da alimentação com fluxo constante; 2: Início da alimentação exponencial.

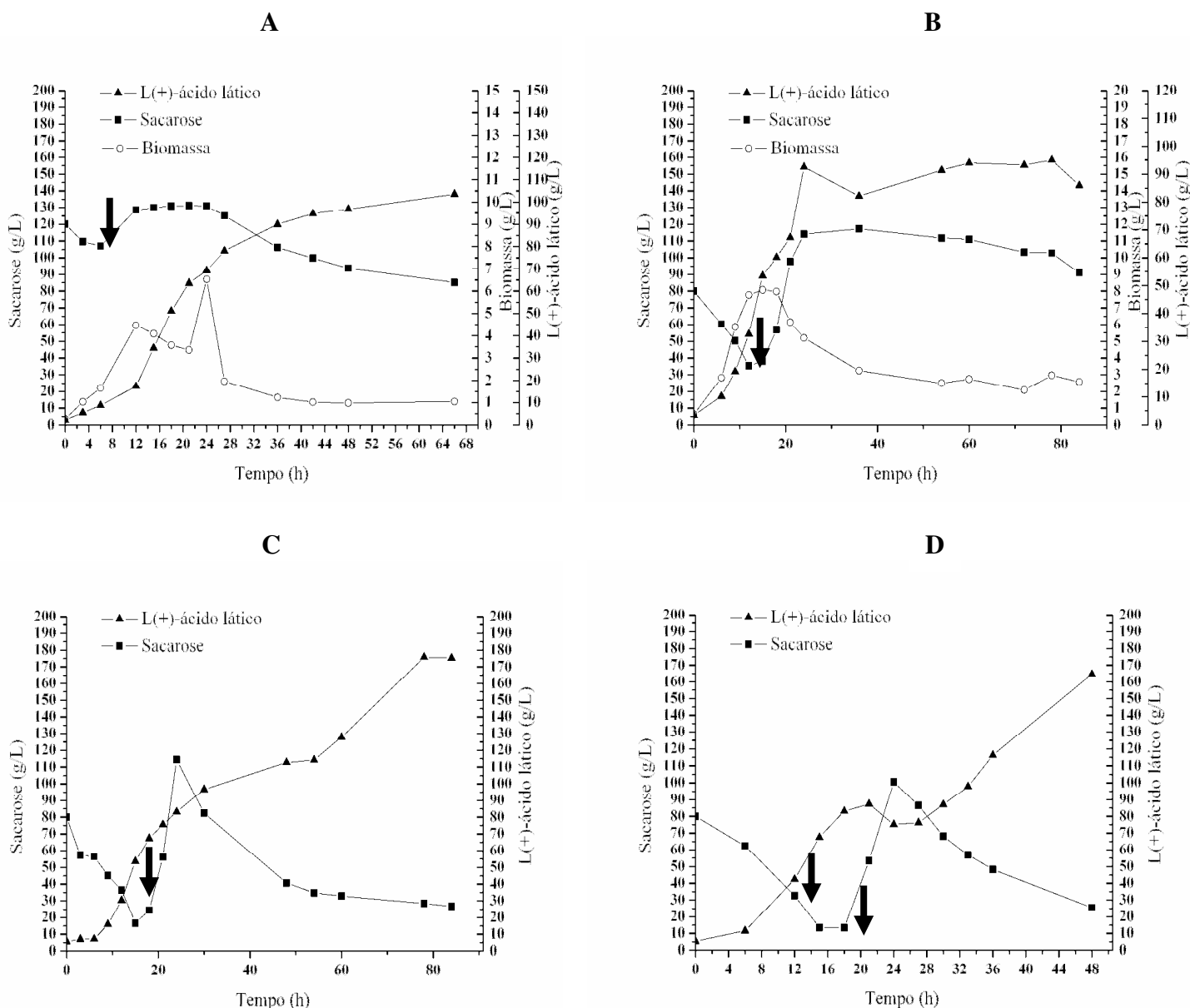


Tabela 16 – Parâmetros determinados nas bateladas alimentadas exponenciais.

Experimento	B* (g/L)	AL (g/L)	Prod (g/L/h)	γ (%)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$	μ_x (h⁻¹)	μ_p (h⁻¹)
Batelada alimentada exponencial com fluxo manual	6,53	103,59	2,92	73	0,07	10,72	0,39	1,68
Batelada alimentada exponencial com fluxo controlado por software e pH controlado por somente NaOH	8,06	94,97	3,71	93	0,05	6,73	0,23	1,48
Batelada alimentada exponencial com fluxo controlado por software e pH controlado por NaOH e CaCO ₃	-	175,84	3,74	95	-	-	-	7,71
Batelada alimentada exponencial com fluxo controlado por software e pH controlado por somente CaCO ₃	-	164,55	4,32	-	-	-	-	8,36

*B: biomassa

AL: L(+)-ácido láctico

Prod: produtividade

 γ : rendimento ($Y_{p/s}$) $Y_{x/s}$: conversão de substrato em biomassa $Y_{p/x}$: conversão de biomassa em produto μ_x : velocidade específica de crescimento do *L. casei* Ke11 μ_p : velocidade específica de produção de L(+)-ácido láctico μ_s : velocidade específica de consumo do açúcar

Como pode ser visto na Tabela 16 a concentração máxima de L(+)-ácido láctico foi obtida na fermentação em batelada alimentada exponencial, na qual o controle do pH foi feito tanto por NaOH 10 N quanto por CaCO₃ e foi de 175,84 g/L em 78 horas de fermentação.

Na fermentação alimentada exponencial com fluxo manual (Figura 20-A) a concentração de açúcar no meio foi mantida acima de 120 g/L, o que pode ter inibido o crescimento do micro-organismo com concentração máxima de biomassa de 6,53 g/L em 24 horas e a produção de L(+)-ácido láctico que foi de 103,59 g/L em 66 horas. Nesta fermentação ocorreu um pico de crescimento do micro-organismo em 24 horas, porém logo a concentração de biomassa começou a decrescer novamente.

Concentração ótima de L(+)-ácido láctico também foi obtida na fermentação em batelada alimentada exponencial com controle de pH feito por CaCO₃, que foi de 164,55 g/L em 48 horas. Talvez se a fermentação permanecesse por mais tempo, a concentração de ácido

lático alcançaria valores maiores, porém houve formação de cristais de lactato de cálcio que solidificaram o meio de fermentação, impossibilitando que a mesma continuasse.

Estes resultados confirmam que quando CaCO_3 é utilizado como agente neutralizante a produção de L(+)-ácido lático aumenta, como já foi discutido anteriormente para os resultados obtidos nas fermentações em batelada. Muito provavelmente se a fermentação não fosse interrompida em 48 horas a maior concentração de L(+)-ácido lático poderia ser obtida nessa fermentação, uma vez que comparando-se com as concentrações obtidas na fermentação em que o pH foi controlado por NaOH 10 N e CaCO_3 (Figura 20-C) em 48 horas, a concentração obtida nesta fermentação foi de 112,71 g/L de L(+)-ácido lático.

O maior valor para rendimento foi também obtido na fermentação em batelada alimentada exponencial com fluxo controlado por software e pH controlado por NaOH e CaCO_3 (95%), já o maior valor da produtividade foi obtido na fermentação em batelada alimentada exponencial com pH controlado somente por CaCO_3 (4,32 g/L/h).

As velocidades máximas específicas de produção e crescimento do micro-organismo obtidas foram de $1,68 \text{ h}^{-1}$ e $0,39 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, entre 0 e 3 horas de fermentação na batelada alimentada exponencial com fluxo manual e de $1,48 \text{ h}^{-1}$ entre 21 e 24 horas e de $0,23 \text{ h}^{-1}$ entre 6 e 9 horas de fermentação, respectivamente, na fermentação em batelada alimentada exponencial com fluxo controlado pelo software e pH controlado com adição de NaOH 10N.

Na fermentação em batelada alimentada exponencial com fluxo controlado por software e pH controlado por NaOH 10N foram observados valores de velocidades máximas específicas de produção e de crescimento 13,51% e 69,56% menores, respectivamente.

Nas fermentações em batelada alimentada exponencial com fluxos controlados por software e pH controlado com adição de NaOH 10N e CaCO_3 (Figura 20-C) e com adição de CaCO_3 (Figura 20-D), foram obtidos as seguintes velocidades máximas instantâneas de produção: 7,71 g/L/h entre 12 e 15 horas e 8,36 g/L/h também entre 12 e 15 horas, respectivamente. Ou seja, a velocidade instantânea de produção quando o CaCO_3 foi utilizado teve valor 8,43% maior do que quando NaOH 10N e CaCO_3 foram utilizados para manutenção no pH.

A Tabela 17 mostra os maiores valores de concentração de L(+)-ácido lático, biomassa, produtividade e rendimento obtidos nas fermentações em batelada em *shaker*, batelada em reator e bateladas alimentadas.

Tabela 17 – Concentração, produtividade e rendimento de L(+)-ácido láctico e concentração de biomassa de *L. casei* Kell em fermentações em batelada em *shaker*, batelada e batelada alimentada em reator de 0,5 L.

	Batelada ^a	Batelada ^b	Pulso ^c	Pulso ^d	Fluxo constante ^c	Fluxo constante ^d	Exponencial ^e
Produção (g/L)	112,15	103,9	100,15	92,82	125,53	110	175,84
Produtividade (g/L/h)	4,76	4,34	3,05	2,66	3,59	3,54	3,74
Rendimento (%)	89	84	84	70	91	76	95
Biomassa (g/L)	-	-	4,24	8,25	12,32	8,45	-

a: Batelada realizada em *shaker*.

b: Batelada realizadas em reator (fermentação em batelada com pH controlado por CaCO₃ e adição de sais do meio MRS).

c: valor de concentração inicial de açúcar no meio de 80 g/L.

d: valor de concentração inicial de açúcar no meio de 120 g/L.

e: Batelada alimentada exponencial (fermentação em batelada alimentada por fluxo exponencial controlado por software com controle de pH feito por CaCO₃ e NaOH 10N).

Como pode ser visto na Tabela 17 a maior concentração de L(+)-ácido láctico ocorreu na fermentação exponencial com controle do fluxo feito por software e controle do pH feito por NaOH 10 N e CaCO₃. Ding e Tan (2006) em seu trabalho realizaram diferentes estratégias de alimentação tais como alimentação por pulso, alimentação por fluxo constante, alimentação com concentração constante de glicose e alimentação exponencial. Os melhores valores tanto para concentração de ácido láctico, produtividade e biomassa foram obtidos na fermentação em batelada alimentada do tipo exponencial com meio de alimentação contendo 850 g/L de glicose e 1% de extrato de levedura (180 g/L; 2,14 e 4,30 g/L, respectivamente).

Choi, Al-zahrani e Lee (2013) utilizaram suco de tâmara como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e o micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* e realizaram diferentes estratégias de fermentação (alimentação por pulso, alimentação exponencial e alimentação exponencial modificada). O meio de alimentação continha suco de tâmara com 300 g/L de glicose e 288,7 g/L de frutose e 1% de extrato de levedura.

A partir dos resultados obtidos com as fermentações alimentadas realizadas por Choi, Al-zahrani e Lee (2013) foi desenvolvido um modelo de cinética para a fermentação batelada alimentada. Esse novo modelo foi usado para controlar uma alimentação antecipada. A concentração de ácido láctico nesta fermentação com alimentação antecipada foi a maior obtida e foi de 171,79 g/L, com produtividade de 1,58 g/L/h e rendimento de 87%. Na fermentação com alimentação exponencial os autores obtiveram 163,03 g/L de ácido láctico,

com um rendimento de 88,1% e produtividade de 1,39 g/L/h. Já na fermentação alimentada exponencial modificada os resultados obtidos foram 160,72 g/L, 88% e 1,49 g/L/h para produção de ácido láctico, rendimento e produtividade, respectivamente.

Os autores conseguiram na alimentação antecipada aumento de 95,35% na produção de ácido láctico e de 5,3% no rendimento em relação a fermentação em batelada. Já na fermentação alimentada exponencial modificada e alimentada exponencial o aumento foi de 82,76 e 85,39% na produção e 6% e 6,1% no rendimento, respectivamente. Porém, a produtividade obtida na batelada foi de 6,28 g/L/h, bem maior que as produtividades obtidas nas fermentações alimentadas.

Comparando-se com os resultados obtidos por estes autores os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios: 175,84 g/L de L(+)-ácido láctico, 3,74 g/L/h para produtividade e 95% para o rendimento.

Diferente do obtido por Ding e Tan (2006) e Choi, Al-zahrani e Lee (2013), neste trabalho a batelada em reator não foi a fermentação em que se obteve a menor concentração de L(+)-ácido láctico (103,9 g/L), sendo que as fermentações em batelada alimentada por pulso apresentaram concentrações menores de 100,15 g/L de L(+)-ácido láctico, quando a concentração inicial de açúcar no meio era de 80 g/L e 92,82 g/L quando a concentração inicial de açúcar no meio tinha o valor de 120 g/L. Isto pode ser explicado pelo fato de que as duas fermentações alimentadas por pulso foram iniciadas com concentrações altas de açúcar (80 e 120 g/L) e além da alta concentração inicial os pulsos de alimentação ocorreram logo no início da fermentação, fazendo com que a concentração de açúcar permanecesse alta.

Ge et al. (2011) estudaram o mecanismo da inibição pelo substrato utilizando o micro-organismo *L. casei* e glicose como fonte de carbono. Eles observaram que o crescimento do micro-organismo e a produção de L-lactato diminui com o aumento da concentração de glicose e com o aumento da temperatura do meio de fermentação. Para aumentar a resistência ao estresse osmótico da cepa em altas temperaturas, um mutante G-03 foi selecionado com um meio contendo 360 g/L de glicose a 45°C. Os autores adicionaram 3 g/L de biotina no meio para aumentar o crescimento do micro-organismo e como resultado obtiveram 198,2 g/L de L-lactato com uma produtividade de 5,5 g/L/h a 41°C e concentração de glicose de 210 g/L. A produção de L-lactato e a produtividade obtidas com o mutante foram 115,2% e 97,8% maiores, respectivamente, que as obtidas pela cepa não mutante, mostrando que a produção de

ácido láctico e a produtividade podem aumentar com o aumento da resistência do micro-organismo ao estresse osmótico.

Já é conhecido na literatura que há diminuição da concentração de ácido láctico e da sua produtividade devido a inibição pela alta concentração de produto e/ou substrato (DING; TAN, 2006; ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Esta inibição é explicada por Kotzamanidis, Roukas e Skaracis (2002) e acontece devido a redução da atividade da água, quando a concentração do substrato está acima de um valor crítico, que juntamente com a plasmólise celular provoca decréscimo na taxa de fermentação e utilização do açúcar.

De acordo com Ge et al. (2011) a maior energia metabólica é obtida por *Lactobacillus* sp. através da glicólise, e quando são necessárias grandes quantidades de ATP para manter a força próton motriz para resistir ao estresse osmótico, a energia gerada pela glicólise não é suficiente para manter as taxas máximas de biossíntese e como consequência impedem a produção de ácido láctico por essa cepa.

Pode-se confirmar esta hipótese comparando-se as duas fermentações em bateladas alimentadas por pulso e as duas fermentações em bateladas alimentadas por fluxo constante. Quando o valor de concentração inicial de açúcar é menor, a produção final de L(+)-ácido láctico é maior. A fermentação em batelada alimentada por pulso com concentração inicial de açúcar de 80 g/L apresentou concentração de L(+)-ácido láctico 7,9% maior (100,15 g/L) que a obtida na fermentação em batelada alimentada por pulso em que a concentração inicial de açúcar foi de 120 g/L (92,82 g/L).

A fermentação em batelada alimentada por fluxo constante em que a concentração inicial de açúcar foi de 80 g/L, a concentração de ácido láctico obtida foi 19,14% maior (125,53 g/L) do que a obtida quando a concentração inicial de açúcar foi de 120 g/L (105,36 g/L).

Em relação ao rendimento o melhor valor foi obtido na fermentação em batelada alimentada do tipo exponencial, na qual o controle do pH foi feito por adição de NaOH 10N e CaCO_3 . Ding e Tan (2006) em seu trabalho conseguiram rendimento na fermentação em batelada alimentada exponencial de 90,3% (+/- 1,5) e neste trabalho o rendimento obtido foi de 95%.

Comparando-se a fermentação em batelada alimentada exponencial com controle de pH feito por NaOH 10N e CaCO_3 , na qual se obteve as maiores concentrações de L(+)-ácido

lático e rendimento, com a batelada realizada em reator, observa-se que houve aumento da produção de L(+)-ácido lático de 69,24% correspondendo a 11% de aumento do rendimento. Em seu trabalho, Ding e Tan (2006) obtiveram aumento de 56,5% na produção de L(+)-ácido lático na fermentação em batelada exponencial alimentada com 850 g/L de glicose e 1% de extrato de levedura. Porém os autores conseguiram aumento de 59,7% na produtividade, enquanto neste trabalho o valor para produtividade obtido na fermentação em batelada foi 16,04% maior que o valor obtido na fermentação exponencial com controle do fluxo feito por software e controle do pH feito por NaOH 10N e CaCO_3 (3,74 g/L/h).

5.8 Extração e purificação do ácido lático

A partir dos resultados obtidos nos vários experimentos de purificação (carvão ativado, coluna de troca iônica, nanofiltração e carvão ativado com celite) realizados com outros caldos de fermentações obtidos em nosso laboratório, foi observado que o método utilizando carvão com celite apresentava a melhor remoção de açúcares e proteínas e também melhor recuperação de ácido lático.

Dessa maneira a purificação do ácido lático dos caldos obtidos neste trabalho foi feita utilizando-se o método de carvão com celite, sendo que os caldos foram escolhidos para a purificação de acordo com suas disponibilidades.

Os dois primeiros experimentos de purificação foram feitos com o caldo obtido a partir da fermentação em batelada simples com controle de pH por NaOH 10 N sem adição dos sais do meio MRS.

Primeiramente este caldo foi acidificado a pH 5 com solução HCl 1N, obtendo assim uma concentração inicial de L(+)-ácido lático de 62,58 g/L e de açúcares de 1,54 g/L.

Em seguida 10 mL da solução acidificada foram submetidos a duas etapas seguidas de filtração a vácuo contendo carvão e celite. O experimento foi realizado novamente com mais 10 mL da solução a fim de confirmar os resultados obtidos.

Os resultados obtidos nos dois experimentos são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 – Purificação de L(+)-ácido láctico produzido por *L. casei* Ke11 utilizando carvão com celite.

	1° Experimento		2° Experimento	
	Caldo inicial	Solução final	Caldo inicial	Solução final
L(+)-ácido láctico (g/L)	62,58	9,234	62,58	8,433
Açúcar (g/L)	1,54	0,035	1,54	0,031
Proteína (g/L)	4,28	0	4,28	0
Volume (mL)	10	67	10	70
Eficiência (%)	-	98,8	-	94
Remoção Proteína (%)	-	100	-	100
Remoção Açúcares (%)	-	85	-	86
Açúcares/Ácido Láctico (%)	-	0,38	-	0,36

Observando a Tabela 18, primeiramente é importante ressaltar que a eficiência (% de recuperação do ácido láctico), remoção de proteína e de açúcares e a porcentagem de açúcares em relação ao ácido láctico (Açúcares/Ácido Láctico) são calculadas com base na quantidade em gramas inicial e final, ou seja, levando em consideração tanto as concentrações como os volumes inicial e final.

Dessa maneira a partir dos resultados obtidos nos dois experimentos, foi possível verificar que nos dois casos houve alta recuperação do ácido láctico (98,8% e 94%) e alta remoção de proteínas e açúcares. Além disso, um fator que é muito importante observar é a porcentagem de açúcares em relação ao ácido láctico, pois pode limitar ou impedir a utilização do ácido láctico na síntese de polímeros. Para boa polimerização esta relação tem que ser menor que 1%, e como podemos observar na Tabela 18, para os dois experimentos esta relação estava abaixo do 1 % (0,38% e 0,36%), mostrando assim que este método é eficiente e adequado para ser utilizado na purificação do ácido láctico que será posteriormente polimerizado.

Entretanto o único inconveniente é que a purificação neste pH apresenta como produto final o sal do ácido láctico, já que o pKa do ácido láctico é de 3,85. Dessa maneira resolveu-se então fazer esta purificação com o caldo acidificado em pH em torno de 3 para que no final fosse recuperado ácido láctico e não seu sal.

Dessa maneira o mesmo caldo utilizado anteriormente foi acidificado a pH 3,2 com solução HCl 1N, obtendo assim concentração inicial de ácido láctico de 52,88 g/L e de açúcares de 0,464 g/L. Em seguida 100 mL da solução acidificada foram submetidos a duas etapas seguidas de filtração a vácuo contendo carvão e celite, sendo que nestas etapas as filtrações foram lavadas com solução de HCl (1N) ao invés de H₂O como nos processos anteriores, a fim de manter o pH final abaixo do pKa (3,85).

Ao fim das etapas de purificação foram obtidos 300 mL de solução com as seguintes concentrações: 13,325 g/L de L(+)-ácido Láctico, 0,05 g/L de açúcar e ausência de proteínas. Com estes resultados foi possível verificar que tanto a remoção de proteína (100% de remoção) quanto a porcentagem de açúcares remanescentes em relação ao ácido láctico (0,37%) foram semelhantes aos resultados obtidos em pH 5. Entretanto a remoção de açúcares (67%) e a recuperação de ácido láctico (76%) apresentaram resultados inferiores aos obtidos em pH 5.

A fim de verificar e aumentar a eficiência deste último método, realizou-se também este experimento com o caldo obtido na fermentação em batelada alimentada exponencial com o fluxo regulado pelo software com controle do pH por CaCO₃, na qual foi obtida alta concentração de produção de L(+)-ácido láctico.

Dessa maneira o caldo primeiramente foi acidificado para pH 3,2 com solução de HCl 1N, obtendo assim concentração inicial de L(+)-ácido láctico de 77 g/L e de açúcares de 13 g/L. Em seguida foram realizados dois experimentos de filtração a vácuo contendo carvão e celite, com volumes iniciais de caldo acidificado diferentes (50 mL e 100 mL). Os resultados dos dois experimentos são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 - Purificação de L(+)-ácido láctico produzido por *L. casei* Ke11 utilizando carvão com celite e caldo com pH 3,2.

	1º Experimento		2º Experimento	
	Caldo inicial	Solução final	Caldo inicial	Solução final
L(+)-ácido láctico (g/L)	77	8,829	77	10,861
Açúcar (g/L)	13	0,387	13	0,880
Volume (mL)	50	315	100	500
Eficiência (%)	-	72	-	70,5
Remoção Proteína (%)	-	100	-	100
Remoção Açúcares (%)	-	81	-	66
Açúcares/Ácido Láctico (%)	-	4,3	-	8,1

Observando os resultados apresentados na Tabela 19, foi possível verificar que para caldo com maior concentração de açúcares este método não foi muito eficiente, pois a porcentagem de açúcares em relação ao ácido láctico foi maior que 1% nos dois casos. Além disso, não foi possível aumentar a recuperação do ácido, que continuou na faixa de 70%.

Estes resultados mostraram que a diminuição do pH do caldo (pH em torno de 3) e a lavagem com solução de HCl, diminuíram a eficiência da purificação do ácido láctico utilizando o método de carvão e celite. Isto poderia ter ocorrido porque de acordo com Chen e Ju (1998) a adsorção do ácido láctico no carvão aumenta com a diminuição do pH, ou seja, em pH menor há maior adsorção do ácido láctico no carvão, consequentemente é mais difícil retirar grande quantidade de ácido láctico do carvão.

Assim resolvemos realizar a purificação do ácido láctico em duas etapas: 1) Purificação com carvão e celite utilizando o caldo com pH 5 e lavagem com água. 2) Transformar o lactato (sal) obtido em ácido láctico a partir da adição da solução em coluna de resina de troca catiônica.

Dessa maneira o caldo foi basificado para pH 5, com solução de NaOH 1N, obtendo assim uma concentração inicial de ácido láctico de 59,01 g/L e de açúcares de 9,4 g/. Em seguida 40 mL desta solução foram submetidos a duas etapas seguidas de filtração a vácuo contendo carvão e celite, sendo que nestas etapas as filtrações foram lavadas H₂O.

Ao fim das duas filtrações foi obtida solução com 203 mL com as seguintes concentrações: 10,833 g/L de L(+)-ácido láctico, 0,066 g/L de açúcares e ausência de proteínas. A partir destes resultados foi possível verificar que o processo foi altamente eficiente, já que houve recuperação do ácido láctico de 93%, alta remoção de proteína (100%) e açúcares (96%) e porcentagem de açúcares em relação ao ácido láctico de 0,6%.

Esta solução (203 mL) foi então submetida à segunda etapa da purificação, que consiste na transformação do lactato em ácido láctico através de coluna de troca catiônica, conforme descrito nos materiais e métodos. Ao final desta última etapa a solução final (205 mL) apresentou as seguintes concentrações 9,661 g/L de L(+)-ácido láctico e 0,047 g/L de açúcares.

Relacionando este resultado final com os dados do caldo inicial verifica-se que o processo total (filtração com carvão e celite + coluna de troca catiônica) apresentou uma eficiência, pois a recuperação total de ácido láctico foi de 84% com alta remoção de açúcares (97%) e proteína (100%) e porcentagem de açúcares em relação ao ácido láctico de 0,49%.

6 CONCLUSÕES

A análise de variância pelo teste F e a comparação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade demonstrou, que com a utilização da sacarose PA como fonte de carbono juntamente com o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, é possível obter resultados satisfatórios tanto para produção de L(+)-ácido láctico (87,09 g/L) quanto para rendimento (88%) e produtividade (3,77 g/L/h). As análises feitas demonstraram que a sacarose PA pode ser substituída pelo açúcar cristal, uma vez que quando este último foi utilizado com produção de L(+)-ácido láctico e rendimento de 89,75 g/L e 99%, respectivamente, sendo estes maiores que os obtidos quando a sacarose PA foi utilizada.

O extrato de levedura, o açúcar, a porcentagem de inóculo e o Tween 80 tiveram efeito significativo positivo da produção de L(+)-ácido láctico, segundo o Planejamento de Plackett-Burman.

Para que houvesse maior produção de ácido láctico com menor concentração de açúcar residual, os parâmetros obtidos foram de 120 g/L de açúcar, 40 g/L de extrato de levedura e 10% de inóculo.

A fermentação em *shaker* validou o meio otimizado com o qual a concentração obtida de L(+)-ácido láctico foi de 112,15 g/L. Esta fermentação apresentou produtividade 4,76 g/L/h e apresentou rendimento de 89% com 2,75 g/L de açúcar residual.

Os maiores valores de concentração de ácido láctico, produtividade e rendimento em reator batelada foram obtidos quando CaCO_3 foi utilizado para controle do pH e os sais do meio MRS foram adicionados (produção de 103,9 g/L de L(+)-ácido láctico, 4,34 g/L/h de produtividade e 84% de rendimento).

Dentre as estratégias de alimentação analisadas, a concentração de L(+)-ácido láctico e rendimento foram maiores na batelada alimentada exponencial, na qual NaOH 10 N e CaCO_3 foram usados para o controle do pH. Nesta fermentação houve aumento de 69,24% na concentração de ácido láctico e 11% no valor do rendimento, quando comparados aos valores obtidos na batelada. Apenas a produtividade foi maior na batelada (16,04% maior).

O processo de purificação utilizando dupla filtração a vácuo com carvão e celite seguida de transformação do lactato em ácido láctico com coluna de troca catiônica apresentou alta eficiência, visto que neste processo foi obtido rendimento ótimo do ácido láctico, alta remoção açúcares e proteínas e baixa relação de açúcar/ácido láctico. Este processo de

purificação é muito interessante, pois apresenta baixo custo e pouco tempo de operação, além de ser uma forma inovadora de purificação do ácido láctico, pois não há na literatura dados de utilização de celite como adsorvente adicional para purificação de ácido láctico de meio fermentado.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **J Biotechnol.**, v. 156, p. 286–301, 2011.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 877-902, 2013.

AESCHLIMANN, A.; VON STOCKAR, U. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.32, p. 398-402, 1990.

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.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polymers, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polym Int**, v. 47, p. 89–114, 1998.

AMRANE, A.; PRIGENT, Y., Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assessment. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 40, p. 644-649, 1994.

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.

AXE, D. D., BAILEY, J. E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 47, 8–19, 1995.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (p. 1–66). New York: Marcel Dekker, Inc. 2004.

BENNINGA, H. A History of Lactic Acid Making, **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, Netherland, p. 1–61, 1990.

BOUCHOUX, A.; BALMANN, H. R.; LUTIN, F. Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electrodialysis operations. **Sep. Pur. Technol.**, v. 52. p. 266–273, 2006.

- BOUDRANT, J.; MENSUTINA, N. V.; SLODOHODOV, 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.; VÁZQUEZ, M. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryneformis* using response surface methodology. **Food Microbiology**, v.21, p. 143-148, 2004.
- BUVUKKILECI, A. O. L(+) lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Dissertação (mestrado em ciências) - Department: Biotechnology and Bioengineering Major: Biotechnology. Izmir, Turkey: Izmir Institute of Technology, 2000.
- CARVALHO, C. M. L.; SERRALHEIRO, M. L. M.; CABRAL, J. M. S.; AIREBARROS, M. R. Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. **Enzyme Microbiol. Technol.** v. 27, p. 117–123, 1997.
- CHAN-BLANCO, Y.; BONILLA-LEIVA; A. R., VELAZQUEZ, A. C. Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 63, p. 147-152, 2003.
- CHAUHAN, K.; TRIVEDI, U.; PATEL, C. K. Statistical screening of medium components by Plackett–Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 98–103, 2007.
- CHEN, C. C.; JU, L. K. Adsorption Characteristics of Polyvinylpyridine and Activated Carbon for Lactic Acid Recovery from Fermentation of *Lactobacillus delbrueckii*. **Separation Science and Technology**, v.33, p.1423-1437, 1998.
- CHOI, M.; AL-ZAHRANI, S. M.; LEE, S. Y. Kinetic model-based feed-forward controlled fed-batch fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* for the production of lactic acid from Arabic date juice. **Bioprocess Biosyst Eng**, 2013.
- 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. Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico, Tese de doutorado, p. 114, 2011.
- COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. D-(-) lactic acid production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2011a (In press).
- COELHO, L. F.; DE LIMA, C. J. B.; 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, 2011b.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. **Microbiology-Sgm**, v. 153, p. 291–299, 2007.

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

DATTA, R. Hidroxy carboxylic acids, in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5th edn, Vol. 14, ed. By Seidel A. Wiley, Hoboken, NJ, p. 114-134, 2005.

DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recente 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 polylatic acid and lactic acid derivatives. **FMS 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, 2010.

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, 2010.

DE MAN, J. D.; ROGOSA, M. A.; SHARPE, M. E. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. **J. Appl. Bact.**, v. 23, p. 130-135, 1960.

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.

ELDELEKLIOGLU, B.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, U. The effects of nutrient supplements on the production of lactic acid from cheese whey. **Turk J Biochem**, v. 38 (1), p. 81-91, 2013.

EUZEBY, J. P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the Internet (URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>)-update. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 1–29, 2006.

FILACHIQNE, E. A. I.; FISHER, C. H. Purification of Lactic Acid – Production of Methyl Lactate from Aqueous Solutions of Crude Acid. . **Ind. Eng. Chem.**, v. 38, p.228-232, 1946.

GARLOTTA, D. A literature review of poly (lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, p. 63-84, 2001.

GARVIE, E. I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiology Reviews**, v. 44, p. 106-139, 1980.

GE, X. Y.; YUAN, J.; QIN, H.; ZHANG, W. G. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 73 – 78, 2011.

GIRAUD, E.; LELONG, B.; RAIMBAULT, M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, 96–99, 1991.

GONÇALVES, L. M. D.; XAVIER, A. N. R. B.; ALMANDA, J. S.; CORRONODO, M. J. T. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. **Enzyme Microb Technol**, v.1, p. 314–319, 1991.

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.

GULLÓN, B.; YÁÑEZ, R.; ALONSO, J. L.; PARAJO, J. C. L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. **Bioresour Technol.**, v. 99, p. 308-319, 2008.

HARTKE, A.; BOUCHE, S.; GIARD, J. C.; BENACHOUR, A.; BOUTIBONNES, P.; AUFRAY, Y. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Curr. Microbiol.**, v. 33, 194–199, 1996.

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

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, p. 254-258, 2007.

HUJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y., LEISOLA, M. Optimization of media and cultivation conditions for L(+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, no. 1-2, p. 126-130, 2001.

JOGLEKAR, H. G.; RAHMAN, I.; BABU, S.; KULKARNI, B. D.; JOSHI, A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. **Sep. Purif. Technol.**, v.52, p.1-17, 2006.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava bagasse for L-(+)-lactic acid production using *Lactobacilli*. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 134, p. 263-272, 2006.

KADAM, S. R.; PATIL, S. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. **Process Biochem**, v. 4, p. 120-126, 2006.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 49, p. 209-224, 1983.

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

KANG, S. H.; CHANG, Y. K.; CHANG, H. N.. Recovery of ammonium lactate and removal of hardness from fermentation broth by nanofiltration. **Biotechnol. Progress**, v.20, p.764-770, 2004.

KOTZAMANIDIS, C.; ROUKAS, T.; SKARACIS, G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.18, n.5, p.441-448, 2002.

KULPRATHIPANJA, A. R.; OROSHA, R. Separation of lactic acid from fermentation broth with an anion polymeric absorbent, US Patent 5 068 418, 1991.

KURBANOGLU, E. B.; KURBANOGLU, N. I. Utilization for lactic acid production with a new acid hydrolysis of ram horn waste. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 225, p. 29–34, 2003.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresour Technol.**, v. 101, p. 1036–1043, 2010.

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

LEW, L. C.; CHOI, S. B.; TAN, P. L.; LIONG, M. T. Mn^{2+} and Mg^{2+} synergistically enhanced lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* FTDC 8313 via affecting different stages of the hexose monophosphate pathway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 644-653, 2013.

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

LIMSOWTIN, G. K. Y.; BROOME, M. C.; POWELL, I. B. Lactic acid bacteria, taxonomy. In H. Roginski, J. W. Fuquay, eP. F. Fox (Eds.). **Encyclopedia of dairy sciences** (v. 3, p. 2739-2751). London: Academic Press, 2003.

LIPINSKY, E. S.; SINCLAIR, R. G. Is lactic acid a commodity chemical? **Chem Eng Prog.**, v. 82, pp. 26-32, 1986.

LITCHFIELD, J. H. Microbial production of lactic acid. **Adv Appl Microbiol**, v. 42, p. 45-95, 1996.

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.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265, 1951.

LUNT, J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. **Polym Degrad Stability**, v. 59, p.145-52, 1998.

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.

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

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; SALGADO, J. M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. de S. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, p. 70-83, 2013.

MOLDES, A. B.; ALONSO, J. L.; PARAJO, J. C. Recovery of lactic acid from simultaneous saccharification and fermentation media using anion exchange resins. **Bioproc. Biosys. Eng.**, v.25. p. 357-363, 2003.

MOON, S. K.; WEE, Y. J.; CHOI, G. W. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. **J Biosci Bioeng.**, v. 114, p. 155-159, 2012.

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

NAKANO, S.; UGWU, C. U.; TOKIWA, Y. Efficient production of D-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)₂ as a neutralizing agent. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 791-794, 2012.

NANCIB, A.; NANCIB, N.; BOUDRANT, J. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 25, p. 1423-1429, 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.

OHLEYER, E.; WILKE, C. R.; BLANCH, H. W. Continuous production of lactic acid from glucose and lactose in a cell-recycle reactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 11, p. 457-463, 1985.

OLMOS-DICHARA, A.; AMPE, F.; URIBELARREA, J. L.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G. Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and tryptone enrichment. **Biotechnology Letters**, v. 19, no. 8, p. 709-714, 1997.

OU, M. S.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. L-(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 38, p. 599-605, 2011.

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

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.

QUINTERO, J.; ACOSTA, A.; MEJÍA, C.; RÍOS, R.; TORRES, A. M. Purification of lactic acid obtained from a fermentative processo f cassava syruo using íon Exchange resins. **Rev Fac Ing Univ Antioquia.**, v. 65 p. 139-151, 2012.

RICHTER, K.; BERTHOLD, C. Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. **J Agric Eng Res**, v. 71, p.181-191, 1998.

ROY, D.; GOULET, J.; LEDUY, A. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 206-213, 1986.

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

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

SARHADDAR, S.; SCHEIBL, A.; BERGHOFER, E.; CRAMER, A. Lactic acid extraction and purification process. **US Patent 5,641,406**, 1997.

SCHLEIFER, K. H. Gram positive cocci. **In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2. ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Holt, J.G. p. 1043–1074. Baltimore: Williams eWilkins Press, 1986.

SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **J. Biotechnol.**, v. 73, 61-70, 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.

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.

SREENATH, H. K.; MOLDES, A. B.; KOEGEL, R. G.; STRAUB, R. J. Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. **J Biosci Bioeng**, v. 92, p. 518-523, 2001.

SRINIVAS, M. R. S.; CHAND, N.; LONSANE, B. K., Use of Plackett-Burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/product promoters, minerals and enzyme inducers for the production of alpha-galactosidase by *Aspergillus niger* MRSS 234 in solid state fermentation system. **Bioprocess. Eng.**, v 10, p. 139-144, 1994.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J., Media for industrial fermentations. **In: Principles of fermentation technology**. Oxford: Pergamon, p. 93-122, 1986.

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.

TIMBUNTAN, W.; SRIROTH, K.; TOKIWA, Y. Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, 811-814, 2006.

TIMMER, J. M. K.; VAN DER HORST, H. C.; ROBBERTSEN, T. Transport of lactic acid through reverse osmosis and nanofiltration membranes, **J. Membr. Sci.** v.85. p. 205-216, 1993.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N., Deming RL. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochem**, v. 40 p. 2551-2557, 2005.

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

VAIDYA, A. N.; PANDEY, R. A.; MUDLIAR, S.; KUMAR, M. S.; CHAKRABARTI, T.; DEVOTTA, S. Production and Recovery of Lactic Acid for Polylactide—An Overview. **Crit Rev Env Sci Tech**, v. 35, p. 429-467, 2005.

VIANA, R.; YEBRA, M. J.; GALAN, J. L.; MONEDERO, V.; PEREZ-MARTINEZ, G. Pleiotropic effects of lactate dehydrogenase inactivation in *Lactobacillus casei*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 5/6, p. 641-649, 2005.

YANG, W. C.; ZHONG, J. L.; TSAO, G. T. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system, **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 51–52, p. 57-71, 1995.

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

YUN, J. S.; WEE, Y. J.; RYU, H. W. Production of optically pure L-(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enzyme Microb Technol**, v. 33, p. 416-423, 2003.

WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. 2006.

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.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R.W.; RATANAPONGLEKA, K. Optimization of growth conditions for intensive propagation, growth development and lactic acid production of selected strains of *Lactobacill*. **Engineering Our Future: Are We up to the Challenge?** p. 27-30, 2009.

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.

ZOU, H.; WU, Z.; XIAN, M.; LIU, H.; CHENG, T.; CAO, Y. Not only osmoprotectant: Betaine increased lactate dehydrogenase activity and L-lactate production in lactobacilli. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 591-595, 2013.