
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E
DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
LÁTICO.**

LUCIANA FONTES COELHO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Fevereiro, 2011

LUCIANA FONTES COELHO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E
DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
LÁTICO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Rio Claro

2011

LUCIANA FONTES COELHO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E
DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
LÁTICO**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
doutor em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Jonas Contiero

Prof. Dr. Clóvis Parazzi

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Rio Claro, 11 de Fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar a minha alma e os meus passos e por ter me direcionado até aqui.

Ao Professor Dr. Jonas Contiero, pela oportunidade, incentivo, amizade, orientação, dedicação, pela boa vontade em ajudar a qualquer hora, pelos momentos de alegria, além de ser uma ótima pessoa é um excelente pesquisador. Me espelho na sua garra, determinação e iniciativa para a pesquisa, ama o que faz e com isso consegue incentivar todos ao redor. Eterna gratidão por tudo.

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudo e financiamento do projeto e ao relator do meu projeto, que sempre demonstrou boa vontade em auxiliar com dicas e correções.

À Dra. Georgina por todas as informações e por ceder à cepa *L. rhamnosus* B103.

Ao pós graduando Cristian pelos valiosos ensinamentos em estatística, planejamento de experimentos e superfície de resposta e por todos os auxílios e dicas com a execução dos experimentos.

Às estagiárias Paola e Marcela por toda a força e auxílio nos experimentos.

Aos companheiros do laboratório LMI pelas ajudas, conselhos e incentivos em tudo: Guilherme, Mariana, Roberta, Paulo, Gervásio, Batata, Siddhartha, Kate, Vinicius, Fabrício, Mary, Cristian, Rodrigo, Marcela e Paola pelas valiosas colaborações, pela amizade, pela boa vontade em ajudar a qualquer hora, pelos momentos de alegria... Meu Muito Obrigada por tudo!!!

À todos os amigos e companheiros da pós graduação em microbiologia aplicada: Angela, César, Barbi, Carol, Adriano, Heide, Virginia, Alex, Chal, Bio, Vivis, Suely, Grazy...

À pós graduação, aos bibliotecários e a todos os funcionários da Unesp pelo carinho, dedicação e valiosos auxílios.

Aos professores Dr. Fernando Carlos Pagnocca, Dr. José Carlos Marconato, Dr. Humberto Milagre e Dr. Jonas Contiero, pela oportunidade de trabalhar como professora bolsista em microbiologia geral e aplicada.

À todos os funcionários do departamento de bioquímica e microbiologia da Unesp, em especial aos colaboradores: Beto, Lu, Fátima, Inês, Carmem, Zito, Marcio, Pri, Dani e Ronaldo, ao Prof. Pagnocca, à Prof^ª. Sandra, ao Prof. Marconato, e à secretária Angela pela paciência e por sempre mostrarem boa vontade em ajudar, meu Muito Obrigada!!!

À professora e amiga Cynara por todo o auxílio na identificação molecular dos isolados e ensinamento em biologia molecular. Ao Prof. Mauricio por ceder o laboratório de biologia molecular para realização da identificação dos isolados.

Ao meu pai e à minha mãe que lutaram a vida inteira e que muitas vezes abdicaram dos seus próprios sonhos, para que no futuro pudessem realizar os sonhos dos seus próprios filhos. Tudo o que adquiri na vida em termos de conhecimento, sabedoria e paz, assim como, todas as minhas conquistas devo a vocês. Minha eterna gratidão por tudo.

Ao meu irmão, à minha avó, à Mayra e à todos os meus familiares e amigos que sempre torceram por mim.

Ao meu namorado Robson pelo companheirismo, dedicação, carinho, amor, paciência e incentivo em todos os momentos.

Às companheiras de república, Carol, pelo incentivo e exemplo de determinação, pela amizade, força, coragem e positivismo, à Renata, à Heide e à Virginia pelos momentos de alegria, companheirismo e amizade, aos meus bichos de estimação, e à cidade abençoada que é Rio Claro, nunca fui tão feliz na minha vida como fui aqui, graças às pessoas maravilhosas que residem, residiram ou simplesmente passaram por aqui no período do meu doutorado.

Aos participantes da minha banca de doutorado pelas valiosas correções e sugestões: Prof. Dr. Jonas Contiero; Prof. Dr. Clóvis Parazzi; Prof. Dr. Luiz Carlos Basso; Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto; Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção e o aperfeiçoamento deste trabalho.

“Se cultivares amor na execução do dever que a Divina Providência te atribui, nunca experimentarás cansaço ou desencanto, porque o trabalho se te fará fonte de alegria, na alegria de ser útil.

Se aplicares amor nos recursos verbais que a Eterna Sabedoria te confere, nunca te complicarás em manifestações infelizes, porque a tua palavra se transubstanciará em clarão e bênção, naquilo em que te expresses.

Se espalhares amor no lugar em que as Leis da Vida te situam nunca te observarás na condição de vítima do desequilíbrio, porque a tua influência se tornará serenidade e esperança, garantindo a harmonia e a tranqüilidade onde estejas.

Se conservares o amor no coração - obra divina do Universo, - nunca te perderás na sombra, porque terás convertido a própria alma em presença de luz”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar micro-organismos produtores de D-(-) e L-(+) ácido láctico, os quais são utilizados na síntese de polímeros empregados na produção de diversos materiais resistentes e biodegradáveis, além de otimizar a produção de ácido láctico, a partir da utilização de diversos resíduos agro-industriais. Os micro-organismos mais promissores para produção de L-(+) ácido láctico foram os isolados de Keffir (Ke6, Ke11, Ke8 e Ke24) e o *Lactobacillus rhamnosus* B103, já para a produção de D-(-) ácido láctico, os mais promissores foram os isolados de iogurte (Y15C e Y15A) e o *Leuconostoc mesenteroides* B512. Pode-se afirmar que os micro-organismos selecionados apresentaram grande potencial para utilização na indústria de biopolímeros e indústria de alimentos. O soro de queijo e a manipueira foram os melhores resíduos para produção de L-(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* B103. Quando se utilizou 160 g/L de lactose de soro de queijo, 60 mL/L de água de maceração de milho (AMM), 2 mL/L de Tween 80 e 0,10 g/L de MnSO₄, observou-se alta produção de L-(+) ácido láctico (142 g/L) e baixo residual de lactose (3,2 g/L). Para a otimização com manipueira, foi obtido 41,58 g/L de L-(+) ácido láctico, a partir de 50 g/L de açúcar redutor total (ART), 65,40 mL/L de AMM e 1,27 mL/L de Tween 80. Nas otimizações com *Leuconostoc mesenteroides* B512 foi observado produção de 60,20 g/L de D-(-) ácido láctico, utilizando 116,90 g/L de ART de caldo de cana e 44,25 g/L de autolisado de levedura. Nas otimizações com *L. plantarum* Lmism6 observou-se uma produção de 63,40 g/L de ácido láctico, 0,40 g/L de ART residual e alta conversão de substrato (99,40%), quando se utilizou 70 g/L de ART de melaço, 30,00 mL/L de AMM, 2 g/L de K₂HPO₄ e 1 mL/L de Tween 80.

Palavras-Chave: *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, ácido láctico, resíduos agroindustriais, otimização.

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate D-(-) and L-(+) lactic acid producers micro-organisms, which are used in the synthesis of polymers used in the production of many resistant and biodegradable materials and optimize the lactic acid production, from agro-industrial residues. The most promising micro-organisms for L-(+) lactic acid production were *Lactobacillus rhamnosus* B103, as well as, the isolated from Keffir (Ke6, Ke11, Ke8 Ke24) and the most promising D-(-) lactic acid producers were strains of yogurt (Y15C and Y15A) and *Leuconostoc mesenteroides* B512. Cheese whey and cassava wastewater (CW) were the best residues for L-(+) lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103. Using 160 g/L of lactose from whey, 60 mL/L of CSL, 2 mL/L of Tween 80 and 0.10 g/L of MnSO₄, there was higher production of L-(+) lactic acid (142 g/L) and low lactose residual (3.20 g/L). For optimizations with CW, it was obtained 41.58 g/L of L-(+) lactic acid from 50 g/L of reducing sugar, 65.40 mL/L and 1.27 mL of corn steep liquor (CSL) and Tween 80 respectively. *Leuconostoc mesenteroides* B512 produced 60.20 g/L of D-(-) lactic acid, using 116.90 g/L of sugarcane juice and 44.25 g/L of yeast autolysate. *L. plantarum* Lmism6 produced 63.40 g/L of lactic acid, with less residual reducing sugar (0.41 g/L) and higher substrate conversion (99.41%), by using 70 g/L of sugar reducing from molasses, 30 mL/L of CSL, 2 g/L of K₂HPO₄, and 1 mL/L of Tween 80.

Key-words: *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, lactic acid, agro-industrial wastes, optimization.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
AL	Autolisado de Levedura
AMM	Água de Maceração de Milho
ART	Açúcar Redutor Total
BLs	Bactérias lácticas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ICIDCA	Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc</i>	<i>Lactococcus</i>
LdhD	D-(-) lactato desidrogenase
LdhL	L-(+) lactato desidrogenase
<i>Leuc</i>	<i>Leuconostoc</i>
LR	Lactato Racemase
LS	Lactobacillus, Streptococcus
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
m/v	massa/volume
PDLA	Poli-D-(-) ácido láctico
PDLLA	Poli-DL ácido láctico
PDS	Poli- <i>p</i> -dioxanona
PGA	Poli-ácido glicólico
PLA	Ácido polilático
PLGA	Poli-ácido láctico-co-ácido glicólico
PLLA	Poli-L-(+) ácido láctico
<i>P</i>	<i>Pediococcus</i>
PB	Plackett-Burman
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pro-floo	Proteína da semente de algodão
RPM	rotação por minuto
<i>S</i>	<i>Streptococcus</i>
SDS	Sulfato dodecyl de sódio
t	tonelada

TBE	Tris, Borato, EDTA
TE	Tris, EDTA.
TNES	Tris, NaCl, EDTA e SDS
v/v	volume/volume
Yp/s	rendimento produto/substrato

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 O ácido láctico.....	16
2.2 Micro-organismos envolvidos na produção de ácido láctico.....	19
2.2.1 <i>Streptococcus</i>	21
2.2.2 <i>Lactobacillus</i>	22
2.2.3 <i>Leuconostoc</i>	24
2.2.4 <i>Pediococcus</i>	25
2.2.5 <i>Lactococcus</i>	26
2.2.6 <i>Enterococcus</i>	26
2.2.7 Outras bactérias lácticas.....	27
2.2.8 Caracterizações de bactérias lácticas.....	27
2.3 Produção de ácido láctico por fermentação utilizando diferentes resíduos agroindustriais.....	29
2.3.1 Fontes de carbono.....	30
2.3.1.1 Soro de queijo.....	30
2.3.1.2 Melaço.....	32
2.3.1.3 Caldo de cana de açúcar.....	33
2.3.1.4 Manipueira.....	33
2.3.2 Fontes de nitrogênio.....	34
2.3.3 Temperatura.....	35
2.3.4 pH.....	36
2.3.5 Agitação.....	38
2.3.6 Tipos de fermentação.....	38
2.3.7 Formação de subprodutos.....	39
2.4 Técnicas de planejamentos de experimentos e metodologia da superfície de resposta.....	39
2.4.1 Planejamento fatorial.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Bioprospecção de bactérias potencialmente produtoras dos isômeros ópticos do ácido láctico.....	42

3.1.1 Amostragem.....	42
3.1.2 Isolamento de micro-organismos.....	43
3.1.3 Seleção dos micro-organismos.....	44
3.1.4 Fermentação com diferentes fontes de carbono.....	45
3.1.5 Caracterizações bioquímicas e fisiológicas dos micro-organismos.....	45
3.1.6 Identificação molecular dos micro-organismos.....	46
3.1.6.1 Extração do DNA genômico (TNES).....	47
3.1.6.2 Amplificação do gene 16S rDNA.....	48
3.1.6.3 Purificação de produtos de PCR.....	48
3.1.6.4 Reação de sequenciamento do 16S rDNA.....	48
3.2 Produção de ácido láctico por <i>Lactobacillus plantarum</i> LMISM6.....	49
3.2.1 Micro-organismo.....	49
3.2.2 Substrato.....	50
3.2.3 Efeito de diferentes concentrações de melaço, AMM, temperatura e pH.....	50
3.2.4 Planejamento do tipo Plackett Burman.....	51
3.2.5 Planejamento do tipo composto central e metodologia da superfície de resposta	52
3.3 Produção de L-(+) ácido láctico por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> B103.....	53
3.3.1 Micro-organismo.....	53
3.3.2 Fermentações com diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	54
3.3.3 Planejamento do tipo Plackett Burman utilizando soro de queijo.....	55
3.3.4 Planejamento do tipo composto central, utilizando soro de queijo.....	56
3.3.5 Planejamento do tipo Plackett Burman, utilizando manipueira.....	57
3.3.6 Planejamento Fatorial composto central utilizando manipueira.....	57
3.4 Produção de D-(-) ácido láctico para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B512.....	58
3.4.1 Micro-organismo.....	58
3.4.2 Fermentação com diferentes fontes de carbono.....	59
3.4.3 Fermentação com diferentes fontes de nitrogênio.....	59
3.4.4 Planejamento do tipo Plackett Burman.....	60
3.4.5 Planejamento do tipo composto central.....	60
3.5 Metodologia analítica.....	61
3.5.1 Quantificação do ácido láctico.....	61
3.5.2 Determinação enantiomérica do ácido láctico.....	61
3.5.3 Determinação da concentração celular.....	62

3.5.4 Determinação do consumo de substrato.....	62
3.6 Análise estatística.....	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1 Isolamento e seleção dos micro-organismos.....	65
4.2 Caracterizações bioquímicas.....	70
4.3 Identificação molecular.....	71
4.3.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	71
4.3.2 Amplificação por PCR, purificação e seqüenciamento do gene 16S rDNA.....	72
4.4 Produção de ácido láctico por <i>Lactobacillus plantarum</i> Lmism6.....	73
4.4.1 Efeito de diferentes concentrações de melaço, AMM, temperatura e pH.....	73
4.4.2 Planejamento experimental Plackett Burman.....	79
4.4.3 Planejamento Composto Central e Metodologia da Superfície de Resposta.....	81
4.5 Produção de L-(+) ácido láctico por <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	89
4.5.1 Fermentações com diferentes fontes de carbono.....	89
4.5.2 Fermentação com diferentes fontes de nitrogênio.....	90
4.5.3 Otimização da produção de L-(+) ácido láctico usando soro de queijo.....	92
4.5.3.1 Planejamento do tipo Plackett-Burman.....	92
4.5.3.2 Planejamento do tipo composto central e metodologia da superfície de resposta.....	93
4.5.4 Otimização da produção de L-(+) ácido láctico usando água de manipueira.....	99
4.5.4.1 Planejamento do tipo Plackett–Burman.....	99
4.5.4.2 Planejamento do tipo composto central e metodologia da superfície de resposta.....	101
4.6 Fermentações com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B 512 produtor de D-(-) ácido láctico.....	107
4.6.1 Fermentações com diferentes fontes de carbono.....	107
4.6.2 Fermentação com diferentes fontes de nitrogênio.....	108
4.6.3 Efeito da composição do meio de fermentação por planejamento do tipo Plackett-Burman.....	109
4.6.4 Otimização da produção de D-(-) ácido láctico por planejamento composto central.....	110
5. CONCLUSÕES.....	116

6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	117
7. REFERÊNCIAS.....	118
8. ANEXO 1.....	134

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico), $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ 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 solventes orgânicos e na indústria alimentícia atua como acidulante, flavorizante, aromatizante e emulsificante (WEE et al., 2004; ALTAF et al., 2005).

A produção mundial de ácido láctico em 2006 foi estimada entre 130.000 e 150.000 toneladas métricas por ano, sendo que o preço do ácido láctico com 50% de pureza era de US\$ 1,38/Kg e com 88% de pureza era de US\$ 1,54/Kg (WEE et al., 2006). A demanda de ácido láctico tem aumentado e é estimado um crescimento de 19% ao ano, principalmente devido ao seu emprego na produção de polímeros biodegradáveis como o ácido polilático (PLA), que pode ser o substituto dos polímeros derivados do petróleo (DATTA et al., 1995, WEE et al., 2006). Assim, o PLA pode ser utilizado em embalagens de alimentos e utensílios plásticos variados e por ser reabsorvível, pode ser empregado na medicina, na regeneração de tecidos, suturas, fixações de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, reparo do menisco, fixação de ligamentos e implantes (SAKATA et al., 2004). 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, pois são mais econômicos, não requerem a utilização de temperaturas, pressões elevadas e catalisadores metálicos, o consumo de energia, assim como, o custo da matéria prima é baixo, é possível utilizar matéria-prima renovável, são “estereosseletivos”, ou seja, produzem um dos isômeros preferencialmente (PONDEY et al., 2001; SILVA; MANCILHA, 1991).

Além disso, a síntese química do ácido láctico sempre produz uma mistura racêmica. Aproximadamente 90% do total do ácido láctico produzido no mundo é produzido por fermentação utilizando bactérias (ZHOU et al., 2006). Produção fermentativa de ácido láctico oferece ótima vantagem na obtenção de estereoisômeros opticamente puros (L-(+) ou D-(-) ácido láctico) e também D,L ácido láctico, dependendo da estirpe selecionada para fermentação.

A pureza enantiômérica do ácido láctico é fator crucial nas propriedades físicas do PLA. A polimerização de uma mistura racêmica de L-(+) ou D-(-) ácido láctico, geralmente, leva à síntese de poli-DL-ácido láctico (PDLLA), que é amorfa. O grau de cristalinidade e, muitas outras propriedades importantes, são controladas pela razão dos enantiômeros D e L usados (SODEGARD; STOLT, 2002). Devido a natureza quiral do ácido láctico, várias formas distintas de polímeros podem existir: poli-L-(+) ácido láctico (PLLA) é o produto resultante da polimerização do L-(+) ácido láctico. A temperatura de fusão do PLLA pode ser aumentada em 50°C, pela mistura física com o polímero PDLA (poli-D-(-) ácido láctico), o que pode formar um estéreocomplexo altamente regular com cristalinidade e estabilidade térmica aumentada (WIKIPÉDIA, 2011).

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

As bactérias lácticas são bastante exigentes quanto às condições de crescimento. Segundo Buchta, (1983) os açúcares representam as melhores fontes de carbono para estas bactérias, havendo, também, necessidade de nitrogênio, vitaminas e sais minerais para o bom desempenho da fermentação láctica. Diversos subprodutos e matérias-primas da agroindústria e indústria de alimentos têm sido empregados para a produção de ácido láctico, pela alta disponibilidade e baixo custo, tais como, bagaço, melaço e caldo de cana de açúcar, soro de queijo, além da 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 e do tempo de fermentação (BOUDRANT et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar micro-organismos produtores de D-(-) e L-(+) ácido láctico, os quais são utilizados na síntese de polímeros empregados na produção de diversos materiais resistentes e biodegradáveis, além de otimizar a produção de ácido láctico, a partir da utilização de diversos resíduos agroindustriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O ácido láctico

O ácido láctico (ácido 2-hidroxipropânico), $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ é um ácido orgânico, tem um átomo de carbono assimétrico com quatro grupos diferentes ligados a ele: $-\text{COOH}$, $-\text{H}$, $-\text{OH}$ e CH_3 . Existe em duas formas enantioméricas (Figura 1)

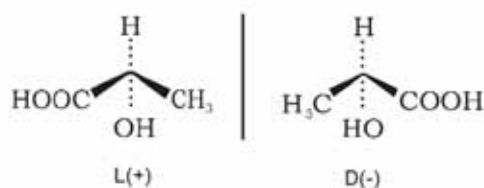


Figura 1 – Estereoisômeros do ácido láctico

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). Aproximadamente 90% do total do ácido láctico produzido no mundo ocorrem por fermentação por bactérias (ZHOU et al., 2006). Além disso, a síntese química do ácido láctico sempre produz uma mistura racêmica. A pureza enantiomérica do ácido láctico é fator crucial nas propriedades físicas do PLA (SODEGARD; STOLT, 2002).

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 (Tabela 1), assim, aquelas que produzem mais de 75% do isômero L-(+) lactato, são referidas como do tipo L; as que produzem mais que 75% do isômero D-(-) lactato, são referidas como tipo D; e aquelas que produzem os dois isômeros

em proporções intermediárias são classificadas como tipo D,L (KANDLER, 1983; MANOME et al., 1998; VIANA et al., 2005; CURRY; CROW, 2003).

Tabela 1

Isômero de ácido láctico produzido por bactérias lácticas

Nome da bactéria	D-(-) ácido láctico	L-(+) ácido láctico	D,L ácido láctico
<i>Lb. acidophilus</i>	Não	Não	Sim
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Sim	Não	Não
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Sim	Não	Não
<i>Lb. helveticus</i>	Não	Não	Sim
<i>Lb. casei</i>	Não	Sim	Não
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	Não	Sim	Não
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Não	Sim	Não
<i>Lb. rhamnosus</i>	Não	Sim	Não
<i>Lb. plantarum</i>	Não	Não	Sim
<i>L. lactis</i>	Não	Sim	Não
<i>S. thermophilus</i>	Não	Sim	Não
<i>Leuconostoc</i> sp.	Sim	Não	Não

(a) Algumas estirpes produzem D-(-) e L-(+) ácido láctico (Fonte: CURRY e CROW, 2003).

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).

O ácido láctico é um produto amplamente empregado na indústria têxtil, farmacêutica, química, alimentícia, entre outros (WEE et al., 2004; ALTAF et al., 2005). O uso do ácido láctico na indústria farmacêutica está relacionado à produção de cosméticos, formulação de pomadas, loções, preparação de soluções anti-acne e umectantes. O lactato de cálcio pode ser usado como terapia na deficiência de cálcio, além disso, pode atuar como um agente de eliminação de carie dental (NARAYANAN et al., 2004). Na indústria alimentícia o ácido láctico é empregado como aditivo, acidulante, flavorizante, aromatizante e emulsificante (fabricação de pães e derivados, doces, balas), além de inibir a esporulação de bactérias em alimentos processados (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000; NARAYANAN et al., 2004; NAVEENA et al., 2005). Na indústria química é empregado na produção de solventes orgânicos e na produção de 1,2-propanodiol e ácido acrílico (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000; NARAYANAN et al., 2004).

A produção mundial de ácido láctico em 2006 foi estimada entre 130.000 e 150.000 toneladas métricas por ano, sendo que o preço do ácido láctico com 50% de pureza era de US\$ 1,38/Kg e com 88% de pureza era US\$ 1,54/Kg (WEE et al., 2006). A demanda de ácido láctico tem aumentado e é estimado um crescimento de 19% ao ano, principalmente devido ao seu emprego na produção de polímeros biodegradáveis como o ácido polilático (PLA), que pode ser o substituto dos polímeros derivados do petróleo (DATTA et al., 1995, WEE et al., 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 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 et al., 2003; TUOMINEN; JUKKA, 2003).

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

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

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

No processo de síntese do PLA, duas moléculas de ácido láctico passam por um processo de esterificação e ciclização catalítica para fazer um éster de dilactídeo cíclico (Figura 2). Esse processo de dimerização gera água, que pode ser separada antes da polimerização, devido a uma queda significativa na polaridade. PLA de alto peso molecular é

produzido a partir do éster dilactídeo, pela abertura do anel de polimerização, usando um catalisador (octoato de estanho). Este mecanismo não gera molécula de água adicional e, portanto, é possível obter uma vasta gama de pesos moleculares (WIKIPÉDIA, 2011).

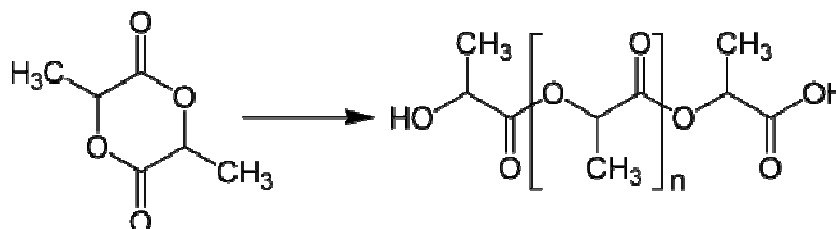


Figura 2 – Síntese do poli-ácido láctico

A pureza enantiômerica do ácido láctico é fator crucial nas propriedades físicas do PLA. A polimerização de uma mistura racêmica de L-(+) ou D-(-) ácido láctico geralmente leva à síntese de PDLLA, que é amorfa. O grau de cristalinidade e, muitas outras propriedades importantes, são controladas pela razão dos enantiômeros D e L usados (SODEGARD; STOLT, 2002). Devido a natureza quiral do ácido láctico, várias formas distintas de polímeros podem existir: PLLA é o produto resultante da polimerização do L-(+) ácido láctico. PLLA tem uma cristalinidade de aproximadamente 37%, temperatura de fusão entre 173 e 178°C. A temperatura de fusão do PLLA pode ser aumentada em 50°C e sua temperatura de deflexão térmica pode ser aumentada em aproximadamente 60°C à até 190°C, pela mistura física com o polímero PDLA, o que pode formar um estéreoconjunto altamente regular com cristalinidade aumentada. A estabilidade de temperatura é maximizada quando uma mistura 50:50 é usada, mas mesmo em baixas concentrações de 3 a 10% de PDLA, ainda há uma melhora substancial. Neste último caso, PDLA atua como agente de nucleação, aumentando assim a velocidade de cristalização. Entretanto, devido à maior cristalinidade do PDLA, a sua biodegradação é mais lenta do que para o PLA (WIKIPÉDIA, 2011).

2.2 Micro-organismos envolvidos na produção de ácido láctico

O ácido láctico pode ser produzido por bactérias, por algumas leveduras e por alguns fungos filamentosos. Os fungos filamentosos (*Rhizopus*) ainda são pouco utilizados para a produção de ácido láctico, pois o processo necessita de biorreatores, com alta taxa de aeração, pois são obrigatoriamente aeróbios. Além disso, a eficiência dos processos produtivos utilizando esses micro-organismos é baixa, devido à menor taxa de reação causada pela

limitação à transferência de massa (PARK et al., 1998) e à formação de bioprodutos como ácido fumárico e etanol (TAY; YANG, 2002).

A produção de ácido láctico é feita, principalmente, por bactérias lácticas. Os gêneros que compreendem essas bactérias são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, assim como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Figura 3).

Desses, o *Lactobacillus* é o maior gênero de bactérias lácticas, com mais de 125 espécies e subespécies (AXELSSON, 2004; EUZEBY, 1997; LIMSOWTIN et al., 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).

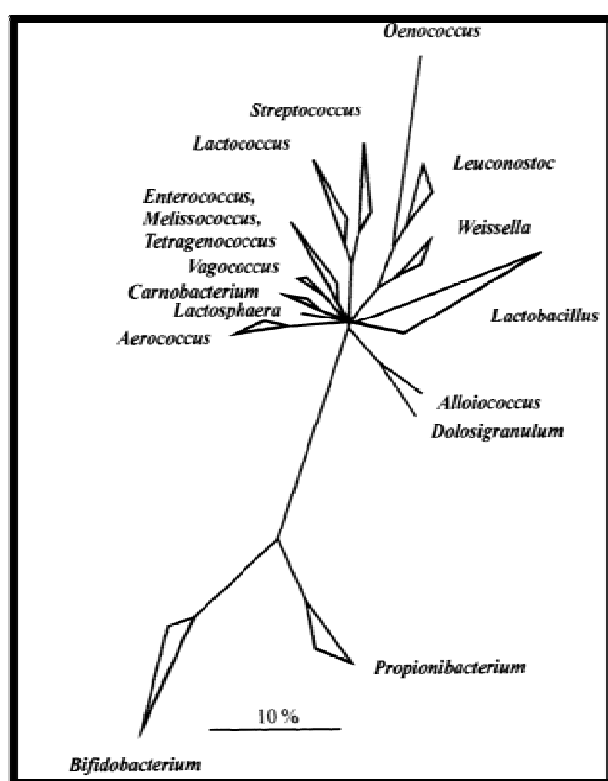


Figura 3 – Principais grupos filogenéticos de bactérias lácticas e bactérias relacionadas gram-positivas.

O metabolismo dos carboidratos pelas bactérias lácticas pode ser classificado como homofermentativo ou heterofermentativo (Figura 4). A fermentação homofermentativa ou glicólise segue a rota de Embden-Meyerhof-Parnas e fornece exclusivamente lactato como produto final. Já a fermentação heterolática segue a rota do fosfogliconato fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e CO_2 em quantidades equimolares (LEHNINGER et al., 2002).

No metabolismo homofermentativa ocorre a degradação anaeróbica da glicose para produzir o ácido láctico. A glicólise é uma das inúmeras vias catabólicas conhecidas genericamente como fermentações anaeróbicas, através das quais muitos organismos extraem energia química de vários combustíveis orgânicos, na ausência do oxigênio molecular (LEHNINGER et al., 2002).

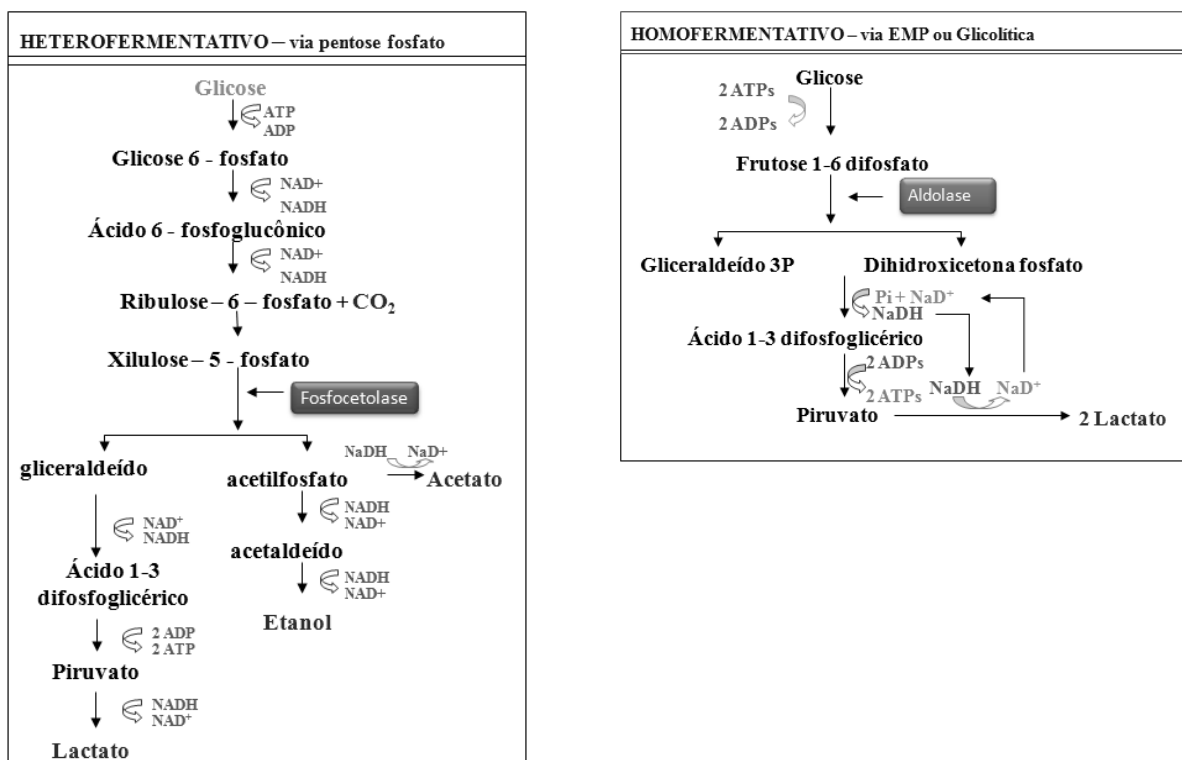


Figura 4 – Metabolismos de bactéria láctica

2.2.1 Streptococcus

Streptococcus está entre as primeiras bactérias reconhecidas pelos microbiologistas, por causa do seu envolvimento em um grande número de doenças humanas e de animais. *Streptococcus* foi o nome genérico usado pela primeira vez para descrever bactérias que formam correntes de cocos, associadas a infecções em feridas. Os estreptococos apresentam complexas exigências nutricionais e necessitam de uma boa oferta de carboidratos e proteínas,

incluindo os tecidos e trato intestinal dos animais, leite, laticínios, material vegetal e outros alimentos (STILES et al., 1997). São classificados em *Streptococcus* patogênicos e *Streptococcus* oral.

S. thermophilus é uma exceção neste gênero, pois é um organismo importante na fabricação de iogurte e queijo. Cresce em 45 °C e até a 50 °C, mas não a 15°C e é relativamente resistente ao calor. *S. thermophilus* foi, assim, classificado no gênero *Streptococcus* e foi reclassificado como pertencente ao grupo dos streptococcus orais, é considerado uma subespécie de *S. salivarius* (FARROW; COLLINS, 1984). Ele é utilizado juntamente com *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. lactis* e *Lb. helveticus*, a uma temperatura ótima de incubação acima de 40°C, na fabricação de iogurte e leites fermentados relacionados, bem como em queijos do tipo suíço e italiano. *S. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* têm uma relação especial de desenvolvimento associativo, em que a estirpe de *Streptococcus* produz ácido fórmico, que promove o crescimento de *Lactobacillus*, que em troca, fornece compostos que conferem sabor, como o acetaldeído e realizam atividade proteolítica, que mantêm a estirpe de *Streptococcus* crescendo no leite (STILES et al., 1997).

2.2.2 *Lactobacillus*

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

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

Os *Lactobacillus* são descritos como um grupo heterogêneo de bastonetes Gram positivos, não formadores de esporos, mesófilos ou termófilos, catalase negativos, apresentam forma de bastonetes, são anaeróbios ou aerotolerantes (STILES et al., 1997; HUANG; TANG, 2007; SNEATH et al., 2001). Além disso, apresentam capacidade biossintética limitada e dependência de meio nutricional complexo, com vitaminas e aminoácidos para o crescimento (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Eles crescem em diferentes habitats, tais como plantas, solo, água, esgoto e esterco, alimentos fermentados (leite, carne e vegetais), cereais, silagem, alimentos deteriorados, cerveja, frutas e grãos, peixes, indústrias de processamento de açúcar, leite, carnes, bebidas fermentadas e a cavidade oral e o trato intestinal de seres humanos. Eles

são acidófilos, produzindo pH 4,0 em alimentos contendo carboidratos fermentáveis, como resultado, muitas vezes suprimem o crescimento ou matam outras bactérias. É geralmente aceito que os *Lactobacillus* crescem até um pH máximo de 7,2, apesar de existirem exceções com relação ao substrato e a estirpe. *Lactobacillus* são usados como culturas iniciadoras em muitas variedades de queijo, alimentos vegetais fermentados, carnes fermentadas, vinho e cerveja, pão e silagem. O atual estado da taxonomia de *Lactobacillus* baseada na subdivisão clássica fenotípica está mostrada na Tabela 2.

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

O grupo 2 inclui os *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos, fermentam hexoses em ácido lático e podem produzir gás a partir de gluconato, mas não a partir de glicose. Eles também fermentam pentose por fosfocetolase induzível para produzir ácido lático e acético. Importantes espécies neste grupo são o *Lb. casei* e *Lb. plantarum*, estão associados com muitos habitat, incluindo produtos lácteos, silagem, boca e intestino humano e esgoto. *Lb. plantarum* é utilizado como “starter” em alguns embutidos fermentados e produtos de cereais, cresce em vegetais fermentados e produtos de carne e está relacionado à deterioração em citros, sucos, vinho e queijos. Um terceiro subgrupo do grupo 2 de *Lactobacillus* inclui o *Lb. curvatus* e *Lb. sake* que tem importante associação com alimentos. O grupo 3 inclui os heterofermentativos obrigatórios que fermentam hexose em ácido lático, ácido acético e ou etanol e dióxido de carbono. A produção de gás a partir de glicose é uma característica dessas bactérias. A maioria dos *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios estão associados com fermentações de alimentos, sendo que o *Lb. sanfrancisco* converte maltose em ácido lático, ácido acético e em compostos flavorizantes, dando aroma ao pão de massa azeda. Entretanto, alguns, como o *Lb. bifementans* podem causar deterioração de alimentos, provocando rachaduras em queijo Gouda e Edam, devido a produção de gás. Outros como o *Lb. brevis* causa deterioração em frutas cítricas, vinho e cerveja, *Lb. fructivorans*, *Lb. brevis* e *Lb. buchneri* causam deterioração em maionese (DAKIN; RADWELL, 1971).

Tabela 2

Principais divisões dentro do gênero *Latobacillus* baseado nas características fenotípicas.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Homofermentativos obrigatórios	Heterofermentativos facultativos	Heterofermentativos obrigatórios
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. agilis</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. collinoides</i>
<i>Lb. aviarius</i>	<i>Lb. bifermentans</i>	<i>Lb. fermentum</i>
subsp. <i>araffinosus</i>		
subsp. <i>aviarius</i>		
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fructivorans</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. fructosus</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	subsp. <i>coryniformis</i>	
subsp. <i>delbrueckii</i>	subsp. <i>torquens</i>	
subsp. <i>lactis</i>		
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. hamsteri</i>	<i>Lb. malefermentans</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. homohiochii</i>	<i>Lb. oris</i>
<i>Lb. jensenii</i>	<i>Lb. intestinalis</i>	<i>Lb. panis</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lb. murinus</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>
<i>Lb. kefiranofermentans</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. parakefir</i>
	subsp. <i>paracasei</i>	
	subsp. <i>tolerans</i>	
<i>Lb. kefirgranum</i>	<i>Lb. paraplantarum</i>	<i>Lb. pontis</i>
<i>Lb. Mali</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. ruminis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. sanfrancisco</i>
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. suebicus</i>
subsp. <i>salicinus</i>		
subsp. <i>salivarius</i>		
<i>Lb. sharpeae</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. vaccinofermentans</i>
		<i>Lb. vaginalis</i>

Fonte: Stiles et al., (1997)

2.2.3 *Leuconostoc*

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

origem vegetal, é geralmente, o primeiro organismo a crescer e é seguido pelos *Lactobacillus* mais tolerantes.

Estirpes de *Leuconostoc* de vinho que crescem em meio ácido foram classificadas como *Leuc. oenos* (GARVIE, 1967). São representadas por estirpes que são tipicamente acidófilas e crescem em mostos de uvas e vinhos em pH de 3,5 e não são inibidas por 10 % de etanol. Eles são responsáveis pela fermentação malolática de vinhos e cidras, em que L-malato é convertido a L-(+) lactato e CO₂, por outro lado, D-(-) lactato é produzido a partir de glicose por todos *Leuconostoc* spp.

2.2.4 *Pediococcus*

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

Pediococcus são mais freqüentemente encontrados em baixo número, junto com *Leuconostoc* e *Lactobacillus* em plantas e vários alimentos e como agentes de deterioração em bebidas alcoólicas como a cerveja, além disso, são importantes como bactérias “starter” em fermentações de salsicha. Alguns como *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* produzem bacteriocinas. Exigem carboidrato fermentável para o crescimento e crescem pouco em meios que contenham lactose. A fermentação da glicose segue a via de Embden-Meyerhof com D,L ou L-(-) lactato como produto final. O piruvato pode ser desviado para outros produtos finais como diacetil e acetoína, que são muitas vezes produzidos por *P. damnosus*, enquanto *P. pentosaceus* produz quantidades equimolares de lactato e acetato a partir de pentoses (FUKUI et al., 1957). Algumas espécies apresentam tolerâncias a temperaturas extremas, assim como a pH e NaCl extremos. Por exemplo, *P. acidilactici* cresce a 50°C, *P. damnosus* e *P. parvulus* são ácido tolerantes e crescem em temperatura baixa. *P. damnosus* produz diacetil, mas sob condição de limitação de crescimento, produzem acetoína e diacetil.

2.2.5 *Lactococcus*

Lactococcus são gram positivo, as células se apresentam no formato de cocos, produzem L-(+) ácido láctico a partir de lactose em temperatura entre 20 e 30°C após 10 à 20 h. Tem necessidades nutricionais complexas. Sua temperatura ótima de crescimento é 30°C, não crescendo a 45°C (HOLT et al., 1994). São aneróbios, mas são capazes de crescer na presença de oxigênio parcialmente, devido à presença de certas enzimas que metabolizam oxigênio, como superóxido desmutase ou NADH oxidases. Como resultado da microaerofilia, não requer ambiente completamente livre de oxigênio, o que facilita a aplicação industrial dessa espécie em larga escala (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

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

2.2.6 *Enterococcus*

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* são Gram-positivos, apresentam células na forma de cocos, dispostas separadamente, em par, ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, apresentam metabolismo homofermentativo, sendo o L-(+) ácido láctico o produto predominante a partir de glicose. Apresentam complexo requerimento nutricional, necessitam de muitas vitaminas, biotina, pirodoxina, riboflavina, pantotenato e muitos aminoácidos, têm habilidade de crescer a 10°C e a 45°C, além de crescer em meio com 6,5% de NaCl e a pH 9,6 (SCHILLINGER; LÜCKE, 1987; WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

São importantes na microbiologia de alimentos e clínica. São micro-organismos ubíquos, mas seu habitat predominante é no trato gastrointestinal de humanos e animais. Eles ocorrem como contaminantes naturais de carnes. *Enterococcus* são, também, importantes na produção de vários alimentos fermentados tais como queijo e sausicha, pois são utilizados

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

2.2.7 Outras Bactérias lácticas

Os *Carnobacterium* produzem L-(+) ácido láctico e apresentam células na forma de bacilos, são Gram +, se assemelham aos *Lactobacillus*, com a diferença de que não crescem em meio acetato. Os *Tetragenococcus* requerem NaCl para crescer e crescem em 18% de NaCl, produzem L-(+) ácido láctico, cocos formadores de tétrade. Os *Vagococcus* se caracterizam por ter representantes no meio aquático, não formam esporos, podem ocorrer em pares, pequenas redes ou mesmo sozinhos, produzem L-(+) ácido láctico a partir da glicose (HOLT et al., 1994).

2.2.8 Caracterizações de bactérias lácticas.

As bactérias lácticas são caracterizadas de acordo com sua morfologia, fisiologia e características bioquímicas. São avaliadas quanto a coloração de Gram; produção de catalase; citocromo oxidase; hidrogênio peroxidase; crescimento entre 15° e 45°C; produção de ácidos a partir de carboidratos (L-arabinose, celobiose, D-frutose, D-galactose, esculina, lactose, maltose, melizitose, melibiose, manitol, D-manose, rafinose, ramnose, D-ribose, salicina, sorbitol, sacarose, trealose e D-xilose) em meio de crescimento Man Rogosa Sharpe (MRS) com vermelho de clorofenol como indicador; produção de ácido e gás a partir de 1% glicose (meio de crescimento MRS sem extrato de carne); teste de vermelho de metil e Voges-Proskauer; produção de amônia a partir de arginina; redução de nitrato; produção de indol e crescimento em ágar acetato (NAIR; SURENDRAN, 2005).

De acordo com o Holt et al., (1994) os principais testes bioquímicos a serem realizado para identificar cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos são: arranjo das células; motilidade; crescimento a 10°C e 45°C, a pH 9,6; crescimento com 6,5 % NaCl (Tabela 3) e 40% bile; reação de catalase; presença de citocromo; produção de ácidos a partir de carboidratos; posição do peptideoglicano; presença de ácido teicóico nas parede celular e conteúdo G+C do DNA.

A caracterização de bactérias lácticas pode ser realizada com base em suas propriedades fenotípicas, como sua morfologia, fisiologia, tipo de fermentação a partir da glicose,

crescimento em diferentes temperaturas, tipo de isômero de ácido lático produzido, fermentação de vários carboidratos (TSAKALIDOU et al., 1994). Portanto é essencial que haja um método simples e efetivo de identificação das bactérias lácticas (COX et al., 1990), como os kits de identificação comerciais, que identificam as espécies, com base em um princípio de correspondência de padrões, de acordo com a morfologia geral, com as características fisiológicas, bem como com a habilidade da bactéria em utilizar diferentes fontes de carboidratos (WIJTZES et al., 1997).

Entretanto, métodos fenotípicos podem apresentar ambigüidade e falta de reprodutibilidade devido às variações no crescimento bacteriano, além do baixo poder discriminatório, uma vez que alguma propriedade específica que diferencia a bactéria pode não estar disponível nos kits de identificação (MOHANIA et al., 2008). A identificação molecular é mais sensível e os resultados são mais confiáveis (LICK, 2003; CALLON et al., 2004).

Tabela 3

Características diferenciais de bactérias lácticas (Hold et al., 1994).

Características ^a	Bacilos		Cocos							
	Carnob	Lb.	Aeroc.	Enteroc.	Lc.	Leuc.	Pedioc.	Streptoc	Tetragenoc	Weissella ^b
						Vagoc.	Oenoc.			
Tetrad	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ ^c	- ^e	±	-	-	-	+	-	-	-	+
10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
6,5% de NaCl	ND ^f	±	+	+	-	±	±	-	+	±
18% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Ácido lático ^d	L	L, D, DL ^g	L	L	L	D	L, DL ^g	L	L	D, DL ^g

^a + positivo, - negativo, ± resposta varia de acordo com a espécie; ND: não determinado

^b *Weissella* pode apresentar forma de Bacilos.

^c Teste para homo ou heterofermentativo a partir de glicose, negativo e positivo denota homofermentativo e heterofermentativo respectivamente.

^d Configuração do ácido lático produzido a partir de glicose

^e Baixas quantidades de CO₂ podem ser produzidas, dependendo do meio.

^f Não foi observado crescimento a 8% de NaCl.

^g Produção de D, L ou DL ácido lático varia de acordo com a espécie.

A taxonomia de bactérias lácticas baseada na comparação do rDNA 16S tem revelado que alguns taxa criados com base em características fenotípicas não correspondem com suas relações filogenéticas (MOHANIA et al., 2008). Porém para a identificação de linhagens de bactérias lácticas nos grupos de *Lb. casei* e *Lb. delbrueckii* rDNA 16S não foi específico o suficiente (SCHLEIFER et al., 1995).

Desta forma, uma identificação deve combinar métodos convencionais, baseados nas características microbiológicas e bioquímicas e também em métodos genotípicos (EHRMANN et al., 2005)

2.3 Produção de ácido láctico por fermentação utilizando diferentes resíduos agroindustriais.

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

Para otimizar a produção de ácido láctico, alguns parâmetros devem ser considerados durante a fermentação: 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).

Em seu estudo, Naveena et al., (2005) fizeram uma varredura dos parâmetros nutricionais e físicos para a produção de L-(+) ácido láctico. Utilizando a fermentação em estado sólido para *Lactobacillus amylophilus* GV6, relataram o efeito da peptona, extrato de levedura, citrato de amônio, extrato de carne, AMM, hidrolisado de caseína, pH, tamanho do inóculo, período de incubação, tampão carbonato de cálcio, o surfactante “Tween 80”, os minerais $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , e o acetato de sódio na produção de ácido láctico. De acordo com esses pesquisadores, o extrato de levedura, a peptona, o citrato de amônio, o $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e o surfactante “Tween 80” melhoraram a produção de ácido láctico quando do aumento de seus níveis no meio de cultivo. Nos casos de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, acetato de sódio, AMM, extrato de carne, hidrolisado de caseína, pH, carbonato de cálcio (CaCO_3), período de incubação e $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram considerados parâmetros não significativos.

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

2.3.1 Fontes de carbono

A fonte de carbono para produção microbiana de ácido láctico pode ser o açúcar em forma pura como glicose, sacarose e lactose. Entretanto, esses açúcares são muito caros. Dessa forma, diferentes produtos alimentícios e agroindustriais, ou resíduos são alternativas mais baratas do que açúcares refinados para produção de ácido láctico, tais como melaço, soro de queijo, bagaço de cana, melaço de beterraba (GOKSUNGUR; GUVENC, 1999; KOTZAMANIDIS et al., 2002), amido de batata, tapioca e trigo (JOHN et al., 2006; ANURADHA et al., 1999).

2.3.1.1 Soro de queijo

Durante a fabricação do queijo é gerado um resíduo líquido, conhecido como soro de queijo, proveniente da coagulação das proteínas do leite, que ocorre com a utilização de ácidos ou enzimas proteolíticas (USDEC – United States Dairy Exporters Council, 2004). O soro de queijo pode ser classificado como ácido ou doce, dependendo, principalmente, da técnica usada para remover a caseína do leite. Na fabricação dos queijos mussarela, cheddar e suíço, por exemplo, a coagulação das proteínas é feita por um processo enzimático e o soro resultante é classificado como doce, com acidez titulável entre 0,10 e 0,15 %. Já na fabricação dos queijos cottage e ricota, ocorre a adição de ácido (láctico, cítrico ou acético) para promover a coagulação. Além disso, uma quantidade significativa de lactose é convertida a ácido láctico, antes que o soro seja separado da massa. Dessa forma, o soro produzido é classificado como ácido, com acidez titulável entre 0,35 e 0,44 % (USDEC, 2004). O soro doce possui uma maior quantidade de lactose. O soro ácido apresenta maior quantidade de ácido láctico e uma menor quantidade de proteínas. A sua utilização pela indústria alimentícia é limitada, devido ao sabor azedo e ao alto teor de sais (MAWSON, 1994)

O principal componente de ambos, queijo ácido e doce é a lactose (aproximadamente 70-72 % do total de sólidos), proteína de soro (aproximadamente 8-10 %) e minerais (aproximadamente 12-15 %) (JELEN, 2003). As principais diferenças entre os dois tipos de soros estão no conteúdo mineral, na acidez e composição da proteína do soro (Tabela 4).

Tabela 4

Composição típica de soro doce e ácido.

Componentes	Soro doce (g/L)	Soro ácido (g/L)
Sólidos totais	63-70	63-70
Lactose	46-52	44-46
Proteínas	6-10	6-8
Cálcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfato	1-3	2-4,5
Lactato	2	6,4
Cloreto	1,1	1,1

(Fonte: JELEN, 2003)

Este subproduto representa 85 a 95 % do volume do leite e retém 55 % dos seus nutrientes. Entre esses nutrientes destacam-se a lactose (4-5 %), as proteínas solúveis (0,6-0,8 %), os lipídeos (0,4-0,5 %) e os sais minerais (8-10 % do extrato seco). Os sais minerais são essencialmente os mesmos presentes no leite. Dentre os mais importantes destacam-se os sais de sódio e potássio, que representam a metade do total. O restante é formado por sais de cálcio, magnésio e fósforo. Há também a presença de ácido láctico (0,1-0,8 %), ácido cítrico, compostos nitrogenados não protéicos (uréia e ácido úrico), vitaminas do complexo B e proteínas – em sua maior parte globulina e albumina (MADRID et al., 1995).

As indústrias de laticínio geram quantidades significativas de resíduos líquidos que requerem um alto capital investido para armazená-los. Para cada 1 Kg de queijo produzido gera-se, em média, 9 Kg de soro (SISO, 1996). A produção mundial de soro de queijo no ano de 2001 foi de aproximadamente 100 bilhões de litros (ALVES FILHO, 2002). Aproximadamente 85% do total de leite usado para fabricação do queijo é descartado como soro e a maioria dessas indústrias não tem um sistema de tratamento para eliminá-lo.

Essa disposição como resíduo causa sérios problemas de poluição para o meio ambiente, pois afeta a estrutura física e química do solo, resultando em um decréscimo na produção agrícola. Além disso, quando o soro é liberado em corpos de água, reduz a vida aquática, devido ao esgotamento do oxigênio dissolvido (GONZALEZ-SISO, 1996; MARWAHA; KENNEDY, 1988). Assim, o soro de queijo representa uma grande ameaça ao meio ambiente e a saúde humana, sendo urgentemente necessária uma solução permanente. A maioria dos países industrialmente desenvolvidos tem legislação mais rigorosa que regem o escoamento dos efluentes. Há tecnologia de tratamento de águas residuais que podem ajudar na eliminação segura do soro de queijo dentro das especificações ambientais, mas estes são caros. Para superar este problema, a melhor alternativa seria submeter o soro a processos em

que possa ser manufaturado, e que contribua totalmente ou parcialmente para os custos de eliminação.

As proteínas contidas no soro, por exemplo, podem ser separadas por ultra filtração e utilizadas como suplemento alimentar e como matéria-prima para a fabricação de produtos nutricionais. Entretanto, a recuperação das proteínas pouco contribui para a diminuição da carga poluente do soro, formada principalmente pela lactose presente no permeado (MAWSON, 1994). Logo, é de grande interesse o estudo das diversas possibilidades de utilização desse açúcar. A lactose no soro e a presença de outros nutrientes para o crescimento de micro-organismos faz do soro um material potencial para a produção de diferentes produtos biotecnológicos.

Um dos caminhos mais promissores é utilizá-lo como fonte de carbono para a produção de ácidos orgânicos por fermentação. Muitos trabalhos têm sido realizados, ultimamente, visando à produção de ácido láctico por fermentação, utilizando a lactose presente no soro (FU; MATHEWS, 1999).

2.3.1.2 Melaço

O melaço é um resíduo industrial da destilação do processo de fabricação do açúcar, álcool e cachaça. Aproximadamente 17,9 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil durante a fabricação do açúcar. Devido sua composição rica em açúcares fermentescíveis (LIMA et al., 1975), nitrogênio e vitaminas, seu baixo custo e alta disponibilidade no território brasileiro, o melaço de cana-de-açúcar é sugerido como substrato para melhorar e reduzir os custos na produção de ácido láctico.

Entretanto, a maioria dos resultados sobre o ácido láctico produzido (17–90 g/L) e a produtividade (2,0–4,0 g/L h) em fermentações em batelada é relativamente baixa (MONTEAGUDO et al., 1994; GOKSUNGUR; GUVENC, 1997; GOKSUNGUR; GUVENC., 1999; KOTZAMANIDIS et al., 2002). Assim, pode ser necessário o tratamento adicional do melaço com ácido sulfúrico, fosfato tri-cálcico, ferrocianeto de potássio e EDTA, para aumentar a eficiência na fermentação, porque o melaço contém metais pesados (ferro, zinco, cobre, manganês), além de magnésio, cálcio, que podem inibir o crescimento celular, afetar o pH do meio, e inativar as enzimas associadas com a formação do produto (ROUKAS, 1998). Desta forma, Martínez-González et al., (1988) avaliaram a fermentação láctica do *Lb. delbrueckii* em meio de melaço de cana-de-açúcar hidrolisado com ácido sulfúrico e calor e

obtiveram considerável quantidade de açúcares invertidos, obtendo 66,81 g/L de ácido láctico em fermentador de 2L, contendo 95 g/L de açúcares redutores totais no melaço. O pH foi mantido a 5,8; a agitação foi de 150 rpm e temperatura de 40 °C.

Oliveira et al., (2005) avaliaram a produção de ácido láctico, biomassa e consumo de açúcar redutor pelo *Lb. curvatus* e observaram que apesar do melaço utilizado apresentar em sua composição uma concentração elevada de carboidratos (70,8 g/L), a conversão em ácido láctico não foi satisfatória, acreditam que isso tenha ocorrido pois o melaço é procedente do processamento de cana-de-açúcar proveniente de lavouras que geralmente recebem aplicação de herbicidas, pesticidas e resíduos químicos, os quais podem aparecer na composição do mesmo, podendo prejudicar o processo fermentativo.

2.3.1.3 Caldo de cana de açúcar

Caldo de cana é o líquido extraído da cana-de-açúcar no processo de moagem. O caldo de cana de açúcar contém 13 % a 16 % de sacarose, sendo considerada uma fonte de carbono renovável, abundante e de baixo custo, sendo usado como matéria-prima na fabricação de açúcar, etanol e cachaça. O caldo conserva todos os nutrientes da cana-de-açúcar, entre eles minerais (de 3 a 5 %) como ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio e cloro, além de vitaminas do complexo B e C. A planta contém ainda glicose (de 2 % a 4 %), frutose (de 2 % a 4 %), proteínas (0,5 % a 0,6 %), amido (0,001 % a 0,05 %) ceras e ácidos graxos (0,05 % a 0,015 %) e corantes, entre 3 % a 5 %, além de composto antioxidantes, como os ácidos fenólicos e flavonóides (PATON et al., 1992; MCGHIE, 1993).

2.3.1.4 Manipueira

A manipueira é o líquido resultante da prensagem da massa ralada para produção de farinha e do processo de extração e purificação da fécula de mandioca. É o resíduo mais problemático, por possuir elevada carga poluente e efeito tóxico devido à liberação do cianeto, causando sérios problemas ao meio ambiente quando lançada em cursos d'água (CEREDA, 2001).

A manipueira é um resíduo rico em carboidrato, gerado em grande quantidade durante a produção de farinha de mandioca. A mandioca está entre os seis principais produtos da agricultura (trigo, arroz, milho, batata, aveia e mandioca) com uma estimativa de produção

mundial de 160 milhões de toneladas por ano (FAO, 2005). A produção de 1 t de farinha de mandioca gera 300 L de manipueira, conseqüentemente, o tratamento e a disposição da manipueira representam um alto custo na produção industrial de farinha de mandioca, assim como um problema ambiental. Desse modo, há uma grande necessidade de uma melhor gestão dos resíduos. A sua utilização como matéria-prima nos processos biotecnológicos é uma alternativa viável que pode contribuir para uma redução nos custos de produção, diminuição dos impactos ambientais, além de aumentar o valor econômico do resíduo. Existem relatos na literatura da utilização da manipueira para produção de surfactina por *Bacillus subtilis* (NITSCHKE; PASTORE, 2006), óleos essenciais por *Fusarium oysporum* (MAROSTICA; PASTORE, 2007.), ácido cítrico por *Aspergillus niger* (LEONEL; CEREDA, 1995), além de polihidroxialcanoato e rhamnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* (COSTA et al., 2009).

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

2.3.2 Fontes de nitrogênio

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

Melaço suplementado com extrato de levedura influencia significativamente a concentração de ácido láctico, a biomassa e a utilização de açúcar. A importância do extrato de levedura pode ser explicada pelo fato de que contém quantidades críticas de vitaminas e elementos traços essenciais para a biossíntese de ácido láctico. Kotzamanidis et al., (2002)

investigaram o efeito do extrato de levedura na fermentação de ácido láctico a partir de melaço e reportaram que a fermentação de ácido láctico foi consideravelmente estimulada pelo aumento de extrato de levedura, assim como as células viáveis e a utilização de açúcar, todos aumentam com o acréscimo da concentração de extrato de levedura de 1 a 5 % (m/v), enquanto altas concentrações diminuem a produção, indicando que essas concentrações de extrato de levedura devem ser tóxicas. Máxima concentração de ácido láctico (90 g/L), de número de células viáveis ($0.8 \cdot 10^5$ U.F.C/mL) e de utilização de açúcar (93 %) foram obtidos em meio suplementado com 5 % (m/v) de extrato de levedura. Esses resultados estão em contraste com os obtidos por Goksungur e Guvenc, (1997) que estudaram o efeito do extrato de levedura na produção de ácido láctico a partir de melaço de beterraba por *Lb. delbrueckii* IFO 3202 e obtiveram uma concentração máxima de ácido láctico (60 g/L) em meio suplementado com 1 % (m/v) de extrato de levedura.

Muitos fatores podem ser possíveis para essas diferenças, Kotzamanidis et al., (2002) ressaltaram que a estirpe do micro-organismo, a composição química do substrato, o sistema de fermentação, e geralmente as condições empregadas durante a fermentação estão entre os principais fatores relacionados a assimilação diferenciada de nutrientes pelo micro-organismo.

Em geral, os meios utilizados para o crescimento de bactérias lácticas não são economicamente atrativos, devido ao requerimento de nutrientes de custo elevado, como o extrato de levedura e a peptona (BUSTOS et al., 2004). Uma alternativa é a utilização de AMM, proteína de levedura cervejeira, dentre outras para otimizar o processo.

Bustos et al., (2004) avaliaram a produção de D-(-) ácido láctico, a partir da glicose por *Lactobacillus coryniformis*, utilizando AMM. Os pesquisadores definiram que para atingir a máxima concentração de ácido láctico 58,9 g/L, foi necessário usar baixas concentrações de AMM (5 g/L), altas de peptona (10 g/L) e valores intermediários de extrato de levedura (3 g/L) em 96 horas de fermentação. Entretanto, para atingir a produção máxima e econômica seriam necessários 5 g/L de AMM como única fonte de nitrogênio, em um tempo de fermentação de 44 horas.

2.3.3 Temperatura

A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento das bactérias lácticas. Existe uma temperatura ótima em que a taxa de crescimento é maior e depende das características do micro-organismo utilizado, assim como das condições do

ambiente. Quando a temperatura do meio é acima ou abaixo da requerida para um crescimento ótimo, a atividade microbiana é substancialmente reduzida e o organismo pode morrer (PELEG, 1995; ROSSO et al., 1995). A temperatura ótima para crescimento varia de acordo com o gênero do micro-organismo, entre 20° e 45°C (DICKS et al., 1995; WOOD; HOLZAPFEL, 1995). A maioria dos *Lactobacillus* é mesófilo, entretanto, *Lb. bulgaricus* e *Lb. delbrueckii* podem ser agrupados na categoria dos termófilos. Em fermentações utilizando *Lb. delbrueckii* e *Lb. bulgaricus*, temperatura de 45°C ou maior deve ser mantida (BUCHTA, 1983). Para *Lb. helveticus* e *Lb. acidophilus* pode ser usada temperatura entre 37 – 45°C. Entretanto, para outras bactérias, como *Lb. casei*, temperatura de 28 – 35°C é preferida.

2.3.4 pH

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

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

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

O pH é um dos principais fatores que influenciam a produção de ácido lático, pois a atividade catalítica das enzimas e a atividade metabólica dos micro-organismos dependem do pH extra celular (SILVA; MANCILHA, 1991). Desta forma, a concentração do íon

hidrogênio durante a fermentação influencia o crescimento microbiano e a taxa de formação do produto. O pH influencia pelo menos dois aspectos das células microbianas, o funcionamento da enzima e o transporte de nutrientes dentro da célula. Isto pode limitar a atividade das enzimas metabólicas responsáveis pela síntese de novo protoplasma. Os valores de pH também afetam a síntese de RNA e de proteínas (KLOVRYCHEV et al., 1979).

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

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

Assim, o ácido láctico produzido durante a fermentação tem que ser constantemente neutralizado. Para controlar o pH durante a fermentação são utilizados alguns agentes neutralizantes, como carbonato de cálcio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio, adicionados ao meio de fermentação. Entre esses agentes, o carbonato de cálcio tem sido amplamente utilizado nas pesquisas com frascos agitados e em reator (HUANG et al., 2003; YIN et al., 1997, YU et al., 2008, YEN, 2010).

O hidróxido de sódio e o carbonato (TAY e YANG, 2002, LONGACRE et al., 1997), bem como o hidróxido de amônio (MARTAK et al., 2003, MIURA et al., 2003, MIURA et al., 2004), também, têm sido utilizado. Martak et al., (2003) descobriram que o CaCO_3 pode ser substituído por 25% de amônia, sem efeitos negativos sobre a produtividade de ácido láctico. Portanto, o excesso de consumo de CaCO_3 , assim como a cristalização de lactato de cálcio pode ser evitado. No entanto, existem alguns problemas associados com a adição de carbonato de cálcio e outros agentes de neutralização para o controle de pH. O ácido láctico possui um valor de pKa de 3,86 a 30°C. Assim, lactato em vez de ácido láctico é formado em um pH elevado, o que resultará em um aumento dos custos de purificação, devido a necessidade de recuperação do ácido láctico (YANG et al., 1995). Além disso,

quando o carbonato de cálcio é utilizado, o sulfato de cálcio pode ser produzido no processo de reconversão do lactato a ácido láctico, o que pode causar consideráveis problemas ambientais, além de custos extras.

2.3.5 Agitação

Kotzamanidis et al., (2002) estudaram a produção de ácido láctico, a partir de melaço, por *Lb. delbrueckii*, em frascos de Erlenmeyer, sob agitação orbital e sem agitação. As culturas crescida sem agitação e as que cresceram com agitação produziram a mesma quantidade de ácido láctico (45 g/L) após 24 horas e 18 horas respectivamente. O menor tempo de fermentação da cultura crescida sob agitação, provavelmente, é devido a melhor difusão do substrato dentro das células, melhorando a transferência de massa com respeito ao substrato e a formação de produto. A concentração de biomassa diminuiu após as primeiras 6 h de fermentação, enquanto ao mesmo tempo a produção de ácido láctico aumentou. Isto significa que não existe uma relação paralela entre a biomassa e a concentração de ácido láctico.

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

2.3.6 Tipos de fermentação

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

geralmente leva a maiores produtividades, principalmente se conduzidos em altas taxas de diluição.

2.3.7 Formação de subprodutos

Na produção fermentativa do ácido láctico pode haver a formação de subprodutos como ácido acético, ácido fórmico e dióxido de carbono, dependendo da estirpe utilizada e das condições do processo (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Uma produção industrial eficiente deve evitar ou minimizar a formação desses subprodutos. Os processos em batelada apresentaram uma maior eficiência do que os demais. Tal eficiência torna-se ainda maior quando a fermentação é anaeróbia.

Diferentes fontes de carbono podem levar a diferentes percentuais de subprodutos. Hofvendahl e Hahn-Hagerdar, (2000) mostraram que *Lc. lactis* produziu 67 % de ácido láctico a partir de maltose e 93 % de ácido láctico foi produzido a partir de glicose. Segundo estes autores, a utilização de pentoses resultou em maiores formações de ácido acético e etanol, conseqüentemente, diminuindo a produção de ácido láctico.

A formação de subprodutos difere de acordo com a espécie de bactéria e, também, com relação à fonte de carbono utilizada. Por exemplo, a frutose é metabolizada pela via da pentose fosfocetolase, mas alguns dos açúcares são reduzidos a manitol pela enzima manitol desidrogenase. *Leuconostoc mesenteroides*, uma bactéria láctica heterofermentativa, contém manitol desidrogenase para converter frutose em manitol, portanto produz ácido láctico, ácido acético, etanol, manitol e CO₂. Frutose é, também, metabolizada a manitol por *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri*. Ao contrário do *Leuc. mesenteroides*, essas duas bactérias são incapazes de formar etanol. Elas produzem ácido láctico, ácido acético, manitol e CO₂ (ERTEN, 1998).

2.4 Técnicas de planejamentos de experimentos e metodologia da superfície de resposta

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

Montgomery, (1991) recomendam o uso de técnicas clássicas de planejamento, como por exemplo: técnicas de planejamento fatorial completo, fatorial fracionado ou experimentos com pontos centrais.

Nos processos de produção industrial existem vários fatores e níveis de controle, que influenciam as características de qualidade dos produtos e um problema comum encontrado ao se realizar experimentos, é a necessidade de estudar simultaneamente o efeito desses fatores com diferentes níveis de controle. Neste caso, observa-se que o número de testes requerido para a experimentação tende a crescer à medida que a quantidade de fatores aumenta. Isso torna os experimentos industriais inviáveis, porque os custos e o tempo de execução são elevados.

Antony et al., (1998); Coleman e Montgomery, (1993); Montgomery, (1991), Steinberg e Hunter, (1984) sugerem que a solução desses problemas pode ser alcançada com mais facilidade quando os experimentos são planejados e as respostas analisadas com métodos ou técnicas estatísticas.

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

Uma estratégia sequencial para se atingir as condições otimizadas foi sugerida por Rodrigues e Iemma, (2005) e foi dividida em três etapas. Na primeira etapa, sugerem a seleção de variáveis, por meio de fatorial fracionado ou de Plackett Burman, esta etapa é realizada quando se tem muitos fatores, pouco conhecimento do processo, e se está longe das condições desejadas. Na segunda etapa é realizada a otimização por meio de um fatorial completo, quando se deseja construir modelos preditivos, a partir de poucos fatores, dentro de uma região ótima. Na terceira etapa, é realizada a validação das condições otimizadas, quando se deseja confirmar experimentalmente os resultados obtidos pela análise de superfície de resposta, neste caso as condições já estão otimizadas e definidas.

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

2.4.1 Planejamento fatorial

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

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

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

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

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

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

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bioprospecção de bactérias potencialmente produtoras dos estereoisômeros do ácido láctico.

3.1.1 Amostragem

Foram coletadas amostras de substratos industriais, principalmente da indústria sucro-alcooleira, tais como torta de filtro, bagacilho, melaço e caldo de cana de açúcar, além da própria água de lavagem da cana. Também foram coletadas amostras da indústria de laticínio (soro de queijo, catupiri, Keffir e iogurte), de carnes embutidas (bacon, salame, mortadela, lingüiça, carne de porco), da indústria de alimentos (chucrutes, vinhos, manipueira, AMM, picles), além de rúmen de boi e silagem, para seleção de bactérias potencialmente produtoras do isômero D e L do ácido láctico.

A amostra de soro de queijo (Figura 5 A) foi obtida no laticínio Tavolaro, situado na região de Brotas-SP. As amostras de torta de filtro e bagacilho de cana (Figura 5 B) foram coletadas na usina de açúcar e álcool J Pilon, situada na região de Cerquilha-SP.

Amostras de água de lavagem da cana-de-açúcar, melaço e bagacilho foram obtidas na Usina Sta. Lúcia, localizada na região de Araras-SP. A manipueira foi coletada na lagoa de

decantação da água residual do processamento da farinha de mandioca da fecularia Plaza, situada na região de Santa Maria-SP (Figura 5 C). As amostras de chucrute foram cedidas pelo prof. Dr. Jonas Contiero, da Unesp de Rio Claro. As amostras de rúmen de boi e de silagem foram obtidas no departamento de zootecnia da UNESP de Jaboticabal-SP. As carnes embutidas, os vinhos e os produtos lácteos, foram obtidos em supermercados, situados na cidade de Rio Claro-SP. A AMM foi cedida pela empresa Corn Products de Mogi Guaçu/SP. Todas as amostras utilizadas para o isolamento dos micro-organismos foram coletadas e armazenadas em recipiente estéril.



Figura 5 - Locais de amostragem para realização dos isolamentos; A- soro de queijo, B- Bagacilho de cana-de-açúcar, C- água de manipueira.

3.1.2 Isolamento de micro-organismos

Para isolar os micro-organismos de amostras de resíduo líquido (soro de queijo, manipueira, água de lavagem de cana, vinho, AMM) foram preparados 18 mL de meio de cultura Man, Rogosa and Sharpe (MRS). O meio MRS tinha a seguinte composição (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), K_2HPO_4 (5,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1) e $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,05). Este volume de meio foi inoculado com 2 mL da amostra de resíduo, e incubados a 35°C, 150 rpm por 24 horas.

Após o período de incubação, 100 μ L do caldo fermentado foi colocado em Eppendorff contendo 900 μ L de solução salina (NaCl a 0,85%) e realizou-se diluições em série de fator 10, até 10^{-6} .

Alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura MRS Ágar e espalhadas com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram colocadas em incubadora a 35°C por 48 horas. A partir destas placas escolheram-se,

aleatoriamente, algumas colônias. As colônias selecionadas foram purificadas pelo método do esgotamento por estria, em placa de Petri contendo meio MRS sólido. Após 48 horas de incubação a 35°C, foram obtidos os isolados.

Para o isolamento de bactérias do iogurte foi utilizado o mesmo procedimento acima, com a diferença de que se utilizou o meio LS-Differential Agar, com a seguinte composição (10 g de Peptona de caseína, 5 g de peptona de soja, 5 g de extrato de carne, 5 g de extrato de levedura, 20 g de glicose, 5 g de cloreto de sódio, 0,3 g de hipocloreto de 1 - cisteína, 10 mL de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazolium (2 %), 100 mL de leite em pó (10 %), 13 g de Agar e 890 mL de água destilada) e as placas foram colocadas em incubadora a 42°C por 48 horas.

Após obtenção dos isolados, foi feita coloração de Gram e os isolados foram conservados a -80°C, em tubos criogênicos, contendo 1:1 de meio de cultura líquido MRS e glicerol 40 %. Desta maneira, foram preparados 3 tubos para serem utilizados como cultura estoque para posterior preparação do inóculo, fermentação e seleção dos isolados.

A técnica para isolamento de micro-organismos de amostras sólidas (bagacilho, silagem, carnes embutidas, torta de filtro) foi realizada de forma semelhante às amostras líquidas, com a diferença que se iniciou pesando 2 g da amostra e esta foi adicionada a 18 mL de meio MRS líquido.

3.1.3 Seleção dos micro-organismos

Os 400 micro-organismos isolados, assim como mais 3 isolados cedidos pela Dra. Georgina L. Michelena Alvarez do ICIDCA de Cuba (*L. fermentum*, *L. rhamnosus* B103, *L. casei*) e 1 isolado cedido pela Unicamp (*Leuconostoc mesenteroides* B512) foram submetidos à fermentação para determinar a produção de ácido lático.

O inóculo foi preparado a partir de uma cultura estoque (item 3.1.2) que era inserida em um tubo de ensaio, contendo 10 mL de meio MRS, o inóculo foi incubado a 35°C, 150 rpm, por 24 horas. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 18 mL de meio de cultura MRS líquido e inoculados com 2 mL do inóculo. O cultivo foi realizado a 35°C, 150 rpm por 48 horas.

Retirou-se 1 mL de amostra do caldo fermentado, centrifugou-se a 7.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para determinação de ácido lático.

A partir dos resultados destas fermentações, foram selecionadas 112 bactérias que obtiveram uma conversão (Yp/s) de aproximadamente 50% ou mais. Com elas foram realizadas caracterizações quanto à produção de D-(-), L-(+) e DL ácido lático.

3.1.4 Fermentação com diferentes fontes de carbono

Com os isolados do tipo D e do tipo L (produção acima de 75% de D-(-) ou L-(+) ácido lático) selecionados no item acima foram feitas fermentações para avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono (glicose, lactose, sacarose, glicerol e amido) na produção de ácido lático. O meio de cultura utilizado apresentava a seguinte composição (g/L): fonte de carbono (60,0), peptona (10,0), extrato de levedura (5,0), extrato de carne (10,0), K_2HPO_4 (5,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,05), $CaCO_3$ (30,0) e 1 mL/L de Tween 80.

Para preparar o inóculo, 500 μ L de cultura estoque era adicionada a 5 mL do meio de cultura acima e incubada a 35°C por 24 horas. Então 1 mL do inóculo era transferido para tubo de ensaio contendo 9 mL do meio de cultura e era submetido a fermentação por 48 horas a 35°C.

Após a fermentação, retirou-se 5 mL de amostra do caldo fermentado e centrifugou-se a 7000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para posterior determinação do ácido lático e análise estereoquímica do mesmo.

3.1.5 Caracterizações bioquímicas e fisiológicas dos micro-organismos

Foram realizadas caracterizações bioquímicas e fisiológicas com os micro-organismos potencialmente produtores de ácido lático enantiomericamente enriquecidos.

Primeiramente os isolados foram submetidos à coloração de Gram após crescimento em meio MRS Ágar por 24h de incubação a 35°C. Foi analisada em microscópio óptico comum, com aumento de 1000x, a retenção ou não do corante de Gram (G+ ou G-), a morfologia celular e o arranjo.

Foi feito o teste da catalase que consiste em adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em uma colônia bacteriana com 24 horas de crescimento sobre uma lâmina de vidro. A formação de bolhas indica a reação de catalase positiva.

Na reação de citocromo oxidase, as culturas crescidas por 48h em meio MRS sólido foram espalhadas sobre a superfície da lâmina e o reagente (oxalato de *p*-aminodimetilanilina)

foi colocado na superfície. Quando ocorreu mudança da coloração inicial (rosa) para coloração escura (preto) o isolado foi considerado positivo quanto à presença de citocromo oxidase, caso contrário, o isolado seria considerado negativo.

Além disso, avaliou-se o crescimento dos micro-organismos a 45°C e 50°C após 3 dias e crescimento a 10°C após 10 dias, além do crescimento em pH 9,6 e em 6,5 % de NaCl após 3 dias. Em todos os testes utilizou-se o meio MRS e 1% de inóculo crescido a 35 °C, por 24 h. Para avaliar a produção de CO₂ a partir de glicose, os isolados foram reativados e estriados em tubo invertido contendo meio de cultura MRS Agar, foram incubados a 35°C por 24 horas. Após este período uma alíquota foi transferida para tubo de ensaio contendo meio MRS líquido com tubos de Durham invertidos. Foram incubados por 24h a 35°C. A produção de CO₂ é aprisionada pelos tubos de Durham.

As identificações bioquímicas dos isolados escolhidos foram realizadas usando a galeria API 50 CH (BioMérieux, França) para fermentação bioquímica de bactérias lácticas. Os micro-organismos foram cultivados em superfície no Agar MRS por 48 horas. Colônias isoladas foram suspensas no meio API 50 CHL (BioMérieux, França) que contém púrpura de bromocresol. O meio inoculado foi distribuído nos 50 microtubos da galeria, os quais foram cobertos com vaselina líquida. A produção de ácidos orgânicos durante a incubação permite a mudança do indicador de pH para amarelo, com exceção do controle que permanece azul e da esculina (microtubo número 25) cuja a coloração muda para preto. Os resultados obtidos constituem o perfil bioquímico da estirpe estudada, facilitando sua identificação. As leituras foram realizadas em 24 e 48 horas de incubação a 37°C. Os resultados foram interpretados usando o programa estatístico API 50 CHL v 5.1 (BIOMERIEUX, 2007), que permite determinar o gênero e a espécie do micro-organismo analisado.

3.1.6 Identificação Molecular dos micro-organismos

A identificação molecular dos micro-organismos escolhidos foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista Unesp de Rio Claro.

3.1.6.1 Extração do DNA genômico (TNES)

O material genético de cada uma das linhagens foi extraído pelo protocolo TNES com algumas modificações por se tratar de amostras de bactérias Gram-positiva. As colônias isoladas foram inoculadas em 20 mL de meio de cultura MRS e incubadas em agitador orbital, 150 rpm, por 24 horas a 35° C. Alíquota de 10 mL de cultura foi centrifugada (10000 x g por 10 minutos), o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa em 1 mL de TE pH 8 (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA) e transferida para microtubos de 1,5 mL, após isso, foi feita uma nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 550 µL de solução de TNES (250 mM de Tris (pH 7,5), 2 M de NaCl, 100 mM EDTA e 2,5% SDS). Agitou-se no vórtex por 10 seg. Foi adicionado 25 µL de proteinase K (20 mg/mL). Agitou-se no vórtex e incubou-se em banho a 55 °C por 3h. Após isso, a amostra foi retirada do banho e levada ao gelo. Foram adicionados 25 µL da solução de RNase A (4 mg/mL). Agitou-se por inversão (~25 vezes) e a amostra foi incubada em banho a 37 °C por 30 min, em seguida a amostra foi colocada no gelo e adicionou-se 200 µL de solução de precipitação de proteína (NaCl 5M). Agitou-se vigorosamente no vórtex por 20 seg e a amostra foi centrifugada por 6 min, 15000 x g para precipitar proteína. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para novo microtubo. Adicionou-se 600 µL de isopropanol 100%, agitando suavemente por inversão. Centrifugou-se por 5 min, 15000 x g e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 600 µL de etanol 70% e centrifugou-se por 6 min, 15000 x g. O sobrenadante foi descartado e após secar, o DNA foi hidratado com 30 µL de TE. A amostra foi colocada na geladeira “overnight” para ressuspender o DNA.

A eficiência da metodologia foi comprovada por meio da visualização do DNA por eletroforese em gel de agarose (1% m/v) em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA), foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 Kb ladder (Gibco BRL); o gel foi corado em solução com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas foram visualizadas e fotografadas.

A análise da pureza e a quantificação do DNA foi realizada por espectrofotômetro Thermo Scient NanoDrop 2000. Resquícios de proteínas co-purificados podem interferir em uma série de procedimentos metodológicos e sua presença pode ser medida através da leitura a 280 nm e cálculo da relação A260/A280. A razão esperada para DNA é de 1.8 – 1.9.

Foi pipetado 1 µL de TE no pedestal e o aparelho foi zerado (branco). 1 µL da amostra foi pipetado e fez-se a medição. Anotaram-se os valores de concentração e das relações A260/A280. A pureza foi avaliada através das relações A260/A280.

3.1.6.2 Amplificação do gene 16S rDNA

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados 2 conjuntos universais de oligonucleotídeos iniciadores diferentes: 27f com a seguinte sequência 5'AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG3' e 1492r com a sequência: 5'TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT3'. Os componentes da reação foram: 1 µL de DNA molde (30 a 50 ng), 1 µM dos oligonucleotídeos iniciadores 27 FA (10 pmol/µL), 27 FC (10 pmol/µL) e 1492 RT (10 pmol/µL) e 1492 RC (10 pmol/µL), 2 µL de Mix PCR Beads do Kit Pure Taq Ready-To-Go (GE Healthcare) e 18 µL de água milliQ seguindo orientações do fabricante.

A reação de amplificação foi feita em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 3 minutos. Após a amplificação 5 µL de reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1% m/v) em tampão 1x TBE, foi utilizado marcador de peso molecular de 1 Kb ladder (Gibco BRL); o gel foi corado em solução com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e os produtos da amplificação com aproximadamente 1500 pb foram visualizados e fotodocumentados.

3.1.6.3 Purificação de produtos de PCR

A purificação de produtos de PCR do 16S rDNA para posterior seqüenciamento foi realizada utilizando *Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, seguindo instruções do fabricante (GE Healthcare). Após a purificação do produto de PCR, 5 µL da reação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. O DNA foi quantificado em equipamento Thermo Scientific NanoDropTM 2000 Spectrophotometer, seguindo orientações do fabricante.

3.1.6.4 Reação de seqüenciamento do gene 16S rDNA

Para reação de seqüenciamento foram utilizados aproximadamente 150 ng do DNA purificado, 2,5 µL de tampão "Save-Money" (MgCl₂ 1M; Tris-HCl 1M pH=9,0; 200 mL de água deionizada), 2,5 µL de "BigDye" (Applied BiosystemsTM) e 3,2 pmol de oligonucleotídeo iniciador antisenso ou senso e completava-se com água deionizada autoclavada até um volume final de 10 µL. Os Eppendorfs contendo as reações foram

colocados no termociclador e foram utilizados os ciclos de amplificação de 96 °C por 1 min e 25 vezes de (96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min). Após o término do programa, adicionou-se 1 µL de solução EDTA 125 mM autoclavada ao fundo do tubo (reduz a quantidade de terminadores não incorporados que precipitam com o DNA, eliminando manchas que distorcem os dados do sequenciamento). Foram adicionados 1 µL de solução de acetato de sódio 3 M autoclavada ao fundo do tubo e adicionou-se 60 µL de etanol 100%, mantendo à temperatura ambiente por 15 min, em ambiente escuro (os terminadores são sensíveis à luz) e após esse tempo centrifugou-se por 25 min, 15000xg. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 170 µL de etanol 70% para lavar o pellet, centrifugou-se por 10 min, 15000xg e o sobrenadante foi removido, o pellet foi ressuspensão em 10 µL de formamida e aplicado em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

As seqüências Forward e reversa foram alinhadas com o programa Bioedit. O isolado foi identificado em nível de espécie pela comparação da seqüência obtida com uma seqüência conhecida do GenBank, usando BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3.2 Produção de ácido lático por *Lactobacillus plantarum* LMISM6

3.2.1 Micro-organismo

A bactéria *Lactobacillus plantarum* LMISM6 (Figura 6) foi isolada de lagoa de decantação de resíduos da fabricação de farinha de mandioca. A escolha deste micro-organismo baseou-se no fato de ser um eficiente produtor de ácido lático racêmico (DL). As culturas de estoque foram mantidas em meio de cultura MRS com 20 % (v/v) de glicerol a -20 °C. O pH do meio de cultivo era ajustado para 6,5 antes da esterilização a 121°C por 15 min.

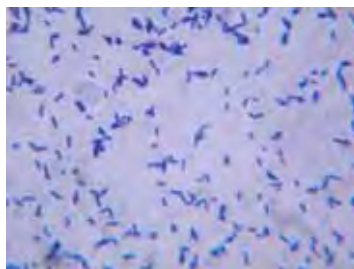


Figura 6 - Teste de Gram feito com o *Lactobacillus plantarum* LMISM6

Para o preparo do inóculo, um tubo da cultura estoque era descongelado e o seu conteúdo inserido em um Erlenmeyer contendo 200 mL de caldo MRS. O inóculo era

incubado à 35°C, 150 rpm por 24 horas. No intervalo de tempo escolhido em que a concentração celular era de $1,0 \times 10^9$ U.F.C./mL, 10 % do inóculo era transferido para os meios de produção.

3.2.2 Substrato

O melaço de cana foi obtido na usina Sta. Lucia, localizada na região de Araras-SP. O melaço foi diluído 2x (50° brix) e hidrolisado pela adição de 1 mL de 20 % de H_2SO_4 em 100 mL de solução de melaço e aquecido por 20 minutos. Após a hidrólise, o pH do melaço foi ajustado para 6,0 com 4,0 M KOH.

3.2.3 Efeito de diferentes concentrações de melaço, AMM, temperatura e pH.

Os estudos das concentrações de melaço, nitrogênio e temperatura foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 45 mL do respectivo meio de cultivo, 3 % de $CaCO_3$ e pH inicial de 6,0. Para o estudo do pH, os experimentos foram conduzidos em reator com seis vasos independentes para controle de pH. Cada vaso tinha capacidade para 1,5 L de meio de fermentação (Figura 7).



Figura 7 - Reator com seis vasos independentes para controle de pH

Em todos os experimentos foi adicionado ao meio de cultivo (g/L): acetato de sódio (5,0), sulfato de magnésio (0,1), sulfato de manganês (0,05) e citrato de amônio (2,0). Além disso,

os experimentos foram conduzidos sob agitação de 150 rpm, sendo que para os experimentos a, b, d descritos abaixo, a temperatura foi mantida em 35°C.

- a) Avaliação da concentração de melaço: O meio foi composto de 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de carne, foram avaliadas diferentes concentrações de ART (melaço): 30; 50; 70; 90; 150; 200 e 250 g/L.
- b) Avaliação da concentração de nitrogênio: Foi utilizado 150 g/L de ART do melaço e diferentes concentrações de AMM: 5, 15, 25, 35, 45 e 55 g/L.
- c) Efeito de diferentes temperaturas: O meio de fermentação foi composto de 150 g/L de ART de melaço, 15 g/L de AMM e os experimentos foram conduzidos sob diferentes temperaturas: 28°C, 35°C e 42°C.
- d) Efeito do pH: Foram avaliados os pHs iniciais de 5, 6, 7 e 8 com controle de pH por adição de NaOH 10M, além do pH inicial de 6,5 sem controle de pH. Foi utilizado 500 mL de meio de fermentação composto por 150 g/L de ART de melaço e 15 g/L de AMM.

3.2.4 Planejamento do tipo Plackett–Burman

O propósito deste planejamento foi identificar os componentes do meio que têm efeito significativo na produção de ácido lático, utilizando melaço como fonte de carbono. Doze experimentos foram gerados a partir de 7 fatores: AMM, acetato de sódio, sulfato de magnésio (MgSO_4), sulfato de manganês (MnSO_4), citrato de amônia, fosfato de potássio (K_2HPO_4) e Tween 80. O planejamento experimental Plackett-Burman (PB) foi baseado no modelo de primeira ordem sem interações entre os fatores. As variáveis e níveis utilizados no planejamento se encontram na Tabela 6.

Tabela 6

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

Variáveis	Códigos	Níveis	
		-1	+1
Citrato de amônia (g/L)	X_1	0	2
Acetato de sódio (g/L)	X_2	0	5
Fosfato de potássio (g/L)	X_3	0	2
MgSO_4 (g/L)	X_4	0	0,2
MnSO_4 (g/L)	X_5	0	0,05
Tween 80 (mL/L)	X_6	0	1
AMM (mL/L)	X_7	0	30

O experimento foi conduzido em Erlenmeyers de 125 mL com 20 mL de meio de fermentação, 35°C, 150 rpm e pH 6,5. Amostras de 1 mL foram retiradas do caldo de fermentação após 48 horas de fermentação e se analisou a produção de ácido láctico, de biomassa e o consumo de açúcar. Com as variáveis que aumentaram significativamente a produção de ácido láctico foi feito um planejamento do tipo composto central.

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

Para avaliar a influência das variáveis, melão, AMM, fosfato de potássio e Tween 80 na produção de ácido láctico, optou-se por um planejamento fatorial composto central com quatro replicas no ponto central, totalizando 28 experimentos.

As variáveis independentes foram codificadas segundo a equação 3.1:

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

Equação geral: (3.1)

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.

$$X_1 = \frac{(\text{Melão} - 170)}{50} \quad (3.2)$$

$$X_2 = \frac{(\text{AMM} - 30)}{15} \quad (3.3)$$

$$X_3 = \frac{(\text{K}_2\text{HPO}_4 - 2)}{1} \quad (3.4)$$

$$X_4 = \frac{(\text{Tween 80} - 0,1)}{0,5} \quad (3.5)$$

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 7

Tabela 7

Valores reais das variáveis independentes codificadas

Variáveis	Códigos	Níveis				
		- 2	-1	0	+1	+ 2
ART do Melão (g/L)	X ₁	70	120	170	220	270
AMM (mL/L)	X ₂	0	15	30	45	60
K ₂ HPO ₄ (mL/L)	X ₃	0	1,0	2,0	3,0	4,0
Tween 80 (g/L)	X ₄	0	0,5	1,0	1,5	2,0

Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio de fermentação, a 200 rpm e 35 °C. CaCO₃ (10 %) foi adicionado ao meio de cultura para neutralizar o ácido formado. Os frascos foram inoculados com 10 % de inóculo.

Os pontos ótimos foram obtidos pelo programa Maple 9.5 (Waterloo Maple Inc., Ontario, Canada). Para validação experimental, um experimento com três repetições foi conduzido utilizando as condições otimizadas, com o objetivo de confirmar os resultados das análises da superfície de resposta.

3.3 Produção de L-(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*

3.3.1 Micro-organismo

O micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* foi cedido pela Dra Georgina L. Michelena Alvarez do ICIDCA de Cuba e se caracteriza por ser um excelente produtor de L-(+) ácido láctico. O isolado encontrava-se liofilizado. Primeiramente, foi feita a ativação do micro-organismo, 5 mL de meio de caldo MRS foi colocado no tubo contendo o micro-organismo e incubou-se a 37°C por 18 horas. Após este período, 1 mL da suspensão bacteriana formada foi transferida para um Erlenmeyer contendo 12,5 mL de caldo MRS. O Erlenmeyer foi mantido em incubadora, à 37°C, 150 rpm, por 18 horas. Para obter culturas estoques, o conteúdo do Erlenmeyer foi igualmente distribuído em 25 Eppendorfs contendo 500 µL de solução de glicerol 40 % e congelados à -20°C.

Para o preparo do inóculo, dois tubos da cultura estoque eram descongelado e o seu conteúdo inserido em um Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo MRS. O inóculo era incubado a 37°C, 150 rpm por 18 horas.

3.3.2 Fermentações com diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Os testes com diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram realizados em bioreator, com seis vasos de vidro de 1,5 L, com volume útil de 500 mL e controles de agitação, temperatura e pH (Figura 7). As fermentações foram conduzidas sob agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C e pH de 6.2, controlado com NaOH 10 M .

Para avaliação das fontes de nitrogênio, as fermentações foram realizadas com o meio MRS desprovido de glicose e suplementado com diferentes fontes de carbono (40 g/L de ART), além de 10 % de carbonato de cálcio. Foram avaliadas quatro fontes de carbono, soro de queijo, caldo de cana de açúcar, melão e manipueira.

O soro de queijo em pó foi fornecido pelo laticínio Tavolaro (Brotas-SP). O soro de queijo foi dissolvido em água e a solução resultante foi aquecida até atingir o ponto de ebulição, e permaneceu por 5 minutos. Este processo provoca a coagulação das proteínas. Em seguida, a solução foi resfriada naturalmente até atingir a temperatura ambiente, e então filtrada com um coador de café para a remoção das proteínas (soro de queijo desproteínizado).

A água de manipueira foi coletada em uma fábrica de produção de farinha de mandioca no estado de São Paulo (Indústria Plaza), situada na cidade de Santa Maria da Serra. A água de manipueira foi aquecida por 5 minutos para remover o cianeto e centrifugada por 10 minutos à 20 °C, 10000 x g para remover o amido. O melão e o caldo de cana de açúcar foram fornecidos pela Usina Sta. Lúcia, situada na região de Araras-SP. O teor de ART de cada fonte de carbono foi determinado por ácido 3,5-dinitro salicílico (ADNS) e foi feita a diluição para que o meio de fermentação atingisse a concentração de ART de 40 g/L.

Para avaliar o efeito das fontes de nitrogênio na produção de ácido láctico, o meio de fermentação foi composto por soro de queijo desproteínizado (concentração de lactose de 45 g/L), 5 g/L de acetato de sódio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio, 0,05 g/L de sulfato de manganês e 2 g/L de citrato de amônio, além das fontes de nitrogênio a serem avaliadas: autolisado de levedura, extrato de levedura, AMM fornecido pela ®Corn Products, sulfato de amônio e pro-floo (proteína da semente de algodão) da empresa americana ®Traders Protein (Tabela 8).

Tabela 8

Concentrações de cada fonte de nitrogênio utilizada

Fonte de nitrogênio ^a	Quantidade (g/L)
Extrato de levedura	15,0
Autolisado de levedura	12,75
AMM	36,75
Pró-floo	15,47
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,94

^a A quantidade de cada fonte de nitrogênio foi determinada de acordo com a concentração de nitrogênio contida em 15 g/L de extrato de levedura.

3.3.3 Planejamento do tipo Plackett–Burman utilizando soro de queijo.

Com o objetivo de verificar a influência de alguns componentes adicionados ao soro de queijo, na produção de L-(+) ácido láctico, foi realizado um planejamento do tipo PB. Desta forma, doze experimentos foram gerados a partir de 7 fatores: X₁= Citrato de amônia, X₂= acetato de sódio, X₃= K₂HPO₄, X₄= MgSO₄, X₅= MnSO₄, X₆= Tween 80, X₇= AMM.

O planejamento experimental PB foi baseado no modelo de primeira ordem sem interações entre os fatores. As concentrações utilizadas para cada variável encontram-se na Tabela 9

Tabela 9

Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman

Variáveis	Códigos	Níveis	
		-1	+1
Citrato de amônia (g/L)	X ₁	0	2
Acetato de sódio (g/L)	X ₂	0	5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	X ₃	0	2
MgSO ₄ (g/L)	X ₄	0	0,2
MnSO ₄ (g/L)	X ₅	0	0,05
Tween 80 (mL/L)	X ₆	0	1
AMM (mL/L)	X ₇	0	30

Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 125 mL com 20 mL de meio de fermentação, 37°C, 200 rpm, 6,5 pH. Amostras de 1 mL foram retiradas do caldo de fermentação após 48 horas de fermentação e se analisou a produção de ácido láctico. Com as variáveis que aumentaram significativamente a produção de ácido láctico (AMM, sulfato de

manganês e Tween 80) a partir de soro de queijo, foi feito um planejamento do tipo composto central.

3.3.4 Planejamento do tipo composto central, utilizando soro de queijo.

Para se estudar a influência das variáveis, lactose de soro de queijo (X_1), AMM (X_2), Tween 80 (X_3) e $MnSO_4$ (X_4) na produção de L-(+) ácido láctico pelo *Lactobacillus rhamnosus*, optou-se por um planejamento fatorial composto central com quatro réplicas do ponto central, perfazendo um total de 28 experimentos. O valor escolhido para o nível extremo do planejamento foi igual a 2. Este valor foi selecionado de modo a se obter um planejamento rotacional. Desta forma, obtiveram-se as equações abaixo:

$$X_1 = \frac{(Lactose - 160)}{50} \quad (3.6)$$

$$X_2 = \frac{(AMM - 60)}{30} \quad (3.7)$$

$$X_3 = \frac{(Tween\ 80 - 1)}{0,5} \quad (3.8)$$

$$X_4 = \frac{(MnSO_4 - 0,1)}{0,05} \quad (3.9)$$

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10

Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo composto central

Variáveis	Códigos	Níveis				
		- 2	-1	0	+1	+ 2
Lactose do soro de queijo (g/L)	X_1	60	110	160	210	260
AMM (mL/L)	X_2	0	30	60	90	120
Tween 80 (mL/L)	X_3	0	0,5	1,0	1,5	2,0
$MnSO_4$ (g/L)	X_4	0	0,05	0,1	0,15	0,2

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio de fermentação, a 150 rpm e 37 °C. $CaCO_3$ (10 %) foi adicionado ao meio de cultura para neutralizar o ácido formado. Frascos foram inoculados com 10 % de inóculo.

3.3.5 Planejamento do tipo Plackett–Burman, utilizando manipueira.

A manipueira foi coletada em uma fabrica de produção de farinha de mandioca no estado de São Paulo (Indústria Plaza), situada na cidade de Santa Maria da Serra. A água de manipueira foi aquecida por 5 minutos para remover o cianeto e centrifugada por 10 minutos à 20 °C, 10000 x g para remover o amido.

Com o objetivo de verificar a influência de alguns componentes adicionados a manipueira, na produção de ácido láctico, foi realizado um planejamento do tipo Plackett Burman (PB). Desta forma, doze experimentos foram gerados a partir de 7 fatores: X_1 = citrato de amônia, X_2 =acetato de sódio, X_3 = fosfato de potássio, X_4 = $MgSO_4$, X_5 = $MnSO_4$, X_6 =Tween 80, X_7 = AMM.

O planejamento experimental PB foi baseado no modelo de primeira ordem sem interações entre os fatores. As concentrações utilizadas para cada variável encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11

Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo PB

Variáveis	Códigos	Níveis	
		-1	+1
Citrato de amônia (g/L)	X_1	0	2
Acetato de sódio (g/L)	X_2	0	5
Fosfato de potássio (g/L)	X_3	0	2
$MgSO_4$ (g/L)	X_4	0	0,2
$MnSO_4$ (g/L)	X_5	0	0,05
Tween 80 (mL/L)	X_6	0	1
AMM (mL/L)	X_7	0	30

Com as variáveis que aumentaram significativamente a produção de ácido láctico foi feito um planejamento do tipo composto central.

3.3.6 Planejamento fatorial composto central utilizando manipueira

Para avaliar a influência das variáveis, concentração de AMM e concentração de Tween 80 na produção de ácido láctico, foi realizado um planejamento fatorial composto central com quatro replicas do ponto central, totalizando 12 experimentos.

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

$$X_1 = \frac{(AMM - 40)}{20} \quad (3.10)$$

$$X_2 = \frac{(Tween80 - 1)}{0,6} \quad (3.11)$$

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12

Valores reais das variáveis independentes codificadas

Variáveis (mL/L)	Níveis				
	- 1,41	-1	0	+1	+ 1,41
AMM	11,8	20	40	60	68,2
Tween 80	0,154	0,4	1,0	1,6	1,846

Os experimentos foram conduzido em Erlenmeyers de 250 mL com 45 mL de meio de fermentação, 37°C, 200 rpm, 6,5 pH. Amostras de 1 mL foram retiradas do caldo de fermentação após 48 horas de fermentação e se analisou a produção de ácido lático, de biomassa e o consumo de açúcar.

3.4 Produção de D-(-) ácido lático por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512

3.4.1 Micro-organismo

O micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* B512 se caracteriza por ser produtor de D-(-) ácido lático.

Primeiramente, foi feita a ativação do micro-organismo, 500 µL de cultura estoque foi colocada em tubo contendo 5 mL de meio de cultura MRS e incubou-se a 30°C por 24 horas. Após este período, 1 mL da suspensão bacteriana formada foi transferida para um Erlenmeyer contendo 12,5 mL de caldo MRS. O Erlenmeyer foi mantido em incubadora, à 30°C, 150 rpm, por 24 horas. Para obter culturas estoques, o conteúdo do Erlenmeyer foi igualmente distribuído em 25 Eppendorfs contendo 500 µL de solução de glicerol 40 % e congelados à -20°C.

Para o preparo do inóculo, um tubo da cultura estoque era descongelado e o seu conteúdo inserido em um Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo MRS. O inóculo era incubado a 30°C, 150 rpm por 24 horas. Em todas as fermentações, a concentração do inóculo foi igual a 10 %.

3.4.2 Fermentações com diferentes fontes de carbono

O processo foi desenvolvido utilizando-se soro de queijo, caldo de cana de açúcar e melação (120 g/L de ART), suplementado com os sais e as fontes de nitrogênio do meio MRS, além de 10 % de carbonato de cálcio.

3.4.3 Fermentação com diferentes fontes de nitrogênio

O meio de fermentação foi composto por caldo de cana-de-açúcar (ART de 120 g/L) e pelos sais do meio MRS. Foram avaliadas cinco fontes de nitrogênio: autolisado de levedura, extrato de levedura, AMM, sulfato de amônio e pro-floo (proteína da semente de algodão) da empresa americana ®Traders Protein (Tabela 13).

Tabela 13

Concentrações das fontes de nitrogênio (extrato de levedura, autolisado de levedura, AMM, pró-floo e sulfato de amônio).

Fonte de nitrogênio ^a	Concentração (g/L ou mL/L)
Extrato de levedura	15,0
Autolisado de levedura	12,75
AMM	36,75
Pró-floo	15,47
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,94

^a A quantidade de cada fonte de nitrogênio foi determinada de acordo com a concentração de nitrogênio contida em 15 g/L de extrato de levedura.

Todas as fermentações com *Leuconostoc mesenteroides* foram desenvolvidas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL do respectivo meio de cultura, sob pH inicial de 6,2, temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm. Após 48 horas de fermentação,

amostras de 1 mL eram retiradas para avaliar a produção de ácido láctico e o consumo de açúcar.

3.4.4 Planejamento do tipo Plackett–Burman.

O propósito deste passo da otimização foi identificar os componentes do meio que tem efeito significativo na produção de ácido láctico. Doze experimentos foram gerados a partir de 8 fatores: ART de caldo de cana de açúcar, acetato de sódio, citrato de amônio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, fosfato de potássio, tween 80 e autolisado de levedura. As variáveis com nível de confiança maior que 95 % foram consideradas como variáveis que influenciam significativamente na produção de ácido láctico. O planejamento experimental PB foi baseado no modelo de primeira ordem sem interações entre os fatores. As variáveis e níveis utilizados no planejamento se encontram na Tabela 14.

Tabelas 14

Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo PB

Variáveis	Códigos	Níveis	
		-1	+1
Cana de açúcar (g/L)	X ₁	50	150
Acetato de sódio (g/L)	X ₂	0	10
Citrato de amônio (g/L)	X ₃	0	4
MgSO ₄ (g/L)	X ₄	0	0,4
MnSO ₄ (g/L)	X ₅	0	0,2
K ₂ HPO ₄ (g/L)	X ₆	0	4
Tween 80 (mL/L)	X ₇	0	2
Autolisado de levedura (g/L)	X ₈	0	40

Com as variáveis que aumentaram significativamente a produção de ácido láctico foi realizado um planejamento do tipo composto central.

3.4.5 Planejamento do tipo composto central

Para otimizar as concentrações das variáveis caldo de cana de açúcar e autolisado de levedura na produção de D-(-) ácido láctico, foi realizado um planejamento fatorial composto central com quatro replicas do ponto central, totalizando 12 experimentos.

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

$$X_1 = \frac{(\text{Caldo de cana} - 100)}{50} \quad (3.12)$$

$$X_2 = \frac{(\text{AL} - 30)}{15} \quad (3.13)$$

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 15

Tabela 15

Valores reais das variáveis independentes codificadas.

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Caldo de cana	X ₁	29,5	50	100	150	170,5
AL	X ₂	8,85	15	30	45	51,15

Os experimentos foram conduzido em Erlenmeyers de 250 mL com 45 mL de meio de fermentação, 37°C, 200 rpm, 6,5 pH. Amostras de 1 mL foram retiradas do caldo de fermentação após 48 horas de fermentação e se analisou a produção de ácido lático, de biomassa e o consumo de açúcar.

3.5 Metodologia analítica

3.5.1 Quantificação do ácido lático

Foi empregado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipada com detector Ultra-violeta a 210 nm. Foi utilizado uma coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) da Phenomenex, eluída com H₂SO₄ 5mM como fase móvel, fluxo de 0,4 mL/min e temperatura de 60°C.

3.5.2 Determinação enantiomérica do ácido lático

Para a determinação da produção dos isômeros ópticos do ácido lático foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência, equipada com detector ultra-violeta a 254 nm, coluna Chirex 3126 Phenomenex (150 x 4,6 mm) eluída com 1 mM de Sulfato de cobre II em solução aquosa como fase móvel, fluxo de 1 mL/min e temperatura de 30 °C.

3.5.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por densidade ótica, no comprimento de onda de 650 nm. Após a centrifugação da amostra e separação do sobrenadante, o precipitado era lavado duas vezes com água destilada e diluído, antes da sua introdução no espectrofotômetro. A diluição era feita de modo que a absorbância permanecesse na faixa de 0,1 - 0,7 unidades de absorbância. A medida da absorbância era convertida em concentração celular (g massa seca/litro de meio) por meio de uma curva de calibração. Em experimentos em que se utilizou CaCO_3 para controle do pH, o precipitado foi tratado com 4 N de HCl.

3.5.4 Determinação do consumo de substrato

Para determinar a concentração inicial de açúcares no meio de cultivo e para acompanhar o consumo de substrato ao longo das fermentações foi empregado o método de CLAE equipada com detector de índice de refração, coluna da Phenomenex - Rezex ROA (300 x 7,8 mm), eluída com H_2SO_4 5 mM como fase móvel, fluxo de 0,4 mL/min e temperatura de 60°C.

Em alguns experimentos foi utilizado o método ADNS (Miller, 1959). Este procedimento foi feito em duplicata.

3.6 Análise estatística

No experimento com planejamento experimental a análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa Statistica 7.0 ®, a partir da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros, os termos isolados, de interação e quadráticos das três variáveis estudadas. A equação empírica de 2ª ordem proposta para representar cada uma das respostas segue a seguinte forma:

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2X_3 + hX_1^2 + iX_2^2 + jX_3^2 \quad (3.14)$$

Sendo:

Y = resposta estudada;

β_0 = valor médio da resposta;

$a, b, c, \dots, j$ = constantes ou parâmetros da equação;

$X_1; X_2; X_3$ = variáveis independentes

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

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

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

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (3.15)$$

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

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (3.16)$$

onde, b_0 é o termo independente;

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

$x'Bx$ é a contribuição quadrática.

Então, o ponto estacionário será dado por:

$$X_0 = -B^{-1} b/2 \quad (3.17)$$

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

O ponto estacionário (x_0) pode ser:

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

Porém, podem existir problemas relacionados a estes pontos estacionários:

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

Para determinar a natureza desse ponto estacionário foi necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem ($X_1, X_2, \dots, X_k$) = (0, 0, ..., 0) para o ponto estacionário X_0 (Figura 8). Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, $W_1, W_2, \dots, W_k$.

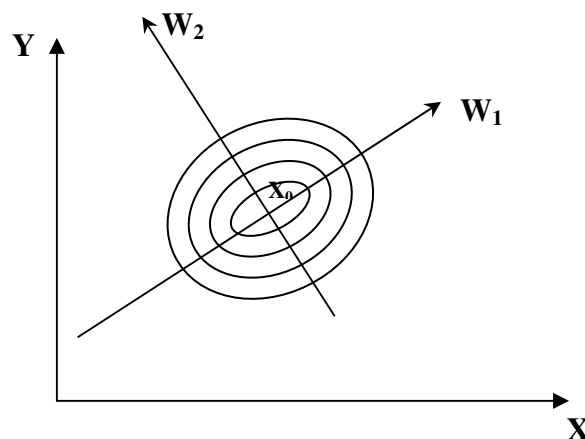


Figura 8 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

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

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3.18)$$

onde:

y_0 : é a resposta estimada no ponto estacionário e,

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

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

Se $\lambda_i < 0$, sendo $i = 1, 2, \dots, k$, quando movimentamos em qualquer direção a partir do ponto estacionário, teremos um decréscimo de Y , isto é, o ponto estacionário X_0 é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se $\lambda_i > 0$, o ponto estacionário X_0 é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os λ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário X_0 não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

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

4. Resultados e discussão

4.1 Isolamento e seleção dos micro-organismos

Foram isolados 400 micro-organismos de diferentes amostras, sendo 34 isolados de manipueira, 101 de usina de cana de açúcar (bagacilho, fermento, caldo de cana, melaço), 13 de chucrute, 22 de rúmen de boi, 19 de silagem, 77 de derivados do leite (catupiri, kefir, soro de queijo e iogurte), 99 de carnes embutidas (bacon, lingüiça, carne de porco, salame e salsicha) e 35 de vinhos. Não foram encontradas bactérias lácticas em AMM, isto pode ter acontecido devido à alta concentração de nitrogênio presente na amostra, que pode ter inibido o crescimento dos micro-organismos. De acordo com De Lima et al., (2009), altas concentrações de nitrogênio podem causar a morte celular de bactérias.

Para avaliação da produção de ácido láctico, os micro-organismos que foram isolados, assim como mais 3 micro-organismos cedidos pela Dra. Georgina L. Michelena Alvarez do Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de La Caña de Azúcar (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*) e 1 micro-organismo da coleção do laboratório de microbiologia industrial da Unesp (*Leuconostoc mesenteroides* B512) foram submetidos a fermentações por 48 horas em meio MRS.

Dos 404 micro-organismos avaliados, apenas 19 não produziram ácido láctico, 125 produziram ácido láctico com rendimento produto/substrato (Yp/s) igual ou superior a 0,5,

sendo que os isolados que mais produziram ácido láctico ($Yp/s \geq 0,85$) foram provenientes das amostras de manipueira (Lmism1, Lmism6, AMP1, AMP3 e AMP6), bagacilho de cana (BSLA9 e o Baga3), torta de filtro (Tort4), salame (SA10) e keffir (Ke11 e Ke19).

Os 125 isolados que apresentaram Yp/s superior a 0,5 foram considerados na avaliação quanto à pureza óptica, foram encontrados 80 isolados produtores de ácido láctico racêmico, 30 isolados produtores de L-(+) ácido láctico e 15 isolados produtores de D-(-) ácido láctico. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Garvie, (1980), Manome et al., (1998) e Costa et al., (2008) que igualmente observaram predominância de linhagens produtoras de ácido láctico racêmico. O que determina a forma isomérica do ácido láctico é a forma isomérica da enzima lactato desidrogenase, presente na bactéria, assim como, em alguns casos a presença de racemase (GOFFIN et al., 2005). 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 análoga LdhD, permitindo que as bactérias lácticas (BLs) possam ser agrupadas de acordo com a proporção dos isômeros produzidos (KANDLER, 1983; MANOME et al., 1998; VIANA et al., 2005). Quando a produção de L-(+) lactato é superior a 75 %, as bactérias são classificadas como do tipo L-(+), já, quando produzem acima de 75 % de D-(-) lactato, são bactérias denominadas do tipo D-(-). Há ainda aquelas bactérias que produzem a mesma proporção dos dois isômeros, sendo classificadas como do tipo DL (MANOME et al., 1998). Sabe-se que a proporção entre os isômeros, L-(+) e D-(-), obtidos durante a fermentação varia com o gênero e com a espécie do micro-organismo. O ácido láctico L-(+) é produzido por *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, e *Vagococcus* e o ácido láctico D-(-) é produzido por *Leuconostoc* e *Oenococcus*. Micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Weissella* produzem ambas as formas isoméricas, isolada ou conjuntamente, dependendo da espécie considerada e das condições de cultivo (LIU, 2003).

Observou-se uma predominância de bactérias produtoras de ácido láctico L-(+) em amostras de Keffir. Fato semelhante foi observado por Cho et al., (2006), em que encontraram um maior número de bactérias produtoras de L-(+) ácido láctico em amostra de Jeotgal (comida de origem Coreana, a partir da fermentação de vários frutos do mar).

Dessa forma, pode-se afirmar, pelos resultados obtidos, que a predominância de uma espécie de bactéria láctica pode estar relacionada com a origem, ou seja, o Keffir pode ter

algum fator nutricional específico que favoreceu o crescimento de bactérias produtoras de L-(+) ácido láctico.

Assim, dos 45 micro-organismos produtores de ácido láctico opticamente puro, 3 (*Lactobacillus rhamnosus* B103, *Lactobacillus* sp. Lmi8 e *Leuconostoc mesenteroides* B512) foram estudados com o objetivo de otimizar a produção de ácido láctico a partir de resíduos e subprodutos de baixo custo, sendo que os estudos realizados com os micro-organismos *Lactobacillus rhamnosus* B103, produtor de L-(+) ácido láctico e o *Leuconostoc mesenteroides* B512, produtor de D-(-) ácido láctico estão demonstrados nesta tese, nos itens 4.5 e 4.6, respectivamente. Já as otimizações com o *Lactobacillus* sp. Lmi8, produtor de D-(-) ácido láctico foram realizadas por De Lima et al., (2009) e por De Lima et al., (2010). Com os outros 42 isolados foram realizadas fermentações com diferentes fontes de carbono, glicose, sacarose, lactose, glicerol e amido para determinação da melhor fonte de carbono metabolizada (Tabela 16). Com relação aos 80 isolados racêmicos, foi selecionado o mais promissor (*Lactobacillus plantarum* Lmism6), com base no alto rendimento a partir de glicose, superior a 0,85, e foram realizadas otimizações dos diferentes parâmetros de fermentação, com o objetivo de aumentar a produção a partir de substratos de baixo custo. Os resultados estão demonstrados no item 4.4 desta tese.

Pode-se observar que, para a maioria dos isolados avaliados, houve maior produção de ácido láctico quando a fonte de carbono era glicose proporcionando menores rendimentos, quando da utilização de glicerol e amido. Yun et al., (2003) avaliaram a produção de ácido láctico por *Enterococcus faecalis* RKY1 a partir de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose, galactose, lactose, glicerol, xilose, soro de queijo e amido) e constataram que para a maior produção de ácido láctico, a melhor fonte de carbono é a glicose, seguida da frutose e maltose. Quando utilizaram 30 g/L de glicerol e amido, a produção de ácido láctico foi de 2,24 g/L e 1,19 g/L respectivamente.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 16, pode-se observar que a escolha do micro-organismo a ser utilizado para a produção de ácido láctico depende principalmente do substrato utilizado na fermentação.

Tabela 16

Produção de ácido láctico a partir de diferentes fontes de carbono (concentração inicial de açúcar = 60 g/L).

Isolados	Origem	Produção de ácido láctico (g/L)				
		Glicose	Lactose	Sacarose	Amido	Glicerol
Ke1	Keffir	34,20	15,56	4,58	6,84	3,39
Ke2	Keffir	54,11	48,25	50,20	2,57	2,79
Ke3	Keffir	36,60	13,40	3,33	6,58	3,69
Ke5	Keffir	28,64	16,71	7,79	4,94	3,80
Ke6	Keffir	40,24	16,76	3,26	6,62	3,27
Ke7	Keffir	44,04	32,21	52,83	7,58	4,06
Ke8	Keffir	42,36	33,63	58,49	5,88	3,81
Ke9	Keffir	36,12	25,75	4,60	6,38	4,01
Ke11	Keffir	59,15	46,20	57,58	4,95	3,30
Ke12	Keffir	29,72	14,64	5,51	6,66	3,52
Ke13	Keffir	35,16	14,61	4,13	3,89	4,03
Ke15	Keffir	26,24	17,22	6,21	6,51	3,81
Ke19	Keffir	59,40	39,98	14,55	4,43	4,36
Ke20	Keffir	35,00	11,26	5,59	6,77	3,57
Ke23	Keffir	34,88	13,39	2,88	2,79	3,69
Ke24	Keffir	33,30	50,40	18,89	Na	2,42
Ke25	Keffir	39,04	14,82	3,14	6,34	2,75
Ke27	Keffir	42,50	12,95	4,82	6,30	3,75
Ke32	Keffir	35,86	24,18	4,43	0,96	3,52
Tort 4	Torta de filtro	45,28	31,12	12,98	4,62	4,32
Tort 10	Torta de filtro	39,00	4,53	25,02	13,92	1,54
Baga 3	Bagacilho	55,34	48,59	56,03	4,75	3,35
V9	Vinho	35,00	5,16	3,12	2,82	5,20
V35	Vinho	27,80	4,36	4,36	4,95	3,92
CH17	Chucrute	56,79	36,42	11,72	4,68	3,23
Y2	Chucrute	19,36	18,94	12,96	2,44	4,14
Y16f	Iogurte	36,96	0	0	11,00	0
Y16b	Iogurte	28,28	19,54	20,02	4,60	0
Y4c	Iogurte	31,57	17,50	23,00	5,84	0
Y15c	Iogurte	40,32	28,12	39,88	5,00	0
Y15a	Iogurte	39,92	39,10	42,90	9,14	2,14
Y5n	Iogurte	38,70	22,62	32,66	8,81	2,32
Y15i	Iogurte	38,26	33,64	35,88	9,33	2,79
Y4b	Iogurte	17,64	19,58	5,66	3,47	0
y4a	Iogurte	12,46	0	5,44	3,17	0
CC28	Caldo de cana	32,71	3,60	10,93	1,91	1,39
CC29	Caldo de cana	37,78	2,57	11,73	1,69	1,25
CC10	Caldo de cana	34,66	3,57	10,87	2,00	1,09
CH25	Chucrute	28,08	2,93	11,09	2,06	1,98
CH24	Chucrute	24,74	4,58	12,24	5,20	1,55
Bslm14	Bagacilho	25,36	5,84	13,79	3,98	3,23
Bslm9	Bagacilho	37,24	6,12	32,79	4,14	3,98
<i>Lactobacillus</i> Lmi8	Manipueira	39,2	na*	na	na	Na
<i>Lb.rhamnosus</i> B103	ICIDCA**	46,8	na	na	na	Na
<i>Leuc.mesenteroides</i> B512	Unicamp	30,84	na	na	na	Na

*na: não avaliado

**Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, (ICIDCA)

Na Tabela 17 é possível observar as proporções dos isômeros do ácido láctico de acordo com a fonte de carbono.

Tabela 17

Produção de ácido láctico e proporção de enantiômeros produzidos pelos micro-organismos promissores (concentração inicial de açúcar = 60 g/L).

Isolados	Glicose			Lactose			Sacarose		
	ALTotal ^a	L-(-) ^b	D-(-)	ALTotal	L-(-)	D-(-)	AL total	L-(-)	D-(-)
Ke1	34,20	100,00	0,00	15,56	100,00	0,00	4,58	87,12	12,88
Ke2	54,11	97,17	2,83	48,25	94,32	5,68	50,20	100,00	0,00
Ke3	36,60	100,00	0,00	13,40	100,00	0,00	3,33	100,00	0,00
Ke5	28,64	100,00	0,00	16,71	100,00	0,00	7,79	85,49	14,51
Ke6	40,24	100,00	0,00	16,76	100,00	0,00	3,26	100,00	0,00
Ke7	44,04	90,01	9,99	32,21	95,34	4,66	52,83	95,80	4,20
Ke8	42,36	95,80	4,20	33,63	95,51	4,49	58,49	100,00	0,00
Ke9	36,12	97,23	2,77	25,75	100,00	0,00	4,60	82,61	17,39
Ke 11	59,15	98,00	2,00	46,20	93,57	6,43	57,58	93,82	6,18
Ke12	29,72	100,00	0,00	14,64	100,00	0,00	5,51	80,04	19,96
Ke13	35,16	95,22	4,78	14,61	100,00	0,00	4,13	79,66	20,34
Ke15	26,24	100,00	0,00	17,22	100,00	0,00	6,21	77,29	22,71
Ke19	59,40	92,56	7,44	39,98	93,42	6,58	14,55	86,25	13,75
Ke20	35,00	97,54	2,46	11,26	100,00	0,00	5,59	74,96	25,04
Ke23	34,88	95,81	4,19	13,39	100,00	0,00	2,88	100,00	0,00
Ke24	33,30	100,00	0,00	50,40	94,31	5,69	18,89	88,46	11,54
Ke25	39,04	97,44	2,56	14,82	100,00	0,00	3,14	100,00	0,00
Ke27	42,50	97,60	2,40	12,95	100,00	0,00	4,82	90,04	9,96
Ke32	35,86	100,00	0,00	24,18	92,64	7,36	4,43	82,17	17,83
Tort 4	45,28	95,32	4,68	31,12	95,85	4,15	12,98	90,83	9,17
Tort 10	39,00	100,00	0,00	4,53	81,90	18,10	25,02	100,00	0,00
Baga 3	55,34	94,49	5,51	48,59	94,38	5,62	56,03	94,49	5,51
V9	35,00	91,17	8,83	5,16	84,30	15,70	3,12	72,76	27,24
V35	27,80	92,88	7,12	4,36	78,44	21,56	4,36	88,30	11,70
Ch17	56,79	91,20	8,80	36,42	95,14	4,86	11,72	92,49	7,51
Y2	19,36	100,00	0,00	18,94	94,03	5,97	12,96	100,00	0,00
Y16f	36,96	100,00	0,00	16,40	100,00	0,00	15,24	100,00	0,00
Y16B	28,28	91,51	8,49	19,54	100,00	0,00	20,02	95,70	4,30
Y4c	31,57	89,83	10,17	17,50	95,23	4,77	23,00	94,26	5,74
Y15C	40,32	2,78	97,22	28,12	0,00	100,00	39,88	0,00	100,00
Y15A	39,92	5,01	94,99	39,10	4,60	95,40	42,90	96,32	3,68
Y5N	38,70	3,51	96,49	22,62	2,83	97,17	32,67	2,57	97,43
Y15i	38,26	0,00	100,00	33,64	4,34	95,66	35,88	8,97	91,03
Y4B	17,64	9,86	90,14	19,58	7,97	92,03	5,66	8,13	91,87
Y4A	12,46	10,59	89,41	0,00	0,00	0,00	5,44	6,99	93,01
CC28	32,71	1,65	98,35	3,60	11,39	88,61	10,93	3,11	96,89
CC29	37,78	1,22	98,78	2,57	10,51	89,49	11,73	11,85	88,15
CC10	34,66	6,87	93,13	3,57	10,92	89,08	10,87	5,06	94,94
Bslm14	25,36	1,18	98,82	5,84	15,41	84,59	13,79	4,13	95,87
CH25	28,08	3,35	96,65	2,93	10,58	89,42	11,09	3,16	96,84
CH24	24,74	2,43	97,57	4,58	20,31	79,69	12,24	3,02	96,98
Bslm9	37,24	8,70	91,30	6,12	30,72	69,28	32,79	2,41	97,59
Sm6	59,00	48,08	51,92	na ^c	na	na	na	na	na
<i>Lab.rhamnosus</i> B103	46,8	94,02	5,98	na	na	na	na	na	na
<i>Leuc.mesenteroides</i> B512	30,84	0	100	na	na	na	na	na	na
<i>Lactobacillus</i> Lmi8	39,2	5,10	94,9	na	na	na	na	na	na

^a AL total: ácido láctico total

^b Proporção de enantiômeros do ácido láctico produzidos em %

^c na: não avaliado

Os isolados mais promissores para produção de L-(+) ácido láctico foram o Ke6 e Ke11 a partir de glicose, Ke8 a partir de sacarose e Ke24 a partir de lactose, já para a produção de D-(-) ácido láctico foram o Y15C a partir de sacarose e glicose e o Y15A a partir de lactose e sacarose. De acordo com Kascak et al., (1996), o *Lactobacillus delbrueckii* utiliza preferencialmente glicose ou sacarose como substrato, enquanto, *Lactobacillus bulgaricus*

utiliza preferencialmente a lactose como substrato. Enquanto o primeiro não é capaz de utilizar lactose como fonte de carbono e energia, o segundo não consegue assimilar sacarose.

Na Tabela 17 é possível observar que as proporções dos isômeros do ácido lático variaram de acordo com a fonte de carbono. De acordo com Hofvendahl e Hahn-hagerdal, (2000), a quantidade do isômero predominante pode ser incrementada com o aumento do pH e com a quantidade de substrato, além disso, processos em batelada favorecem a formação do isômero predominante, entretanto, altas temperaturas e pH não controlado desfavorecem a produção de apenas um isômero.

Desta forma, pode-se afirmar que os micro-organismos selecionados apresentam grande potencial para serem utilizados nos diversos ramos da indústria, principalmente, os isolados de amostras de Keffir e iogurte, pois produziram altas concentrações de ácido lático opticamente puro.

4.2 Caracterizações bioquímicas

Para realizar as caracterizações bioquímicas, foram selecionados os 20 micro-organismos mais promissores (10 produtores de D-(-) e 10 produtores de L-(+) ácido lático), com base na maior produção e na alta pureza óptica (Tabela 18).

Tabela 18

Testes bioquímicos e fisiológicos para determinação dos gêneros das bactérias lácticas.

N	Isolados ^a	45°C	10°C	6,5 % NaCl	18 % NaCl	pH 9,6	CO ₂	Isômero	Morfologia	Gênero
1	Ke6	+ ^b	+	+	-	+	-	L-(+)	Cocos	<i>Enterococcus</i>
2	Ke8	+	+	+	-	-	-	L-(+)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
3	Ke11	-	+	-	-	-	-	L-(+)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
4	Ke24	+	+	-	-	-	-	L-(+)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
5	Ke27	+	+	+	-	+	-	L-(+)	Cocos	<i>Enterococcus</i>
6	Ke1	+	+	+	-	+	-	L-(+)	Cocos	<i>Enterococcus</i>
7	Tort10	+	-	-	-	-	-	L-(+)	Cocos	<i>Streptococcus</i>
8	Ke7	+	+	+	-	-	-	L-(+)	-	-
9	CH17	+	-	-	-	-	-	L-(+)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
10	Ke2	+	+	+	-	-	-	L-(+)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
11	CH25	-	-	+	-	-	+	D-(-)	Cocos	<i>Leuconostoc/Weissela</i>
12	CC28	-	+	+	-	-	+	D-(-)	Cocos	<i>Leuconostoc/Weissela</i>
13	Bslm14	-	+	+	-	-	+	D-(-)	Cocos	<i>Leuconostoc/Weissela</i>
14	CH24	-	+	+	-	-	+	D-(-)	Cocos	<i>Leuconostoc/Weissela</i>
15	Y5N	+	-	-	-	-	-	D-(-)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
16	CC29	-	+	+	-	-	+	D-(-)	Cocos	<i>Leuconostoc/Weissela</i>
17	CC10	-	+	+	-	-	+	D-(-)	Cocos	<i>Leuconostoc/Weissela</i>
18	Y15C	+	-	+	-	-	-	D-(-)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
19	Y15A	+	-	-	-	-	-	D-(-)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>
20	Y15i	+	+	+	-	-	-	D-(-)	Bacilo	<i>Lactobacillus</i>

^a Nenhum dos isolados apresentam motilidade, endósporo, catalase e citocromo oxidase, todos foram Gram +

^b+: presença da característica; -: ausência da característica

Todos os isolados apresentados na Tabela 18 podem ser considerados do tipo metabólico homofermentativo, pois não produziram CO₂ e se mostraram produtores quase que exclusivamente de ácido láctico. Segundo Kandler e Weiss, (1986) nesse tipo metabólico as hexoses são convertidas quase exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof, sendo que 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico.

Os isolados bacterianos Ke24, Ke8, Y15A e Y15C foram submetidos aos testes bioquímicos usando o kit API CHL (BioMérieux), que fornecem identificações fenotípicas. As leituras dos testes foram realizadas após 48 horas de incubação. O isolado Ke24 foi identificado como *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* com 99,20% de ID e o isolado Ke8 foi identificado como *Lactobacillus curvatus ssp curvatus* com 99,90% de ID. A identificação dos isolados Y15A, Y15C, Ke6 e Ke11 não foi possível pelo kit API 50 CHL. Desta forma, os isolados Ke6 e Ke11 foram identificados por biologia molecular e os isolados Y15A e Y15C ainda estão em processo de identificação da espécie.

4.3 Identificação molecular

4.3.1 Extração e quantificação do DNA genômico

Foi realizada a identificação molecular de 15 isolados promissores. A extração desses isolados foi considerada eficiente quando visualizada em gel de agarose 1 %. Foi, também, realizada a quantificação do DNA extraído por espectrofotometria, utilizando o aparelho nanodrop, além da verificação da pureza do DNA extraído (Tabela 19), uma vez que resquícios de proteínas podem interferir em uma série de procedimentos metodológicos.

Tabela 19

Quantificação da extração 16 S rDNA

Nº	Amostra	Concentração de ácido nucléico (ng/ μ l)	260/280
1	Ch24	2559,6	2,1
2	Bslm14	520,7	1,92
3	CC29	1281,6	2,02
4	CC28	795,3	1,97
5	CC10	753,4	2,03
6	Ke6	34,6	1,59
7	Tort10	111,3	2,07
8	Ch17	2165,5	2,11
9	Ke1	395,5	2,05
10	Ch25	231,2	1,98
11	Ke11	1782,8	2,15
12	Ke2	1410,3	2,16
13	Ke7	630,1	2,06
14	Ke27	43,5	1,92
15	SM6	275	1,22

A presença de proteína foi verificada pela leitura a 280 nm e foi realizado o cálculo da relação 260/280, sendo que a razão ideal para DNA é igual ou maior que 1,8. Embora, a relação 260/280 para SM6 e Ke6 tenha sido menor do que a ideal, análises posteriores demonstraram que a quantidade de proteína na amostra não interferiu na identificação dos isolados.

4.3.2 Amplificação por PCR, purificação e seqüenciamento do gene 16S rDNA

Após a realização do PCR realizou-se a purificação para a retirada do excesso de sais, reagentes e primers. O gel da purificação está apresentado na Figura 9.

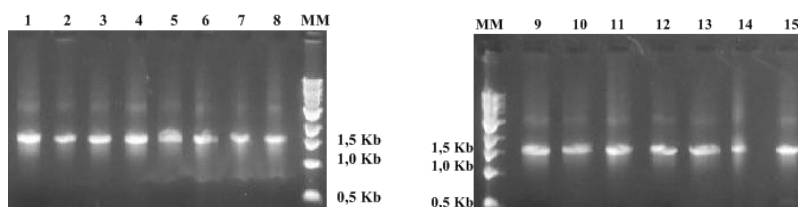


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% da purificação do produto de PCR; linhas de 1 a 8 correspondem aos isolados: Ke6, Tort10, Ch17, Ke1, Ke11, Ke2, Ke7, Ke27 e linhas de 9 a 15 correspondem aos isolados: CC29, CC28 CH24, CH25 BSLM14, CC10 e SM6 respectivamente, MM é o marcador molecular.

Após purificação do DNA, foi realizado o sequenciamento. As seqüências dos isolados foram comparadas com as seqüências do GenBank através do programa BLASTn (NCBI-www.ncbi.nih.gov). Na Tabela 20 são mostradas as estirpes e suas respectivas identificações por similaridade das seqüências do 16S rDNA que variou de 94 a 100% com aproximadamente 700 pb.

Os isolados produtores de D-(-) ácido láctico foram identificados como *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc lactis* e os isolados produtores de L-(+) ácido láctico foram identificados como *Lactobacillus casei*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus rhamnosus*.

Tabela 20

Identificação dos isolados de acordo com a seqüência obtida a partir da região 16S do rDNA e comparação com os dados do Gen Bank.

Isolados	Nº de acesso do Gen Bank da seqüência correspondente	% de homologia com a seqüência do Gen Bank	Identificação
SM6	AB494717.1	98%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Ke11	HM162415.1	97%	<i>Lactobacillus casei</i>
Ke6	HM462408.1	94%	<i>Enterococcus durans</i>
Ke27	FJ917736.1	94%	<i>Enterococcus durans</i>
Ke1	HM058837.1	96%	<i>Enterococcus durans</i>
Tort10	AB489099.1	99%	<i>Streptococcus</i> sp.
Ke7	AY773951.1	96%	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
CH17	HM162419.1	96%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Ke2	HM162415.1	100%	<i>Lactobacillus casei</i>
CH25	GQ466165.1	98%	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
CC28	FJ405229.1	97%	<i>Weissella paramesenteroides</i>
Bslm14	GU344717.1	98%	<i>Leuconostoc lactis</i>
CH24	FJ538548.1	99%	<i>Weissella paramesenteroides</i>
CC29	FJ538548.1	99%	<i>Weissella paramesenteroides</i>
CC10	FJ405229.1	99%	<i>Weissella paramesenteroides</i>

4.4 Produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* Lmism6

4.4.1 - Efeito de diferentes concentrações de melaço, AMM, temperatura e pH.

a) Avaliação da concentração de melaço

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de melaço na produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* Lmism6, foi utilizado meio de fermentação composto de 30 g/L a 250 g/L de ART. Como mostrado na Figura 10 A, a concentração final de ácido láctico aumentou com o aumento da concentração de melaço inicial até 200 g/L. Um decréscimo na produção de ácido láctico foi observado quando se utilizou 250 g/L de ART. Isto pode ter ocorrido, provavelmente, devido à inibição pelo substrato ou por outros

subprodutos da fermentação, ou até pela pressão osmótica. Vários estudos mostraram que o crescimento celular e a produção de ácido lático por bactérias do gênero *Lactobacillus* são inibidos pelo substrato (GONÇALVES et al., 1991; BURGOS-RUBIO et al., 2000).

De acordo com Sule et al., (2004), foram avaliadas diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo (5, 30, 50 e 100 g/L). A máxima concentração de ácido lático foi de 21 g/L utilizando 50 g/L de sacarose. O uso de 100 g/L de sacarose resultou em um declínio drástico da concentração de ácido lático.

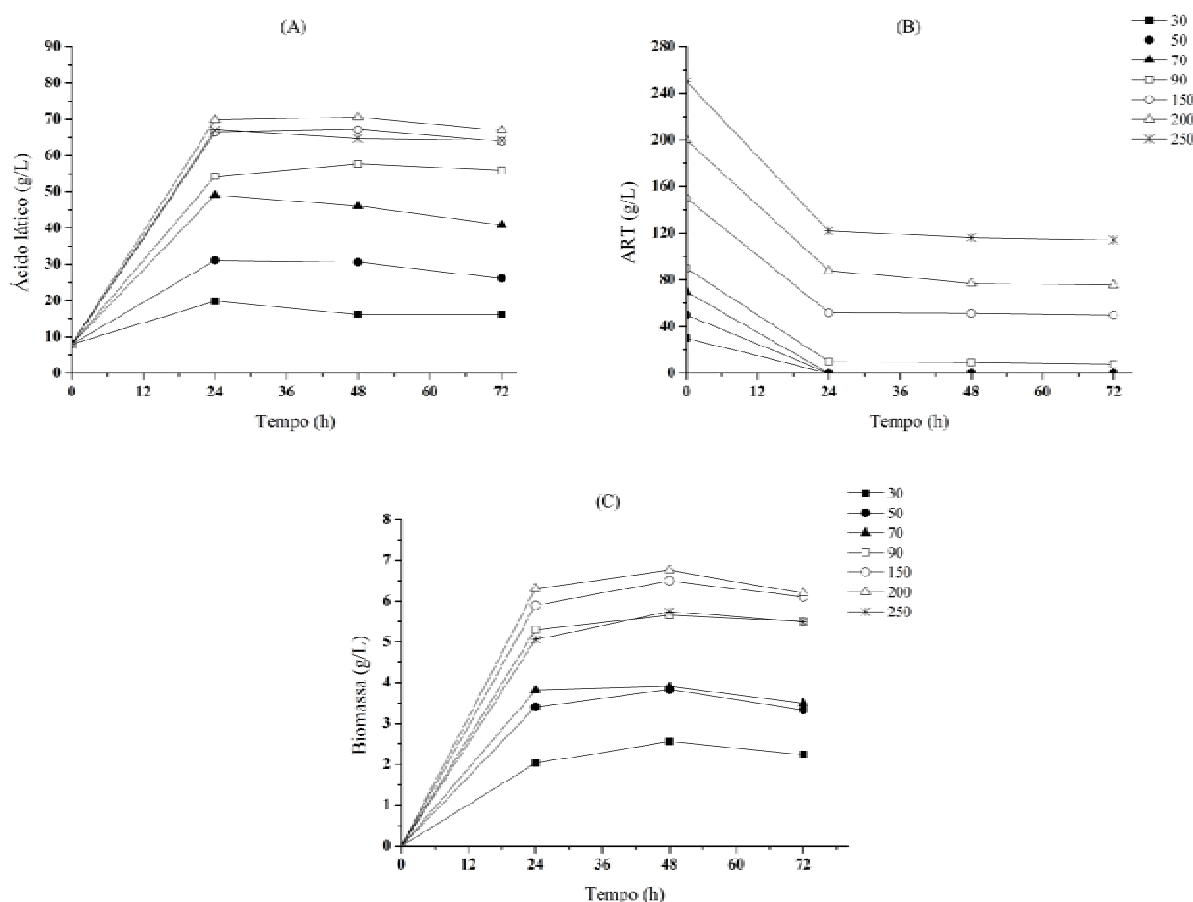


Figura 10 – Efeito de diferentes concentrações de melaço (g/L): 30, 50, 70, 90, 150, 200 e 250 na produção de ácido lático (A), Açúcar redutor (B) e Biomassa (C)

A produção de ácido lático foi maior, alcançando 70,58 g/L em 48 horas de fermentação, em meio de cultivo contendo 200 g/L de ART, entretanto, 37,77 % do ART inicial adicionado não foi utilizado após 72 horas de fermentação. Por outro lado, quando se utilizou concentração de ART inicial de 90 g/L, a produção de ácido lático foi um pouco mais baixa (57,7 g/L), entretanto, apenas 8,54 % do ART adicionado inicialmente, ou seja, 7,69 g/L de ART não foi utilizado (Figura 10 B). Além disso, obteve-se um rendimento maior (0,7 g de

ácido láctico produzido/g de ART consumido). Martínez-González et al., (1988) avaliaram a fermentação láctica do *Lb. delbrueckii* em meio de melaço de cana-de-açúcar hidrolisado com ácido sulfúrico e calor e obtiveram considerável quantidade de açúcares invertidos, obtendo 66,81 g/L de ácido láctico em fermentador de 2 L, contendo 95 g/L de açúcares redutores totais no melaço, sendo que o pH foi mantido a 5,8, a agitação foi de 150 rpm e a temperatura de 40 °C.

Pela Figura 10 C observa-se que o crescimento do *Lactobacillus plantarum* Lmism6 foi menor quando se utilizou concentrações mais baixas de melaço (30 a 70 g/L).

b) Efeito da concentração de nitrogênio

Nitrogênio é necessário para a síntese de aminoácidos, de lipídios e de cofatores enzimáticos. Entretanto, os meios utilizados para o crescimento de bactérias lácticas não são economicamente atrativos, devido ao requerimento de nutrientes de custo elevado, como o extrato de levedura e a peptona (BUSTOS et al., 2004). Uma alternativa é a utilização de AMM para diminuir o custo do processo. AMM contém proteínas solúveis, aminoácidos, vitaminas B e outros nutrientes e tem sido usada como uma fonte de nitrogênio orgânica (MARTÁK et al., 2003).

Ao se analisar a Tabela 21, pode-se afirmar que em concentrações baixas de AMM (5 g/L), a produção de ácido láctico foi significativamente inferior (49,60 g/L). A melhor produção de ácido láctico (71,23 g/L) foi observada na concentração de 35 g/L de AMM. Entretanto, quando se utilizou 55 g/L de AMM ocorreu uma inibição significativa na produção de ácido láctico (Tabela 21). A fonte de nitrogênio é um grande fator de influência sobre o crescimento de *Lactobacillus* (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Como a síntese do ácido láctico por processo fermentativo é associada ao crescimento celular, não há formação de produto se o meio não possuir uma concentração adequada de nitrogênio para promover este crescimento (PRITCHARD, 1993).

Tabela 21

Efeito da concentração de nitrogênio na produção de ácido láctico e produtividade por *Lactobacillus plantarum* Lmism6 em 24 h de fermentação.

Fonte de nitrogênio (g/L)		Ácido láctico (g/L)	Produtividade (g/Lh)
AMM	5	49,60 d	2,06
	15	65,53 c	2,73
	25	70,00 a	2,91
	35	71,23 a	2,98
	45	69,03 ab	2,87
	55	66,82 b	2,78

Neste trabalho pode-se afirmar que o micro-organismo *Lactobacillus plantarum* Lmism6 apresentou uma boa produção de ácido láctico a partir de melaço e AMM, diminuindo consideravelmente os custos de produção.

c) Efeito da temperatura

Foram estudadas as temperaturas de 28 °C, 35 °C e 42 °C. A produção de ácido láctico (72,25 g/L) assim como o crescimento do micro-organismo (6,63 g/L de biomassa) foi significativamente maior na temperatura de 35 °C (Tabela 22), sendo que na temperatura de 42 °C ocorreu um decréscimo na produção de ácido láctico e na biomassa. Panesar et al., (2010) observaram que a produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei*, utilizando soro de queijo, aumentou com o aumento da temperatura até 37 °C, sendo que a máxima produção de ácido láctico (33,72 g/L) foi observada nesta temperatura. Além disso, observaram uma diminuição da produção, em temperatura acima de 40 °C.

Tabela 22

Efeito de diferentes temperaturas na produção de ácido láctico, biomassa e produtividade por *Lactobacillus plantarum* Lmism6 em 24 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Ácido láctico (g/L)	Biomassa (g/L)	Produtividade (g/Lh)
28	64,27 b	5,34 b	2,67
35	72,25 a	6,63 a	3,00
42	55,32 c	4,26 c	2,30

A temperatura, também, é um dos fatores importantes que influencia a atividade metabólica das células dos micro-organismos, a taxa bioquímica de reações, a atividade de enzimas extracelulares e o tempo de geração dos micro-organismos (TANGO; GHALY, 1999). As enzimas são mais ativas na temperatura ideal. A temperatura ótima de crescimento para bactérias lácticas varia entre 20 e 45°C (WOOD; HOLZAPFEL, 1995; DICKS et al., 1995). Em fermentações utilizando *Lb. delbrueckii* e *Lb. bulgaricus*, foi utilizada a temperatura de 45 °C (BUCHTA, 1983). Samuel et al., (1980) usou temperatura de 42 °C para a produção de ácido láctico com *Lb. plantarum*. No entanto, a temperatura de 32 °C, também, foi relatada como ideal, para *Lb. plantarum*, em um estudo feito por McCaskey et al., (1994).

d) Efeito do pH

Foram avaliados os pHs iniciais de 5, 6, 7 e 8 com controle de pH por adição de NaOH 10M, além do pH inicial de 6,5 sem controle de pH (Figura 11).

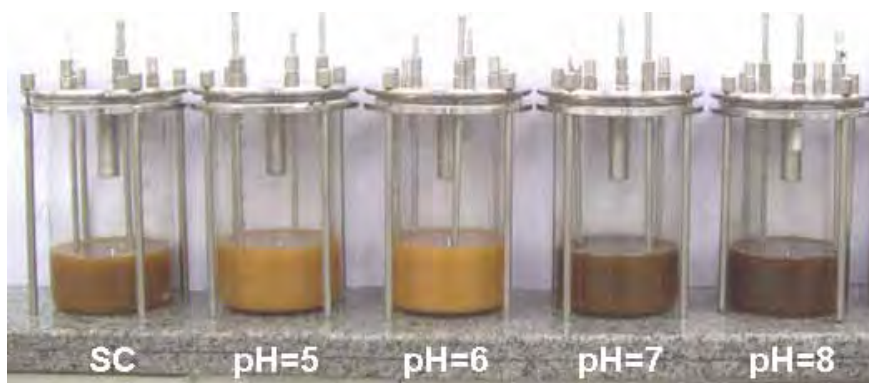


Figura 11 - Produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* Lmism6 em reator sob diferentes pHs (5, 6, 7, 8 com controle de pH) e SC (sem controle de pH, sendo o pH inicial= 6,5) após 54 horas de fermentação.

De acordo com Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, (1997) o pH ótimo para a produção de ácido láctico pelos micro-organismos varia entre 5 e 7, dependendo da espécie. O pH ideal para produção de ácido láctico por *Lb. plantarum* Lmism6 foi 6,0 (Figura 12 A). Nestas condições, obteve-se 104 g/L de ácido láctico em 48 horas de fermentação. Wee et al., (2004) avaliaram a produção e produtividade de L-(+) ácido láctico por *Enterococcus faecalis* sob diferentes pH (5,0 – 9,0). Observaram que a maior produção baseada no total de açúcar consumido (93,6 %) foi obtida com o pH 6,0. Com relação a produtividade, entretanto, o maior valor (4 g/Lh) foi

obtido com pH 7,0. Miura et al., (2003) observaram que a máxima concentração de ácido láctico (93 g/L) foi obtida quando o pH do meio de cultivo encontrava-se entre 6 e 6,5. Estes resultados estão de acordo com os dados observados na Figura 12 A.

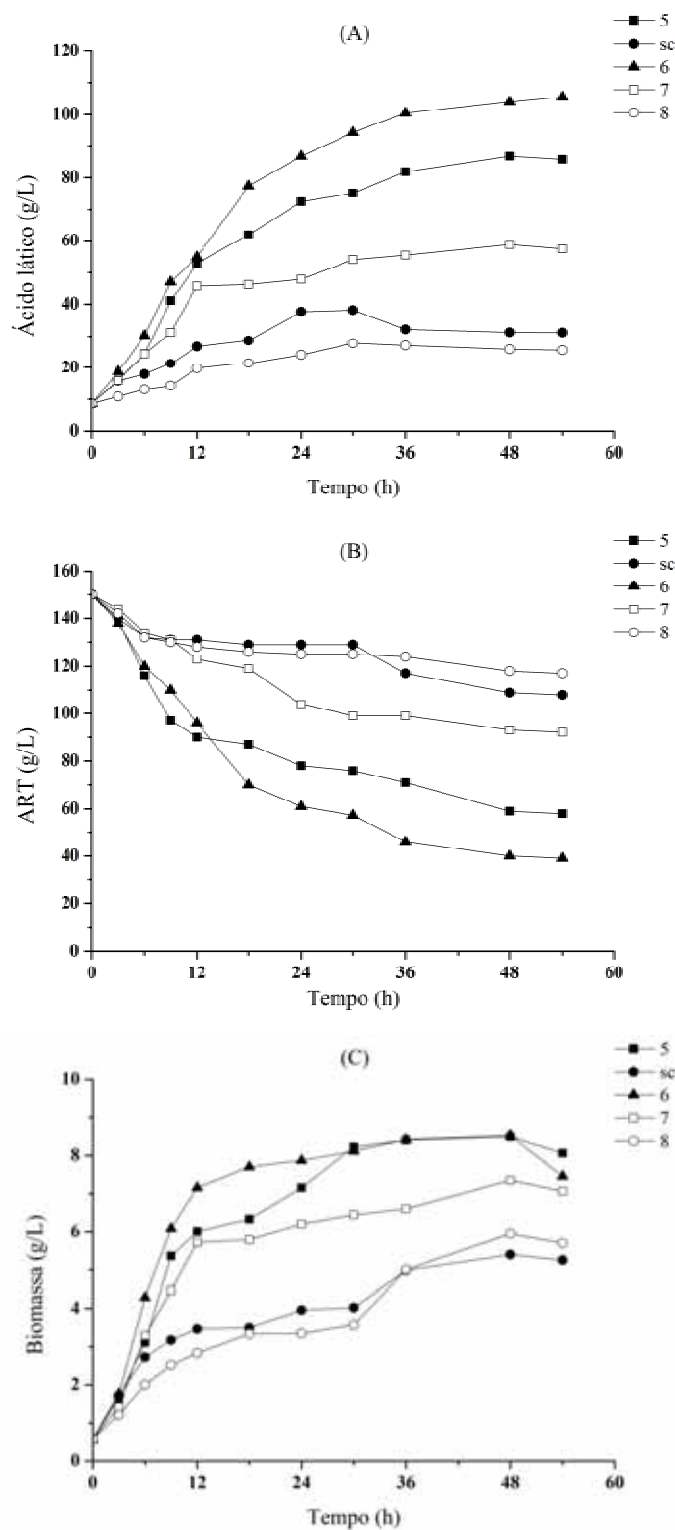


Figura 12 – Efeito do pH na produção de ácido láctico (A), Açúcar residual (B) e Biomassa (C). ^asc é um experimento com pH inicial de 6,5, sem controle de pH durante a fermentação.

A partir da Figura 12 pode-se observar uma forte influência do pH na produção de ácido láctico, crescimento do micro-organismo, assim como no consumo de ART. Sabe-se que o pH é um dos principais fatores que influenciam a produção de ácido láctico, pois a atividade catalítica das enzimas e a atividade metabólica dos micro-organismos dependem do pH extracelular (SILVA; MANCILHA, 1991). Desta forma, a concentração do íon hidrogênio durante a fermentação influencia o crescimento microbiano e a taxa de formação do produto. O pH influencia pelo menos dois aspectos das células microbianas, a síntese de enzimas metabólicas e o transporte de nutrientes dentro da célula. Os valores de pH também influenciam a síntese de RNA e de proteínas (KLOVRYCHEV et al., 1979).

Pode-se observar na Figura 12 que em pH abaixo de 6,0 ou acima, assim como no experimento sem controle de pH, a produção de ácido láctico, a biomassa e o consumo de ART foram inferiores. Tay e Yang, (2002) relatam que a produção do ácido láctico decresce com a diminuição do pH de 6 para 4. Segundo Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, (1997) ácidos fracos inibem o crescimento bacteriano, porque com a queda do pH externo, o ácido é protonado, se difunde de volta para a célula e dissocia-se devido ao pH superior intracelular. A célula então tem que usar ATP para bombear os prótons para fora, desta forma, a energia é totalmente utilizada para a manutenção da homeostase do pH, ocorrendo a parada do crescimento e conseqüentemente morte das bactérias. Além disso, ocorre a autólise das células em alta concentração de ácido láctico. Mussatto et al., (2008), utilizando meio MRS suplementado com cevada hidrolisada e em condições de pH controlado, atingiu uma produção máxima de 35,54 g/L de ácido láctico, enquanto que o mesmo meio sem controle de pH atingiu 13,02 g/L, além disso, observaram menor consumo de substrato e menor crescimento celular na fermentação realizada sem controle de pH.

Assim, o ácido láctico produzido durante a fermentação tem que ser constantemente neutralizado.

4.4.2 - Planejamento experimental Plackett Burman.

Na Tabela 23 encontra-se a matriz do planejamento experimental PB (valores reais e codificados) das variáveis estudadas (X_1 = Acetato, X_2 =MgSO₄, X_3 =MnSO₄, X_4 =Citrato, X_5 =K₂HPO₄, X_6 =Tween 80, X_7 = AMM) adicionadas ao melão, além das respostas para a concentração de ácido láctico, biomassa e ART residual.

Tabela 23

Matriz do planejamento experimental do tipo PB(valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (ácido láctico, ART residual e biomassa)

Ensaio	Variáveis Independentes*							Respostas		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Ácido láctico	ART.res**	Biomassa
								----- g/L -----		
1	5 (1) ^a	0 (-1)	0,1 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	70 (1)	78,64	34,04	6,939
2	5 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	2(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	5,44	149,57	0,185
3	0 (-1)	0,2 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	17,92	100,02	0,604
4	5 (1)	0 (-1)	0,1 (1)	2(1)	0 (-1)	1 (1)	0 (-1)	13,96	30,86	0,461
5	5 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	2(1)	2 (1)	0 (-1)	70 (1)	85,04	20,79	6,151
6	5 (1)	0,2 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	2 (1)	1 (1)	0 (-1)	42,64	101,61	1,876
7	0 (-1)	0,2 (1)	0,1 (1)	2(1)	0 (-1)	1 (1)	70 (1)	82,40	48,08	6,122
8	0 (-1)	0 (-1)	0,1 (1)	2(1)	2 (1)	0 (-1)	70 (1)	81,32	18,40	7,097
9	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2(1)	2 (1)	1 (1)	0 (-1)	40,64	106,38	2,568
10	5 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	1 (1)	70 (1)	96,48	45,43	6,760
11	0 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (1)	70 (1)	85,20	30,86	6,674
12	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	6,00	138,97	0,255

^a (-1) e (1) são níveis codificados.

*X₁= Acetato, X₂=MgSO₄, X₃=MnSO₄, X₄=Citrato, X₅=K₂HPO₄, X₆=Tween 80, X₇=AMM

**ART.res= Açúcar redutor total residual

Observa-se que a AMM foi a variável de maior influência na produção de ácido láctico, seguida da concentração de fosfato de potássio e Tween 80. Este fato pode ser melhor observado na Figura 13 (Gráfico de Pareto), onde os efeitos das variáveis estão representados.

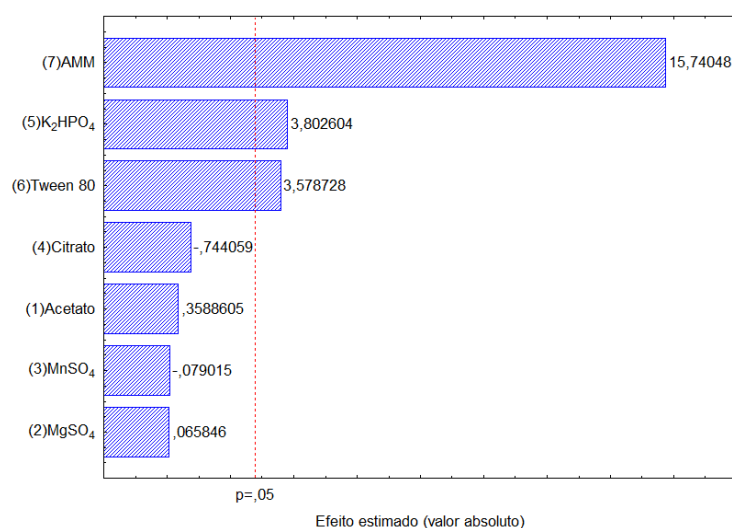


Figura 13 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a produção de ácido láctico.

Estas três variáveis tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95 %, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumenta do nível -1 para o +1, ocorre um aumento na concentração de ácido láctico. Portanto, as variáveis utilizadas para a otimização da produção de ácido láctico a partir de melaço foram, além da própria concentração de melaço, a concentração de AMM, de fosfato de potássio e de Tween

80. Desta forma, foram avaliadas diferentes concentrações dessas variáveis, sendo que a temperatura e a agitação foram fixadas nos valores de 35 °C e 150 rpm respectivamente.

4.4.3 - Planejamento Composto Central e Metodologia da Superfície de Resposta.

A Tabela 24 apresenta os valores reais e codificados do planejamento experimental delineamento composto central (DCC) das variáveis estudadas: concentração de ART de melaço de cana de açúcar, AMM, K_2HPO_4 e Tween 80 e a produção de ácido láctico.

Tabela 24

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

Experimentos	Variáveis independentes				Respostas (g/L)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Ácido láctico	ART residual
1	120 (-1) ^a	15 (-1)	1 (-1)	0,5 (-1)	48,90	44,91
2	120 (-1)	15 (-1)	1 (-1)	1,5 (1)	54,90	46,48
3	120 (-1)	15 (-1)	3 (1)	0,5 (-1)	59,80	34,95
4	120 (-1)	15 (-1)	3 (1)	1,5 (1)	66,00	38,19
5	120 (-1)	45 (1)	1 (-1)	0,5 (-1)	71,40	33,15
6	120 (-1)	45 (1)	1 (-1)	1,5 (1)	75,00	37,97
7	120 (-1)	45 (1)	3 (1)	0,5 (-1)	80,00	26,21
8	120 (-1)	45 (1)	3 (1)	1,5 (1)	83,00	29,12
9	220 (1)	15 (-1)	1 (-1)	0,5 (-1)	61,60	97,45
10	220 (1)	15 (-1)	1 (-1)	1,5 (1)	68,90	136,42
11	220 (1)	15 (-1)	3 (1)	0,5 (-1)	69,30	116,04
12	220 (1)	15 (-1)	3 (1)	1,5 (1)	76,30	110,44
13	220 (1)	45 (1)	1 (-1)	0,5 (-1)	75,70	96,10
14	220 (1)	45 (1)	1 (-1)	1,5 (1)	79,15	82,44
15	220 (1)	45 (1)	3 (1)	0,5 (-1)	82,00	109,54
16	220 (1)	45 (1)	3 (1)	1,5 (1)	90,20	118,28
17	70 (-2)	30 (0)	2 (0)	1 (0)	63,40	0,41
18	270 (2)	30 (0)	2 (0)	1 (0)	78,30	175,48
19	170 (0)	0 (-2)	2 (0)	1 (0)	43,00	90,50
20	170 (0)	60 (2)	2 (0)	1 (0)	76,00	72,91
21	170 (0)	30 (0)	0 (-2)	1 (0)	63,10	89,71
22	170 (0)	30 (0)	4 (2)	1 (0)	80,20	66,75
23	170 (0)	30 (0)	2 (0)	0 (-2)	76,40	81,99
24	170 (0)	30 (0)	2 (0)	2 (2)	86,30	78,96
25	170 (0)	30 (0)	2 (0)	1 (0)	85,20	65,07
26	170 (0)	30 (0)	2 (0)	1 (0)	86,00	67,51
27	170 (0)	30 (0)	2 (0)	1 (0)	85,10	62,61
28	170 (0)	30 (0)	2 (0)	1 (0)	85,90	63,28

^a (-2), (-1), (0), (1) e (2) são níveis codificados.

*X₁= ART do melaço (g/L de ART), X₂= AMM (mL/L), X₃= K_2HPO_4 (g/L), X₄= Tween 80 (mL/L).

Após a realização da regressão múltipla, obteve-se a seguinte equação geral para a produção de ácido láctico:

$$Y = 85,5 + 3,91X_1 + 8,19X_2 + 4,38X_3 + 2,69X_4 - 3,58X_1^2 - 6,42X_2^2 - 3,38X_3^2 - 0,96X_4^2 - 1,8X_1X_2 - 0,39X_1X_3 + 0,44X_1X_4 - 0,19X_2X_3 - 0,51X_2X_4 + 0,25X_3X_4 \quad (4.1)$$

O modelo quadrático da equação 3 contém quatro termos lineares, quatro termos quadráticos e seis interações fatoriais, em que Y é a resposta predita (concentração de ácido láctico) e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são os valores codificados de melaço, AMM, K_2HPO_4 e Tween 80, respectivamente.

A Tabela 25 demonstra a distribuição *t* de Student e os valores de probabilidade (*p*) que servem como ferramenta para checar a significância de cada coeficiente. Valores menores de *p* denotam coeficiente mais significativo.

Tabela 25

Coeficiente do modelo estimado pela regressão linear

Fator	Coeficiente	Erro padrão	<i>t</i> -valor	<i>P</i> -valor
Intercepto	85,55000	0,487286	175,5641	0,000000
X_1	3,91458	0,198934	19,6778	0,000000
X_2	8,19792	0,198934	41,2093	0,000000
X_3	4,38542	0,198934	22,0446	0,000000
X_4	2,68958	0,198934	13,5200	0,000000
X_1^2	-3,58385	0,198934	-18,0153	0,000000
X_1X_2	-1,80313	0,243643	-7,4007	0,000005
X_1X_3	-0,38438	0,243643	-1,5776	0,138669
X_1X_4	0,44688	0,243643	1,8341	0,089618
X_2^2	-6,42135	0,198934	-32,2789	0,000000
X_2X_3	-0,19688	0,243643	-0,8080	0,433602
X_2X_4	-0,51562	0,243643	-2,1163	0,054183
X_3^2	-3,38385	0,198934	-17,0100	0,000000
X_3X_4	0,25313	0,243643	1,0389	0,317781
X_4^2	-0,95885	0,198934	-4,8200	0,000335

$R^2 = 0,9970$; R^2 ajustado = 0,9933; $R = 0,9984$;

Os resultados mostraram que as variáveis X_1 (melaço), X_2 (AMM), X_3 (K_2HPO_4) e X_4 (Tween 80) tiveram efeito significativo (*P*-valor < 0,05). Além disso, os sinais do coeficiente

foram positivos, ou seja, um aumento nas suas concentrações proporciona um aumento da resposta (ácido láctico). As variáveis quadráticas X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , X_4^2 e a interação X_1X_2 , foram, também, significativas. Assim, as variáveis que não foram significativas (X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 , X_3X_4) foram retiradas do sistema e foi construído um modelo ajustado incluindo apenas as variáveis codificadas significativas $p < 0,05$ expresso pela equação 4.2:

$$Y = 85,55 + 3,9X_1 + 8,19X_2 + 4,38X_3 + 2,68X_4 - 3,58X_1^2 - 1,8X_1X_2 - 6,42X_2^2 - 3,38X_3^2 - 0,95X_4^2 \quad (4.2)$$

O modelo quadrático ajustado da superfície de resposta foi realizado sob a forma de análise de variância (ANOVA) e os resultados estão demonstrados na Tabela 26.

Tabela 26

Análise de variância do modelo polinomial de segunda ordem.

Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	$p > F$
Regressão	3853,152	9	428,1280	323,7185	0,0000
Residual	23,806	18	1,3225		
Falta de ajuste	23,156	15	1,544	7,125	0,06574
Erro puro	0,650	3	0,217		
Total	3876,957	27			

$$R^2 = 0,9938; R^2_{\text{ajustado}} = 0,9907; R = 0,9969$$

A ANOVA do modelo de regressão quadrático demonstrou que o modelo é significativo, como é evidente pelo teste de Fisher, teste-F ($F_{\text{calc}}(9,18) = 323,7185 > F_t(9,18) = 2,46$) e tem um valor de probabilidade muito baixo ($p < 0,0000$). 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 (0,9938) indica que 99,38 % da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo. O coeficiente de determinação ajustado ($R^2 = 0,9907$) também foi satisfatório para confirmar a significância do modelo.

A Figura 14 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero e a Figura 15, o gráfico de valores predito em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos. Além disso, o valor de falta de ajuste para a equação Eq. (4.2) não foi significativa a 5% ($p > 0,05$), indicando a boa previsibilidade do modelo. Todos os resíduos foram menores que 2 %, o que indica que o modelo está adequado para descrever a produção de ácido láctico.

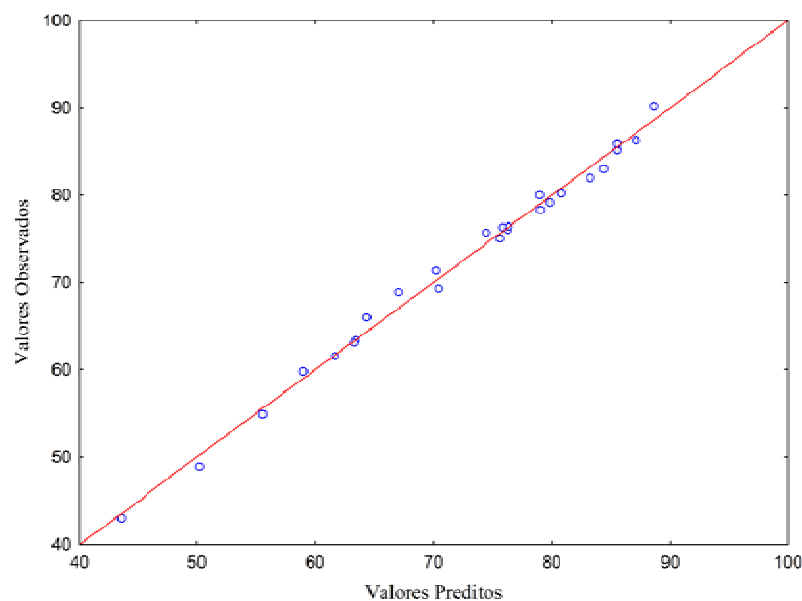


Figura 14 - Valores preditos em função dos observados relativos à produção de ácido láctico

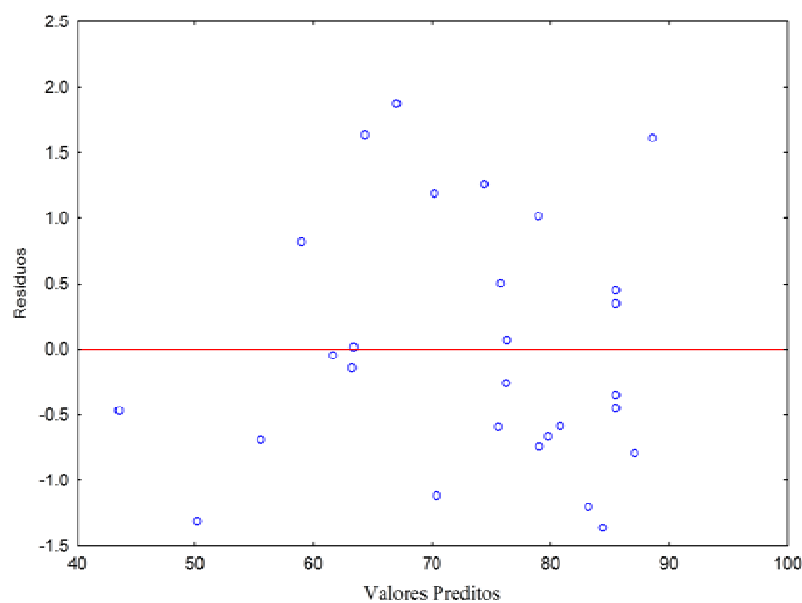


Figura 15 - Distribuição dos resíduos relativos à síntese de ácido láctico

A partir da equação ajustada 4.2 foram construídas as superfícies de resposta para produção de ácido láctico, apresentadas nas Figuras 16 e 17 que ajudam a entender as interações das variáveis, concentração de ART do melão, AMM, K_2HPO_4 e Tween 80 na produção de ácido láctico. Além de auxiliar na localização da região ótima de cada variável para a máxima resposta.

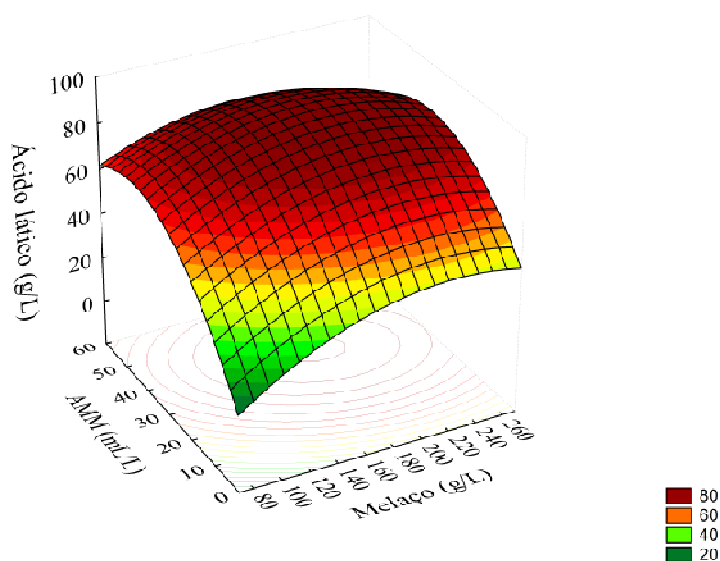


Figura 16 - Superfície de resposta e contorno para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* Lmism6, mostrando a interação entre AMM e melaço, em níveis constantes de K_2HPO_4 (2 g/L) e Tween 80 (1 mL/L).

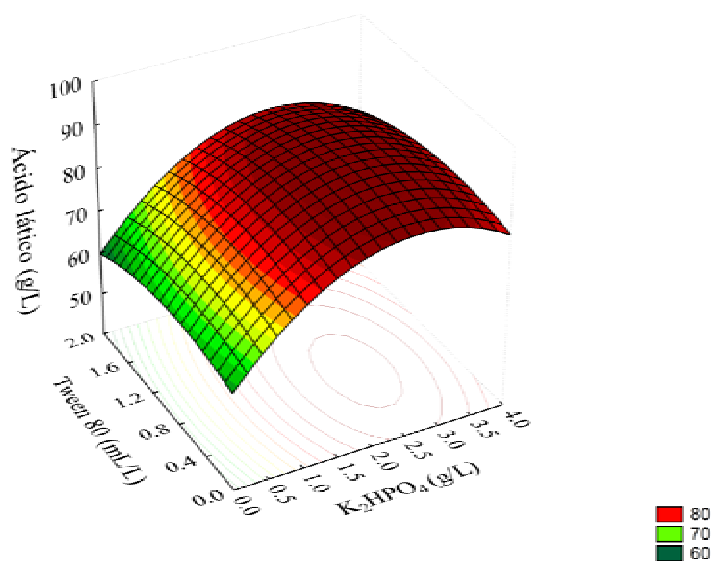


Figura 17 - Superfície de resposta e contorno para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* Lmism6, mostrando a interação entre Tween 80 e K_2HPO_4 , em níveis constantes de melaço (170 g/L) e AMM (30 mL/L).

Pela análise da Figura 16 observa-se uma forte influência das concentrações de melaço e de AMM, na produção de ácido láctico. A região ótima para produção esta entre 160 e 200

g/L de melaço e entre 30 e 50 mL/L de AMM. Entretanto, ambos, em concentrações superiores, causam inibição da produção de ácido láctico.

Devido sua composição rica em açúcares fermentescíveis (LIMA et al., 1975), nitrogênio e vitaminas, seu baixo custo e alta disponibilidade no território brasileiro, o melaço de cana-de-açúcar é sugerido como substrato para melhorar e reduzir os custos na produção de ácido láctico. Entretanto, a maioria dos resultados sobre o ácido láctico produzido (17–90 g/L) e a produtividade (2,0 – 4,0 g/L h) em fermentações em batelada são relativamente baixas (MONTEAGUDO et al., 1994; GOKSUNGUR; GUVENC et al., 1997; GOKSUNGUR; GUVENC, 1999; KOTZAMANIDIS et al., 2002). Assim, pode ser necessário o tratamento adicional do melaço com ácido sulfúrico, fosfato tricalcico, ferrocianeto de potássio e EDTA, para aumentar a eficiência na fermentação, porque o melaço contém metais pesados (ferro, zinco, cobre e manganês), além de magnésio e cálcio, que podem inibir o crescimento celular, afetar o pH do meio, e inativar as enzimas associadas com a formação do produto (ROUKAS, 1998). Desta forma, Martínez-González et al., (1988) avaliaram a fermentação láctica do *Lb. delbrueckii* em meio de melaço de cana-de-açúcar hidrolisado com ácido sulfúrico e calor e obtiveram considerável quantidade de açúcares invertidos, obtendo 66,81 g/L de ácido láctico em fermentador de 2 L, contendo 95 g/L de açúcares redutores totais no melaço.

Observa-se pela Figura 17 que a adição de Tween 80 no meio de fermentação aumentou significativamente a produção de ácido láctico. Este resultado está de acordo com Belhocine, (1987), que observaram que a suplementação de 1 g/L de Tween 80 aumentou consideravelmente o crescimento e a produção de ácido láctico por *Lb. helveticus*. Yu et al., (2008) observaram que a adição de 1,5 mL/L de Tween 80 em meio de fermentação contendo melaço e AMM aumentou significativamente a produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466.

A partir da superfície de resposta da Figura 17 é possível observar a forte influência da concentração de fosfato de potássio na produção de ácido láctico, sendo que a região ótima esta entre 2 e 3,5 g/L de K_2HPO_4 . Honorato et al., (2007) observaram que a complementação de fosfato no meio de cultura formulado com suco de caju favoreceu o crescimento do micro-organismo, uma vez que este componente age tamponando o meio e permitindo que a fermentação seja conduzida por mais tempo em valores de pH próximos ao valor ótimo de crescimento. Um maior crescimento do micro-organismo leva a uma maior produção de ácido láctico.

O ponto de máxima produção de ácido láctico foi determinado através de uma análise canônica do modelo ajustado. De acordo com a metodologia descrita no Item 3.7, o ponto estacionário é dado por:

$$X_0 = -B^{-1} b/2 \quad (4.3)$$

Foi realizado um estudo para identificar a natureza do ponto estacionário para saber se era um ponto de máxima ou mínima resposta, ou ainda de um ponto de sela. Isto foi feito calculando-se as raízes características da matriz B, que é a matriz dos coeficientes dos termos quadráticos e dos termos de interação do modelo ajustado. Portanto temos a Equação 4.4:

$$B = \begin{bmatrix} -3,58 & -0,9 & -0,19 & 0,22 \\ -0,9 & -6,42 & -0,10 & -0,26 \\ -0,19 & -0,10 & -3,38 & 0,12 \\ 0,22 & -0,26 & 0,12 & -0,95 \end{bmatrix} \quad (4.4)$$

Cujas raízes características são iguais a:

$$\lambda_1 = -6,69 \quad \lambda_2 = -3,54 \quad \lambda_3 = -3,19 \quad \lambda_4 = -0,90$$

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

O vetor dos coeficientes dos termos de 1ª ordem da Equação 4.1 é dado por:

$$b = \begin{bmatrix} 3,9 \\ 8,18 \\ 4,37 \\ 2,67 \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

Com o vetor b e com a matriz B calculou-se o ponto estacionário x_0 através da Equação 4.3.

$$x_0 = \begin{bmatrix} 0,47 \\ 0,50 \\ 0,65 \\ 1,46 \end{bmatrix} \quad (4.6)$$

No qual 0,47, 0,50, 0,65 e 1,46 correspondem respectivamente aos valores das variáveis independentes X_1 , X_2 , X_3 e X_4 no ponto estacionário. Com o auxílio das Equações (3.2), (3.3), (3.4) e (3.5), demonstradas na parte de materiais e métodos, obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da síntese de ácido láctico. Para as fermentações realizadas com *Lb. plantarum* Lmism6, as condições que resultam em

maior produção de ácido láctico são 193,50 g/L de melaço, 37,50 mL/L de AMM, 2,65 g/L de K_2HPO_4 e 0,83 mL/L de Tween 80. Substituindo esses valores na Equação 4.1, obteve-se a estimativa da máxima concentração de ácido láctico, pela análise canônica, 91,61 g/L. Para confirmar se o modelo estava adequado para prever a máxima produção de ácido láctico, três experimentos adicionais foram conduzidos com a composição do meio considerada ótima. A média dos valores de produção de ácido láctico foi de 94,8 g/L, que esta de acordo com o valor predito 91,61 g/L. Então, foi provado que este modelo é adequado.

O melaço é uma matéria prima economicamente viável para produção industrial de ácido láctico, tem os nutrientes necessários para o crescimento de bactérias lácticas, além de alto teor de açúcares fermentáveis. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi verificado que o *Lactobacillus plantarum* Lmism6 é um micro-organismo promissor para produção de ácido láctico a partir de melaço. Entretanto é importante observar a qualidade do melaço, que depende da maturidade da cana de açúcar, da quantidade de açúcar extraído e do método de extração. O teor de açúcares fermentescíveis do melaço varia inversamente com a pureza do açúcar bruto produzido na fábrica (GOPAL; KAMMEN, 2009). Além disso, o melaço é procedente de lavouras de cana-de-açúcar que geralmente recebem aplicação de herbicidas e pesticidas, os quais podem aparecer na composição do mesmo, podendo prejudicar o processo fermentativo (DE OLIVEIRA et al., 2005). Desta forma, um lote de melaço está sujeito a grande variação, o que poderia influenciar a produção de ácido láctico.

Pela Tabela 24, observou-se que a maior produção de ácido láctico (90,2 g/L) foi obtida no experimento 16, em que se utilizou 220 g/L de ART de melaço, 45 mL/L de AMM, 3 g/L de K_2HPO_4 e 1,5 mL/L de Tween 80, entretanto, 118,28 g/L de ART não foi utilizado, o que inviabilizaria o processo, devido aos altos custos de purificação. Desta forma, pensando no menor custo com relação ao processo final de purificação, pode-se afirmar que o experimento 17, utilizando 70 g/L de ART de melaço, 30 mL/L de AMM, 2 g/L de K_2HPO_4 e 1 mL/L de Tween 80, em que se obteve 63,4 g/L de ácido láctico e o menor residual de açúcar (0,41), assim como a maior conversão de substrato 99,41 % foi o ideal. Entretanto, estudos futuros que considerem alta produtividade e produção e evitem inibição por substrato, por meio de uma fermentação em batelada alimentada são necessários para melhorar o processo de fermentação.

4.5 Produção de L-(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*

4.5.1 Fermentações com diferentes fontes de carbono.

Os resultados da influência de quatro fontes de carbono, soro de queijo, caldo de cana de açúcar, melaço e manipueira na produção e produtividade de L-(+) ácido láctico estão apresentados na Tabela 27

Tabela 27

Efeito de diferentes fontes de carbono na produção e na produtividade de L-(+) ácido láctico após 24 horas de fermentação com concentração inicial de ART de 40 g/L.

Fonte de carbono	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)	ART residual (g/L)
Soro de queijo	34,1	1,42	0
Melaço	13,9	0,579	16,4
Caldo de cana	24,6	1,025	8
Manipueira	26	1,08	7,2

De acordo com a Tabela 27, dentre as quatro fontes de carbono avaliadas, o soro de queijo foi a variável que proporcionou maior produção e produtividade de L-(+) ácido láctico, pelo *Lactobacillus rhamnosus* B103, além disso, a lactose (40 g/L) de soro de queijo foi completamente consumida após 24 horas de fermentação. Estes resultados estão de acordo com os estudos feitos por Senthuran et al., (1999) em que observaram que *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* prefere lactose como fonte de carbono para crescimento e produção de ácido láctico, seguido por glicose e maltose, enquanto sacarose foi utilizado em menor proporção. Demonstraram que a lactose usada na concentração de 50 g/L em meio sintético foi completamente utilizada pelo micro-organismo, dando um produtividade de 2 g/L.h e uma massa seca final das células de 5,1 g/L, enquanto que em meio contendo somente glicose na mesma concentração foi observado crescimento atrasado e utilização incompleta de substrato, além de menor produtividade (0,9 g/L.h). O melhor desempenho com lactose poderia ser explicado pelo envolvimento de intermediários no metabolismo da galactose, produto da hidrólise da lactose, na síntese da parede celular (MOUSTAFA; COLLINS, 1968), o que pode ter contribuído com o aumento da viabilidade e crescimento das células e subsequentemente aumento na produção de ácido láctico.

4.5.2 Fermentação com diferentes fontes de nitrogênio

Os resultados da influência de cinco fontes de nitrogênio: autolisado de levedura, extrato de levedura, AMM, sulfato de amônio e pro-floo (proteína da semente de algodão) na produção e produtividade de L-(+) ácido láctico estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28

Efeito da suplementação do soro de queijo (45 g/L de lactose) com diferentes fontes de nitrogênio na produção e na produtividade de ácido láctico.

Fonte de nitrogênio ^a (g/L ou mL/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/Lh)	Lactose residual (g/L)
Extrato de levedura 15	39,96	1,66	0
Autolisado de levedura 12,78	33,17	1,38	11,10
AMM 36,75	39,40	1,64	0
Pró-floo 15,47	33,02	1,37	9,26
(NH ₄) ₂ SO ₄ 6,94	15,00	0,62	26,62

^a A quantidade de cada fonte de nitrogênio foi determinada de acordo com a concentração de nitrogênio contida em 15 g/L de extrato de levedura, ou seja 1,47 g/L de nitrogênio.

Uma vez que bactérias lácticas são nutricionalmente exigentes, necessitando de diferentes aminoácidos e vitaminas para o crescimento, é de extrema importância escolher o tipo adequado de fonte de nitrogênio.

A menor produtividade de ácido láctico foi com o (NH₄)₂SO₄. Isto pode ter ocorrido, pois em meios suplementados com (NH₄)₂SO₄, íons de amônio influenciam no metabolismo de alguns *Lactobacillus* (BUCHTA, et al. 1983), pela sua incorporação como α-cetoglutarato e glutamato (DUNN, 1985). Assim, quando (NH₄)₂SO₄ é utilizado, o nitrogênio inorgânico deve primeiro ser convertido em aminoácidos e, em seguida, utilizado para a síntese de proteínas necessárias para o crescimento do micro-organismo e produção de ácido láctico.

Dentre as cinco fontes de nitrogênio avaliadas, o extrato de levedura e a AMM foram as variáveis que proporcionaram maior produção e produtividade de L-(+) ácido láctico, além disso, em ambas, observou-se consumo completo de lactose após 24 horas, pelo *Lactobacillus rhamnosus* (Tabela 28). Vahvaselka e Linko, (1987) investigaram o efeito do extrato de levedura, do hidrolisado de caseína, hidrolisado de proteína de soro de queijo, AMM e extrato de malte na produção de ácido láctico por *Lactobacillus helveticus* em ultrafiltrados de leite.

Dentre esses, o extrato de levedura (5 g/L) foi o que apresentou o melhor resultado, seguido pelos hidrolisados. Entretanto a AMM e o extrato de malte tiveram somente um efeito pequeno na produção. Roy et al., (1986) observaram que algumas espécies de micro-organismos em soro de queijo produziram mais em meio suplementado com extrato de levedura do que com AMM, sendo que a melhor concentração de extrato de levedura foi 15 g/L. Um efeito significativamente melhor do extrato de levedura em relação a AMM foi, também, reportado por Cox e MacBean, (1977) utilizando uma estirpe de *Lb. bulgaricus*. Isso provavelmente ocorre porque o extrato de levedura é uma excelente fonte de vitaminas do complexo B e é freqüentemente usado para fornecer esses fatores em meios de cultura bacteriológicos, sendo considerado, muitas vezes, indispensável para se obter rápidas taxas de crescimento e produção de ácido láctico por bactérias lácticas (SELMER-OLSEN; SORHAUG, 1998).

A partir da Tabela 28, pode-se observar que a produção de ácido láctico utilizando AMM (39,4 g/L) foi semelhante ao meio com extrato de levedura (39,96 g/L), após 24 horas de fermentação. Desta forma, a AMM pode ser utilizada em substituição ao extrato de levedura, uma vez que o alto custo do extrato de levedura tem um impacto negativo quando utilizados em processos industriais (HUROK et al., 2005). Sabe-se que a AMM contém proteínas solúveis, aminoácidos, vitaminas B e outros nutrientes e tem sido usada como uma fonte de nitrogênio orgânica (MARTÁK et al., 2003). Além disso, há muito tempo a AMM provou ser uma alternativa mais econômica do que outras fontes de nitrogênio como extrato de levedura e peptona (LIGGETT et al., 1948).

A utilização de fontes de nitrogênio baratas que substituam completamente o extrato de levedura tem sido intensamente discutida. Pauli e Fitzpatrick, (2002) estudaram a produtividade de ácido láctico por *Lactobacillus casei*, em meio de fermentação composto por soro de queijo (55 g/L de lactose) e observaram que a suplementação do meio com 5% de extrato de malte proporcionou produtividade semelhante ao obtido com soro suplementado com extrato de levedura, após 55 h. Em fermentação de estado sólido, peptona e extrato de levedura foram substituídos por farinha de lentilha e fermento em um meio MRS modificado (ALTAF et al., 2006). Yu et al., (2008) observaram que a AMM em meio de fermentação a base de melaço juntamente com outros componentes importantes no meio pode substituir completamente o extrato de levedura, o meio otimizado resultou em uma concentração de ácido láctico 30,4 % maior do que meio com extrato de levedura.

4.5.3 Otimização da produção de L-(+) ácido láctico usando soro de queijo.

4.5.3.1 Planejamento do tipo Plackett–Burman.

Na Tabela 29 encontra-se a matriz do planejamento experimental PB de 12 ensaios (valores reais e codificados) para avaliação do efeito, na produção de ácido láctico, de sete variáveis (X_1 = Acetato, X_2 =MgSO₄, X_3 =MnSO₄, X_4 =Citrato, X_5 =K₂HPO₄, X_6 =Tween 80, X_7 = AMM) adicionadas ao soro de queijo.

Tabela 29

Matriz do planejamento experimental do tipo PB (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (ácido láctico)

Ensaio	Variáveis Independentes*							Resposta
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	Ácido láctico ----- g/L -----
1	5 (1) ^a	0 (-1)	0,1(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	70 (1)	82,84
2	5 (1)	0,2(1)	0 (-1)	2(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	11,52
3	0 (-1)	0,2(1)	0,1(1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	13,40
4	5 (1)	0 (-1)	0,1(1)	2(1)	0 (-1)	1 (1)	0 (-1)	17,08
5	5 (1)	0,2(1)	0 (-1)	2(1)	2 (1)	0 (-1)	70 (1)	75,48
6	5 (1)	0,2(1)	0,1(1)	0 (-1)	2 (1)	1 (1)	0 (-1)	19,60
7	0 (-1)	0,2(1)	0,1(1)	2(1)	0 (-1)	1 (1)	70 (1)	90,04
8	0 (-1)	0 (-1)	0,1(1)	2(1)	2 (1)	0 (-1)	70 (1)	80,00
9	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2(1)	2 (1)	1 (1)	0 (-1)	12,05
10	5 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	1 (1)	70 (1)	84,60
11	0 (-1)	0,2(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (1)	70 (1)	86,40
12	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	14,40

^a (-1) e (1) são níveis codificados.

* X_1 = Acetato, X_2 =MgSO₄, X_3 =MnSO₄, X_4 =Citrato, X_5 =K₂HPO₄, X_6 =Tween 80, X_7 =AMM

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 29, na faixa de concentração investigada, verifica-se que a produção de L-(+) ácido láctico aumenta com o aumento da concentração de AMM, Tween 80 e MnSO₄. Este fato pode ser melhor observado na Figura 18 (Gráfico de Pareto), onde os efeitos das variáveis estão representados.

Observa-se que a AMM foi a variável de maior influência na produção de ácido láctico, seguida da concentração de Tween 80 e MnSO₄. Estas três variáveis tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95%, o que significa que quando a concentração e/ou

faixa destas variáveis aumentaram do nível -1 para o +1, houve aumento na produção de ácido láctico. Portanto, para otimizar a produção de ácido láctico deve-se deslocar os níveis de estudo para valores superiores para a concentração de AMM, Tween 80 e MnSO_4 .

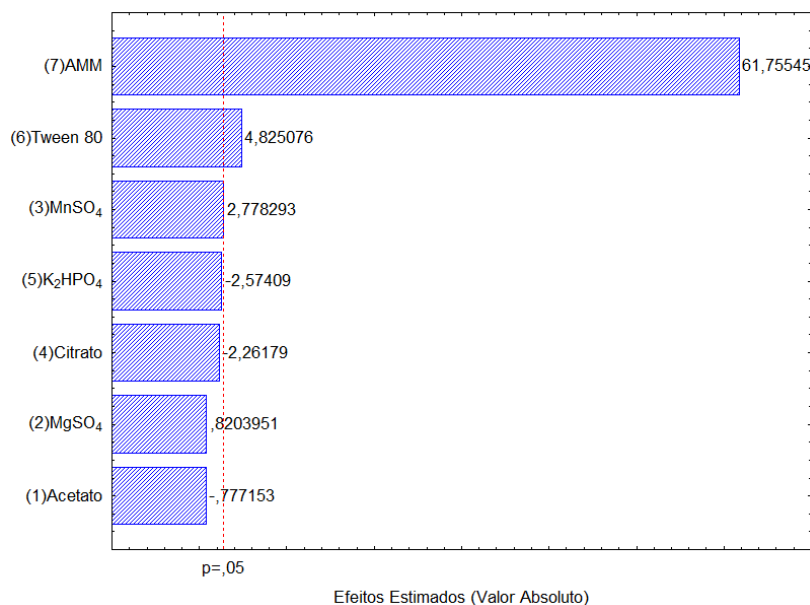


Figura 18 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a produção de L-(+) ácido láctico.

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

A influência das variáveis, concentração de lactose (X_1), concentração de AMM (X_2), Tween 80 (X_3) e MnSO_4 (X_4) na produção de L-(+) ácido láctico foi estudada segundo um planejamento fatorial composto central com quatro réplicas do ponto central, perfazendo um total de 28 experimentos. A matriz do planejamento, assim como a produção de ácido láctico e o açúcar residual, está apresentada na Tabela 30.

Tabela 30

Matriz do planejamento experimental composto central (valores reais e codificados) com as respostas de ácido láctico.

Experimentos	Variáveis independentes*				Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Ácido láctico	ART residual
1	110 (-1) ^a	30 (-1)	0,5 (-1)	0,05 (-1)	83,00	9,78
2	110 (-1)	30 (-1)	0,5 (-1)	0,15 (1)	82,10	11,88
3	110 (-1)	30 (-1)	1,5 (1)	0,05 (-1)	88,85	9,33
4	110 (-1)	30 (-1)	1,5 (1)	0,15 (1)	79,00	11,54
5	110 (-1)	90 (1)	0,5 (-1)	0,05 (-1)	91,00	1,45
6	110 (-1)	90 (1)	0,5 (-1)	0,15 (1)	101,00	0,70
7	110 (-1)	90 (1)	1,5 (1)	0,05 (-1)	102,10	0,80
8	110 (-1)	90 (1)	1,5 (1)	0,15 (1)	110,00	0,60
9	210 (1)	30 (-1)	0,5 (-1)	0,05 (-1)	109,00	49,14
10	210 (1)	30 (-1)	0,5 (-1)	0,15 (1)	108,43	49,08
11	210 (1)	30 (-1)	1,5 (1)	0,05 (-1)	118,40	51,97
12	210 (1)	30 (-1)	1,5 (1)	0,15 (1)	104,00	52,01
13	210 (1)	90 (1)	0,5 (-1)	0,05 (-1)	130,00	37,87
14	210 (1)	90 (1)	0,5 (-1)	0,15 (1)	142,00	35,87
15	210 (1)	90 (1)	1,5 (1)	0,05 (-1)	149,00	42,55
16	210 (1)	90 (1)	1,5 (1)	0,15 (1)	155,40	40,66
17	60 (-2)	60 (0)	1,0 (0)	0,1 (0)	50,00	0,00
18	260 (2)	60 (0)	1,0 (0)	0,1 (0)	137,00	108,45
19	160 (0)	0 (-2)	1,0 (0)	0,1 (0)	13,50	110,91
20	160 (0)	120 (2)	1,0 (0)	0,1 (0)	117,00	38,35
21	160 (0)	60 (0)	0 (-2)	0,1 (0)	129,50	2,32
22	160 (0)	60 (0)	2,0 (2)	0,1 (0)	142,00	3,30
23	160 (0)	60 (0)	1,0 (0)	0 (-2)	127,50	3,82
24	160 (0)	60 (0)	1,0 (0)	0,2 (2)	132,00	3,26
25	160 (0)	60 (0)	1,0 (0)	0,1 (0)	134,00	3,92
26	160 (0)	60 (0)	1,0 (0)	0,1 (0)	135,00	3,38
27	160 (0)	60 (0)	1,0 (0)	0,1 (0)	135,50	3,46
28	160 (0)	60 (0)	1,0 (0)	0,1 (0)	134,00	3,41

^a (-2), (-1), (0), (1) e (2) são níveis codificados.

*X₁= lactose de soro de queijo, X₂= AMM, X₃= Tween 80, X₄= sulfato de manganês.

A partir dos dados experimentais para produção de ácido láctico apresentados na Tabela 29 foi feita a análise de regressão múltipla que gerou a equação de regressão (4.7), apresentada abaixo:

$$Y = 134,625 + 18,88X_1 + 17,28X_2 + 3,55X_3 + 0,81X_4 - 9,69X_1X_1 + 4,088X_1X_2 + 0,907X_1X_3 - 0,23X_1X_4 - 16,75X_2X_2 + 2,79X_2X_3 + 3,87X_2X_4 + 0,86X_3X_3 - 1,90X_3X_4 - 0,63X_4X_4 \quad (4.7)$$

Onde Y é a resposta predita, que é, a concentração de ácido láctico, e X_1 , X_2 , X_3 , X_4 são as variáveis codificadas para lactose de soro de queijo, AMM, Tween 80 e $MnSO_4$, respectivamente.

A Tabela 31 apresenta a distribuição t de *Student* e os correspondentes valores, juntamente com os parâmetros estimados. A identificação dos parâmetros significativos foi realizada através de testes de hipóteses utilizando a estatística t de *Student*. A probabilidade (P) foi utilizada como uma ferramenta para verificar a significância de cada um dos coeficientes. Foi estabelecida uma probabilidade máxima de erro no teste de 5%, desta forma, os parâmetros com valor de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Tabela 31

Coefficiente do modelo estimado pela regressão linear

Fator	Coefficiente	Erro padrão	t -valor	P-valor
Intercepto	134,6250	4,562855	29,50455	0,000000
X_1	18,8825	1,862778	10,13674	0,000000
X_2	17,2800	1,862778	9,27647	0,000000
X_3	3,5508	1,862778	1,90620	0,078972
X_4	0,8158	1,862778	0,43797	0,668600
X_1^2	-9,6950	1,862778	-5,20459	0,000170
X_1X_2	4,0887	2,281427	1,79219	0,096394
X_1X_3	0,9075	2,281427	0,39778	0,697249
X_1X_4	-0,2325	2,281427	-0,10191	0,920383
X_2^2	-16,7575	1,862778	-8,99597	0,000001
X_2X_3	2,7988	2,281427	1,22675	0,241670
X_2X_4	3,8763	2,281427	1,69905	0,113099
X_3^2	0,8675	1,862778	0,46570	0,649134
X_3X_4	-1,9050	2,281427	-0,83500	0,418797
X_4^2	-0,6325	1,862778	-0,33955	0,739621

$R^2 = 95,9\%$, $R^2(\text{ajustado}) = 91,6\%$

Os resultados mostram que as variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_1^2 e X_2^2) tiveram um efeito significativo (Tabela 31, observados através do P -valor), sendo que as variáveis X_1 , X_2

tiveram efeito positivo, ou seja, um aumento nas suas concentrações acarreta a um aumento da resposta (ácido láctico).

As variáveis X_3 , X_4 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 , X_3^2 , X_3X_4 , X_4^2 não foram estatisticamente significativas, não influenciando na produção de ácido láctico.

Desta forma, pode-se afirmar que as variáveis Tween 80 (X_3) e $MnSO_4$ (X_4), nas concentrações avaliadas e no tempo de fermentação de 48 horas, não influenciaram significativamente a produção de ácido láctico. Entretanto, Büyükkileci e Harsa, (2004) concluíram que o $MnSO_4$ foi essencial na fermentação de soro de queijo por *Lb. casei*, uma vez que o Mn^{2+} na forma de $MnSO_4$ é um íon necessário para *Lb. casei*. Fitzpatrick et al., (2001) e Krischke et al., (1991) mostraram que o efeito benéfico do íon Mn^{2+} na produção de ácido láctico por *Lb. casei* se deve ao seu papel como ativador da lactato desidrogenase. Todavia, Naveena et al., (2005) em seu estudo, utilizando a fermentação em estado sólido para *Lactobacillus amylophilus* GV6, relataram que o aumento da concentração do surfactante “Tween 80” no meio de cultura melhorou a produção de ácido láctico.

Assim, as variáveis que não foram significativas foram retiradas do sistema e foi construído um modelo ajustado incluindo apenas as variáveis codificadas significativas $p < 0,05$ expresso pela equação 4.8:

$$Y = 134,907 + 18,88X_1 + 17,28X_2 - 9,74X_1X_1 - 16,80X_2X_2 \quad (4.8)$$

O modelo quadrático da superfície de resposta foi realizado na forma de análise de variância (ANOVA) e os resultados estão demonstrados na Tabela 32. O teste de Fisher F-test foi usado para checar a significância estatística da Equação (4.8).

Tabela 32

Análise de variância do modelo polinomial de segunda ordem.

Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	$p > F$
Regressão	24575,50	4	6143,875	65,938	0,000
Residual	2143,06	23	93,176		
Falta de ajuste	2141,37	20			
Erro puro	1,69	3			
Total	26718,55	27			

$$R^2 = 0,92; R^2_{ajustado} = 0,90; R = 0,95$$

A ANOVA do modelo de regressão quadrático demonstrou que o modelo é altamente significativo, como é evidente pelo teste de Fisher, teste-F ($F_{\text{calc}}(4, 23) = 65,938 > F_t(4,23) = 2,8$) e tem um valor de probabilidade muito baixo ($p < 0,000$). 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 92,00% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo. O coeficiente de determinação ajustado ($R^2 = 0,9158$) também foi satisfatório para confirmar a significância do modelo.

A Figura 19 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero e a Figura 20, o gráfico de valores predito em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

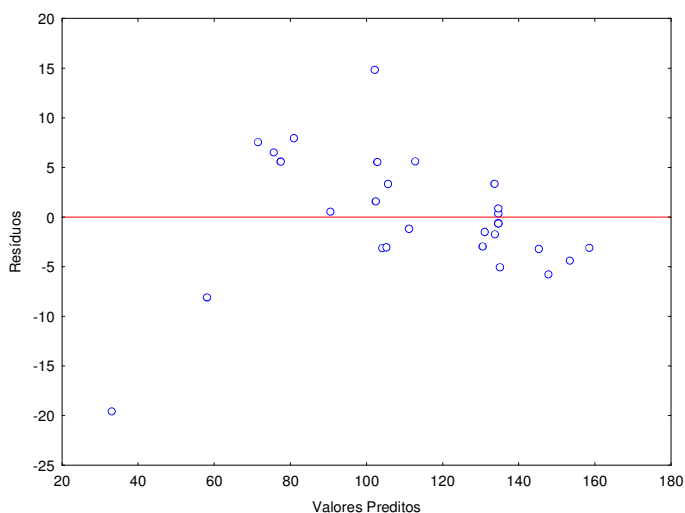


Figura 19 - Distribuição dos resíduos relativos à produção de ácido láctico

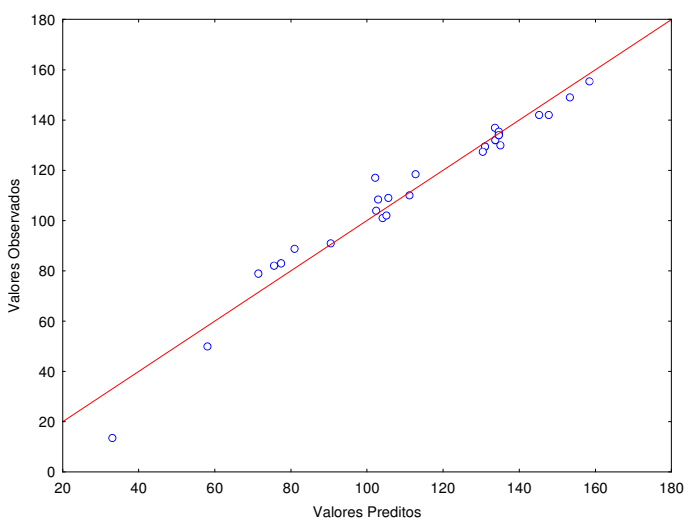


Figura 20 - Valores preditos em função dos observados relativos à produção de ácido láctico.

A partir da equação ajustada 4.8 foi construída a superfície de resposta para produção de ácido láctico como uma função das variáveis, concentração de lactose e concentração de AMM.

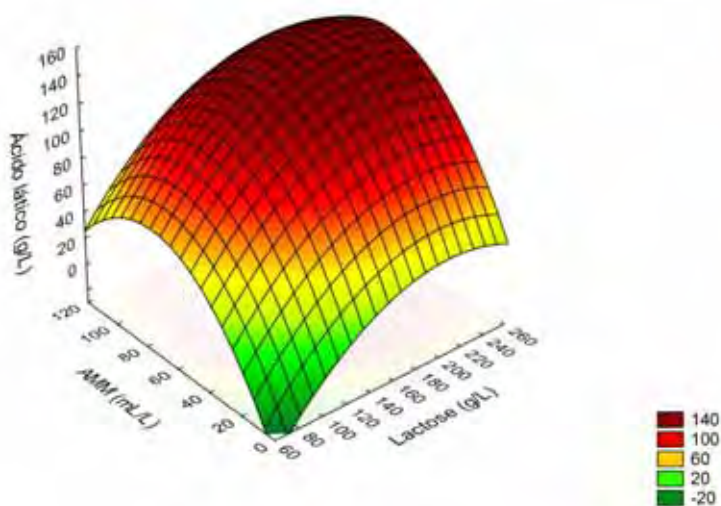


Figura 21 - Superfície de resposta para a produção de ácido láctico por *Lb. rhamnosus* mostrando a interação entre Lactose e AMM, mantendo constantes os níveis de Tween 80 (1 mL/L) e MnSO_4 (0,1 g/L).

Pela análise da Figura 21 é possível visualizar a forte influência da concentração de lactose de soro de queijo, assim como da AMM. A região ótima para a produção de ácido láctico variou entre 140 e 210 g/L de lactose e entre 60 e 80 g/L de AMM. Em concentrações superiores a esses valores ocorreu uma diminuição da produção de ácido láctico. Vários estudos mostraram que o crescimento celular e a produção de ácido láctico por bactérias do gênero *Lactobacillus* são inibidos pelo substrato (GONÇALVES et al., 1991; BURGOS-RUBIO et al., 2000).

A fonte de nitrogênio é um grande fator de influência sobre o crescimento de *Lactobacillus* (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Como a síntese do ácido láctico por processo fermentativo é associada ao crescimento celular, não há formação de produto se o meio não possuir uma concentração adequada de nitrogênio para promover este crescimento (PRITCHARD, 1993). Por outro lado, altas concentrações de nitrogênio podem levar à morte celular (DE LIMA et al., 2009).

Kim et al., (2006) investigaram a produção de ácido láctico a partir de soro de queijo e AMM, utilizando o *Lactobacillus* sp. RKY2, a máxima produção de ácido láctico (116 g/L) foi

obtida após 126 h de fermentação, a partir de 125 g/L de lactose de soro de queijo. Entretanto, mais de 10 g/L de lactose de soro de queijo permaneceu no caldo de fermentação sem ser usado, os autores afirmaram que isso é provavelmente devido à inibição de substrato e produto. Além disso, quando o meio foi suplementado com 100 g/L de lactose de soro de leite, o tempo de fermentação foi severamente prolongado. Entretanto, Büyükkileci e Harsa, (2004) ao avaliarem diferentes concentrações de lactose (48,7, 64, 79 e 102,9 g/L) na produtividade de ácido láctico por *Lactobacillus casei* observaram que não houve inibição pelo substrato, ou seja, em todas as concentrações de lactose, o *Lb. casei* pode utilizar completamente o açúcar. Já, Tuli et al., (1985) observaram que a produção de ácido láctico aumentou até 45 g/L de concentração de lactose inicial, sendo que a produção foi menor em concentrações de lactose maiores.

Foi realizado um estudo para identificar a natureza do ponto estacionário para verificar a ocorrência de um ponto de resposta de máxima ou mínima, ou ainda de um ponto de sela. Neste experimento foi encontrado um ponto de sela, desta forma, não foi possível o cálculo de um ponto ótimo. Entretanto, foi possível a otimização do meio de fermentação pela análise da Tabela 30. Pode-se dizer que, embora, a melhor produção de ácido láctico (155,4 g/L) tenha sido no experimento 16; 40,66 g/L de lactose não foi utilizada, desta forma, a melhor composição do meio de fermentação para produção de ácido láctico foi obtida no experimento 22, pois observou-se alta produção de ácido láctico (142 g/L) com baixo residual de lactose (3,2 g/L), o que poderá influenciar positivamente na redução dos custo de purificação do ácido láctico. Desta forma, a composição do meio otimizado é de 160 g/L de lactose, 60 mL/L de AMM, 2 mL/L de Tween 80 e 0,1 g/L de $MnSO_4$.

4.5.4 Otimização da produção de L-(+) ácido láctico usando água de manipueira.

4.5.4.1 Planejamento do tipo Plackett–Burman.

Na Tabela 33 encontra-se a matriz do planejamento experimental PBde 12 ensaios (valores reais e codificados) para avaliação do efeito de sete variáveis adicionadas a água de manipueira (X_1 = Citrato, X_2 = Acetato, X_3 = K_2HPO_4 , X_4 = $MgSO_4$, X_5 = $MnSO_4$, X_6 =Tween 80, X_7 = AMM), na produção de ácido láctico, consumo de ART e biomassa.

Tabela 33

Matriz do planejamento experimental do tipo PB(valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (ácido láctico, ART e biomassa)

Ensaio	Variáveis Independentes*							Respostas		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Ácido láctico	ART	Biomassa
								----- g/L -----		
1	2 (1) ^a	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	30 (1)	29,53	12,11	0,70
2	2 (1)	5 (1)	0 (-1)	0,2(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	19,68	21,65	0,15
3	0 (-1)	5 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,05(1)	0 (-1)	0 (-1)	16,21	20,85	0,12
4	2 (1)	0 (-1)	2 (1)	0,2(1)	0 (-1)	1 (1)	0 (-1)	22,79	17,57	0,39
5	2 (1)	5 (1)	0 (-1)	0,2(1)	0,05(1)	0 (-1)	30 (1)	34,05	10,62	0,62
6	2 (1)	5 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,05(1)	1 (1)	0 (-1)	19,07	19,16	0,28
7	0 (-1)	5 (1)	2 (1)	0,2(1)	0 (-1)	1 (1)	30 (1)	30,66	12,05	0,73
8	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0,2(1)	0,05(1)	0 (-1)	30 (1)	29,94	7,97	0,71
9	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2(1)	0,05(1)	1 (1)	0 (-1)	28,10	8,56	0,46
10	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,05(1)	1 (1)	30 (1)	39,54	6,75	0,73
11	0 (-1)	5 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (1)	30 (1)	34,38	9,30	0,76
12	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	16,58	27,37	0,12

^a (-1) e (1) são níveis codificados.

*X₁= Citrato, X₂=Acetato, X₃=K₂HPO₄, X₄=MgSO₄, X₅=MnSO₄, X₆=Tween 80, X₇=AMM

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 33, verifica-se que a produção de ácido láctico aumenta com o aumento da concentração de AMM e de Tween 80. Este fato pode ser melhor observado na Figura 22 (Gráfico de Pareto), onde os efeitos das variáveis estão representados.

Observa-se que a AMM foi a variável de maior influência na produção de ácido láctico, seguida da concentração de Tween 80 e K₂HPO₄. Apenas as variáveis AMM e Tween 80 tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95%, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumentaram do nível -1 para o +1, houve aumento na produção de ácido láctico. Portanto, para otimizar a produção de ácido láctico deve-se deslocar os níveis de estudo para valores superiores para a concentração de AMM e Tween 80.

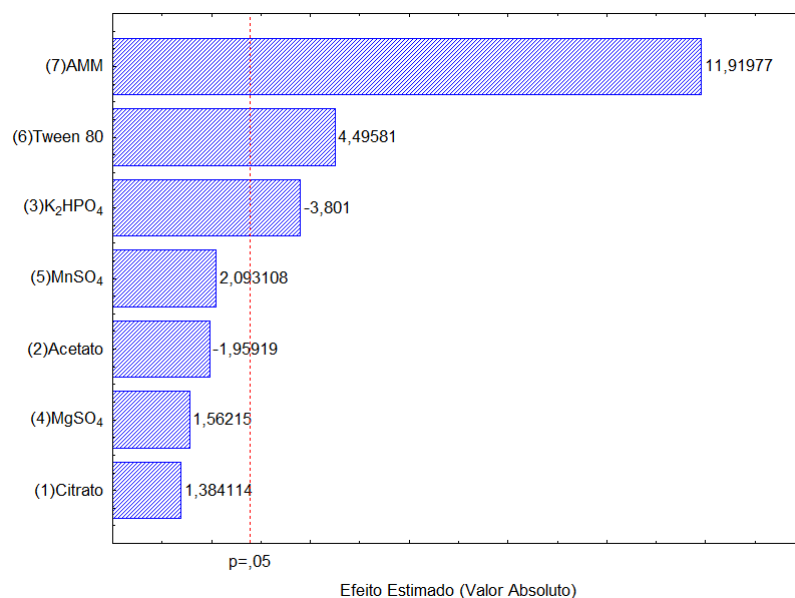


Figura 22 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a produção de ácido láctico.

Observa-se que a AMM foi a variável de maior influência na produção de ácido láctico, seguida do Tween 80 e do K₂HPO₄. Dessas variáveis, apenas a AMM e o Tween 80 tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95%, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumenta do nível -1 para o +1, ocorre um aumento na concentração de ácido láctico. Portanto, as variáveis utilizadas para a otimização da produção de ácido láctico foram a concentração de AMM e de Tween 80. Desta forma, as concentrações dessas variáveis foram aumentadas, sendo que a temperatura e a agitação foram fixadas nos valores de 37°C e 150 rpm respectivamente.

4.5.4.2 Planejamento do tipo composto central e metodologia da superfície de resposta.

A influência das variáveis, concentração de AMM (X₁) e de Tween 80 (X₂) na produção de L-(+) ácido láctico foi estudada segundo um planejamento fatorial composto central com quatro réplicas do ponto central, perfazendo um total de 12 experimentos. A matriz do planejamento, assim como as respostas (produção de ácido láctico, ART residual e ácido láctico) está apresentada na Tabela 34.

Tabela 34

Matriz do planejamento composto central e valores reais e codificados utilizados nos experimentos.

Ensaio	Variáveis independentes*		Respostas (g/L)		
	X ₁	X ₂	Ácido lático	ART residual	Biomassa
1	20 (-1) ^a	0,4 (-1)	33,42	10,08	0,66
2	20 (-1)	1,6 (1)	36,21	7,35	1,27
3	60 (1)	0,4 (-1)	36,41	11,17	1,03
4	60 (1)	1,6 (1)	41,82	9,21	1,31
5	11,8 (-1,41)	1 (0)	31,71	6,48	1,04
6	68,2 (1,41)	1 (0)	41,61	9,74	1,27
7	40 (0)	0,15 (1,41)	35,61	7,88	0,67
8	40 (0)	1,84 (1,41)	38,52	6,98	0,75
9	40 (0)	1 (0)	38,48	7,14	0,73
10	40 (0)	1 (0)	38,90	7,06	1,53
11	40 (0)	1(0)	38,79	7,27	0,62
12	40 (0)	1 (0)	38,60	7,48	0,82

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

*X₁= AMM, X₂= Tween 80.

A maior produção de ácido lático foi de 41,82 g/L, obtido a partir 60 mL/L de AMM e 1,6 mL/L de Tween 80 (Tabela 34).

A partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 34 foi feita a análise de regressão múltipla para produção de ácido lático, que gerou a equação de regressão (4.9), apresentada abaixo:

$$Y = 38,69 + 2,82X_1 + 1,54X_2 - 0,99X_1X_1 + 0,65X_1X_2 - 0,788X_2X_2 \quad (4.9)$$

Onde Y é a resposta predita, que é, a concentração de ácido lático, e X₁ e X₂ são as variáveis codificadas para AMM e Tween 80, respectivamente.

A Tabela 35 apresenta a distribuição *t* de *Student* e os correspondentes valores, juntamente com os parâmetros estimados. A identificação dos parâmetros significativos foi realizada através de testes de hipóteses utilizando a estatística *t* de *Student*. A probabilidade (*P*) foi utilizada como uma ferramenta para verificar a significância de cada um dos coeficientes. Foi estabelecida uma probabilidade máxima de erro no teste de 5%, desta forma, os parâmetros com valor de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Tabela 35

Coeficiente do modelo estimado pela regressão linear

Fator	Coeficiente	Erro padrão	<i>t</i> -valor	<i>P</i> -valor
Intercepto	38,69300	0,493698	78,37381	0,000000
X ₁	2,82559	0,349097	8,09399	0,000191
X ₂	1,53892	0,349097	4,40828	0,004528
X ₁ ²	-0,99063	0,390303	-2,53809	0,044194
X ₁ X ₂	0,65400	0,493698	1,32470	0,233489
X ₂ ²	-0,78813	0,390303	-2,01927	0,089992

Os resultados mostram que as variáveis independentes (X₁, X₂ e X₁²) tiveram um efeito significativo (Tabela 35 observados através do *P*-valor), sendo que as variáveis X₁, X₂ tiveram efeito positivo, ou seja, um aumento nas suas concentrações acarreta a um aumento da resposta (ácido láctico).

O modelo quadrático da superfície de resposta foi realizado na forma de análise de variância (ANOVA) e os resultados estão demonstrados na Tabela 36. O teste de Fisher, *F*-test, foi usado para checar a significância estatística da Equação (4.9).

Tabela 36

Análise de variância do modelo polinomial de segunda ordem.

Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	<i>p</i> > F
Regressão	93,1299	5	18,6259	19,1045	0,001266
Residual	5,8497	6	0,9749		
Falta de ajuste	5,74347	3			
Erro puro	0,10627	3			
Total	98,9796	11			

R² = 0,941; R² ajustado = 0,891; R = 0,969;

A ANOVA do modelo de regressão quadrático demonstrou que o modelo é altamente significativo, como é evidente pelo teste de Fisher, teste-*F* (F_{calc} (5,6) = 19,1045 > Ft(5,6) = 4,387) e tem um valor de probabilidade muito baixo (*p* < 0,001266). O bom ajuste do modelo foi verificado pelo coeficiente de determinação (R²) e o coeficiente de correlação múltipla (R). Neste caso, o valor de R² (0,941) indica que 94,1% da variabilidade dos dados foram

explicados pela equação do modelo. O coeficiente de determinação ajustado ($R^2 = 0,891$) também foi satisfatório para confirmar a significância do modelo.

A Figura 23 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero e a Figura 24, o gráfico de valores predito em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

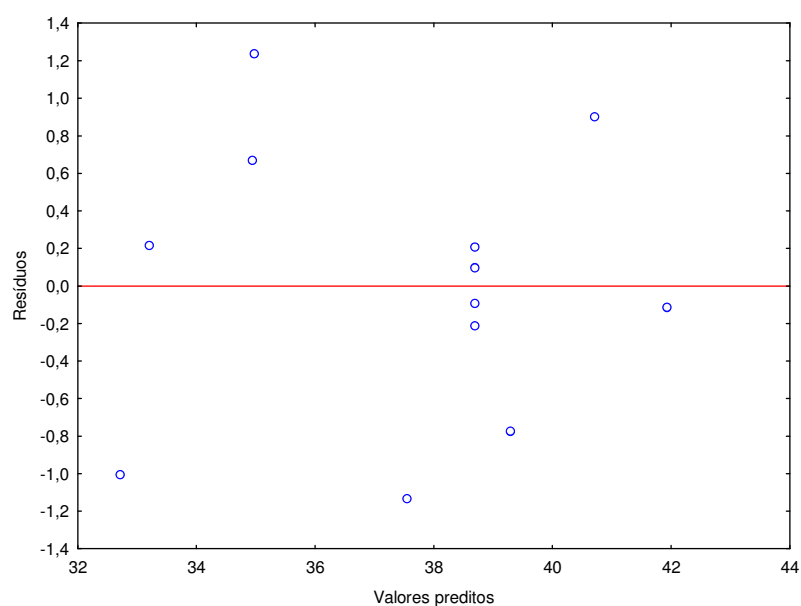


Figura 23 - Distribuição dos resíduos relativos à produção de ácido lático

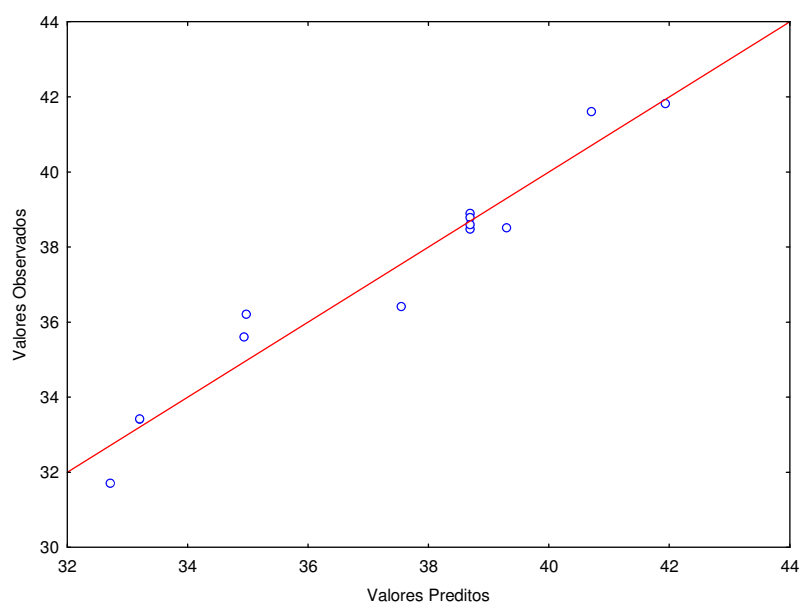


Figura 24 - Valores preditos em função dos observados relativos à produção de ácido lático.

Para visualizar melhor o efeito das variáveis e de suas interações, foi construída a superfície de resposta e a curva de contorno para produção de ácido láctico como uma função das variáveis, concentração de Tween 80 e concentração de AMM (Figura 25) a partir da Equação completa 4.9.

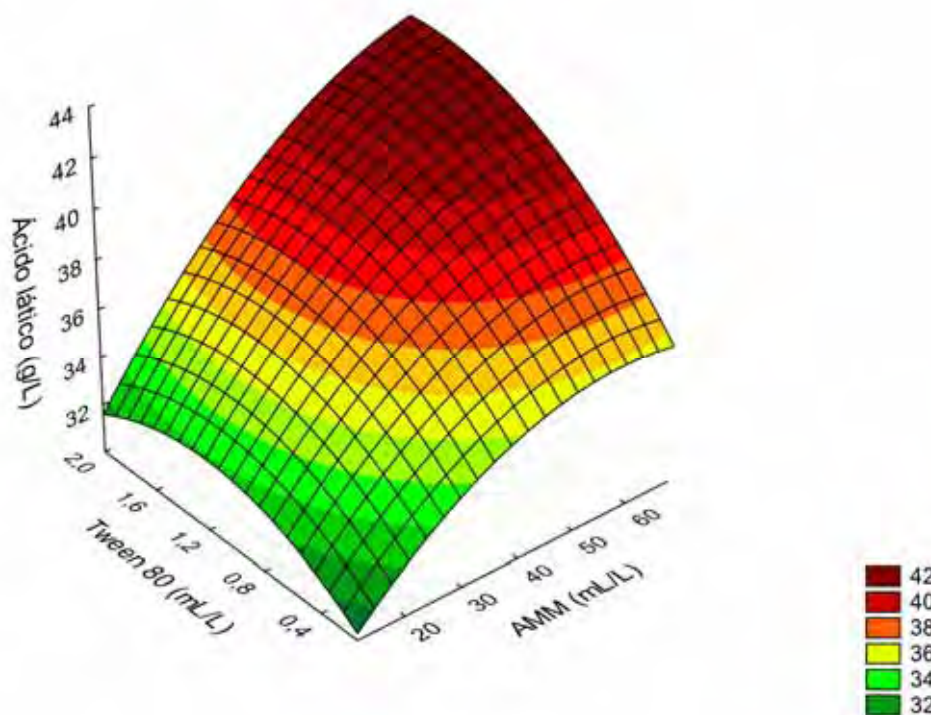


Figura 25 - Superfície de resposta para a produção de ácido láctico como uma função das variáveis: Tween 80 e AMM.

Pela análise da superfície de resposta (Figura 25), verifica-se que para se obter as maiores concentrações de ácido láctico, deve-se trabalhar com concentrações de AMM entre 60 e 70 mL/L e com concentrações de Tween 80 entre 1,2 e 2 mL/L.

O ponto de máxima produção de ácido láctico foi determinado através de uma análise canônica do modelo ajustado. De acordo com a metodologia descrita no Item 3.7

Foi realizado um estudo para identificar a natureza do ponto estacionário para verificar a ocorrência de um ponto de máxima ou mínima resposta, ou ainda de um ponto de sela. Isto foi feito calculando-se as raízes características da matriz B, que é a matriz dos coeficientes dos termos quadráticos e dos termos de interação do modelo ajustado. Portanto temos a Equação 4.10:

$$B = \begin{bmatrix} -0,99 & -0,32 \\ -0,32 & -0,79 \end{bmatrix} \quad (4.10)$$

Cujas raízes características são iguais a:

$$\lambda_1 = -1,229 \quad \lambda_2 = -0,548$$

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

O vetor dos coeficientes dos termos de 1ª ordem da Equação 4.9 é dado por:

$$b = \begin{bmatrix} 2,82 \\ 1,54 \end{bmatrix} \quad (4.11)$$

Com o vetor b e com a matriz B calculou-se o ponto estacionário x_0 através da Equação 4.3.

$$x_0 = \begin{bmatrix} 1,27 \\ 0,45 \end{bmatrix} \quad (4.12)$$

No qual 1,27 e 0,45 correspondem respectivamente aos valores das variáveis independentes X_1 e X_2 no ponto estacionário. Utilizando as equações de codificação (3.10) e (3.11) obtém-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da produção de ácido láctico.

A concentração ótima de AMM e de Tween 80 para produção de ácido láctico foi de 65,40 mL/L e de 1,27 mL/L respectivamente. A partir dos valores codificados das variáveis X_1 e X_2 no ponto de otimização, determinou-se que a concentração estimada de ácido láctico neste ponto é de 41,58 g/L. Este valor está próximo ao obtido nos Experimentos.

O alto rendimento da produção de ácido láctico a partir de manipueira pode ser atribuído ao grande valor nutricional encontrado no meio de produção. A água de manipueira é um produto nutritivo contendo açúcares naturais, proteínas, aminoácidos e vitaminas que são adequados para o crescimento das bactérias lácticas. Além disso, no meio de fermentação foi realizada hidrólise com posterior aquecimento do meio, o que pode ter favorecido a remoção de compostos inibitórios.

Embora a manipueira apresente compostos tóxicos (Linamarina e lotaustralina) que se hidrolisam em presença de ácidos e enzimas, produzindo cianeto livre, e conseqüentemente,

ácido cianídrico, sabe-se que com o aumento da temperatura, o ácido cianídrico é volatilizado, bem como, a cetona cianohidrina (composto tóxico) que se torna solúvel em água e possui um ponto de ebulição de 82°C (WESTBY, 2002).

O uso de água de manipueira para cultivo de *Lb. rhamnosus* é uma proposta inovadora, não tendo sido encontrada nenhuma referência sobre o assunto na literatura científica. Desta forma, pelos resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar que a utilização da água de manipueira para a produção de ácido láctico a partir da fermentação por *Lb. rhamnosus* B103 é viável, uma vez que ocorreu produção considerável de biomassa e de ácido láctico, sendo necessária a complementação apenas de uma fonte de nitrogênio barata (AMM) e de Tween 80.

4.6 Fermentações com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) produtor de D-(-) ácido láctico.

4.6.1 Fermentações com diferentes fontes de carbono

Os resultados da produção e da produtividade de D-(-) ácido láctico pelas três fontes de carbono, soro de queijo, caldo de cana de açúcar e melaço estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37

Efeito de diferentes fontes de carbono na produção e na produtividade de D-(-) ácido láctico após 48 horas de fermentação, com concentração inicial de ART de 120 g/L.

Fonte de carbono	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)
Soro de queijo	41,16	0,85
Melaço	38,40	0,80
Caldo de cana	43,80	0,91

De acordo com a Tabela 37 observa-se que a produção, assim como a produtividade de ácido láctico pelo *Leuconostoc mesenteroides* B512 foi maior em caldo de cana de açúcar.

O caldo de cana de açúcar contém de 13% a 16% de sacarose. Apresenta a vantagem de ser uma fonte de carbono renovável, abundante e barata, já o melaço é um bioproduto da

produção de açúcar, quando usado em fermentações causa sérios problemas no processo de purificação e no tratamento do resíduo final (TIMBUNTAM et al., 2006).

4.6.2 Fermentação com diferentes fontes de nitrogênio

O meio de fermentação foi composto por caldo de cana-de-açúcar (120 g/L de ART) e pelos sais do meio MRS. Foram avaliadas cinco fontes de nitrogênio: autolisado de levedura, extrato de levedura, AMM, sulfato de amônio e pro-floo (proteína da semente de algodão) da empresa americana Traders Protein®. Os resultados da influência dessas cinco fontes de nitrogênio na produção e na produtividade de D-(-) ácido láctico pelo *Leuconostoc mesenteroides* B512 estão apresentados na Tabela 38

Tabela 38

Efeito da suplementação do caldo de cana de açúcar com diferentes fontes de nitrogênio na produção e na produtividade de ácido láctico.

Fonte de nitrogênio ^a	Produção ^b (g/L)	Produtividade ^c (g/Lh)
Extrato de levedura 30,00 g/L	59,20	2,30
Autolisado de levedura 25,56 g/L	44,48	1,61
AMM 73,50 mL/L	36,00	1,25
Pró-floo 30,94 g/L	26,40	1,31
(NH ₄) ₂ SO ₄ 13,88 g/L	20,92	0,69

^a A quantidade de cada fonte de nitrogênio foi determinada de acordo com a concentração de nitrogênio contida em 30,00 g/L de extrato de levedura, ou seja 2,94 g/L de nitrogênio.

^b Produção de ácido láctico após 48 horas de fermentação.

^c Produtividade de ácido láctico após 24 horas de fermentação.

De acordo com a Tabela 38 observa-se que a produção, assim como a produtividade de ácido láctico pelo *Leuconostoc mesenteroides* B512 foi maior em caldo de cana de açúcar suplementado com extrato de levedura e em caldo de cana suplementado com autolisado de levedura, produzindo 59,20 g/L e 44,48 g/L de ácido láctico respectivamente. Timbuntam et al., (2006) observaram que uma nova estirpe de *Lactobacillus* sp. FCP2 pode utilizar caldo de cana de açúcar como um substrato e que a adição de fontes de nitrogênio de baixo custo (Larvas de bicho da seda, autolisado de levedura e resíduo de camarão) aumentaram a produção de ácido láctico.

4.6.3 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. Os resultados estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39

Matriz do planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (valores reais e codificados) com sua respectiva resposta (ácido láctico)

Ensaio	Variáveis Independentes ^a								Resposta
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Ácido láctico -----g/L-----
1	150 (1) ^b	0 (-1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	40 (1)	48,00
2	150 (1)	10 (1)	0 (-1)	0,4(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	40 (1)	45,20
3	50 (-1)	10 (1)	4 (1)	0 (-1)	0,2(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	12,00
4	150 (1)	0 (-1)	4 (1)	0,4(1)	0 (-1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	8,00
5	150 (1)	10 (1)	0 (-1)	0,4(1)	0,2(1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	10,20
6	150 (1)	10 (1)	4 (1)	0 (-1)	0,2(1)	4 (1)	0 (-1)	40 (1)	17,50
7	50 (-1)	10 (1)	4 (1)	0,4(1)	0 (-1)	4 (1)	2 (1)	0 (-1)	2,10
8	50 (-1)	0 (-1)	4 (1)	0,4(1)	0,2(1)	0 (-1)	2 (1)	40 (1)	27,00
9	50 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,4(1)	0,2(1)	4 (1)	0 (-1)	40 (1)	16,00
10	150 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2(1)	4 (1)	2 (1)	0 (-1)	1,15
11	50 (-1)	10 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	4 (1)	2 (1)	40 (1)	24,00
12	50 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	26,00

^aX₁= ART de Cana de açúcar, X₂=Acetato, X₃=Citrato, X₄=MgSO₄, X₅=MnSO₄, X₆=K₂HPO₄, X₇=Tween80, X₈=Autolisado de levedura

^b (-1), (1) são níveis codificados.

Observa-se que o autolisado de levedura foi a variável de maior influência na produção de ácido láctico, seguida da concentração de fosfato de potássio, MnSO₄ e caldo de cana de açúcar. Este fato pode ser observado na Figura 26 (Gráfico de Pareto).

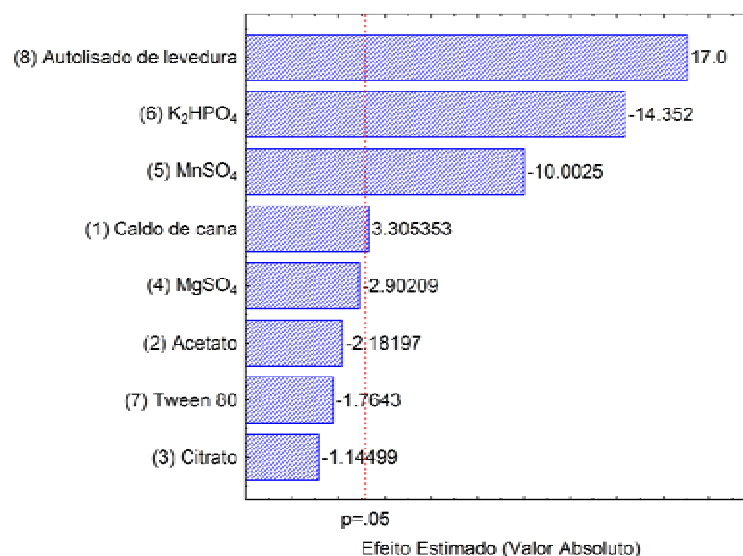


Figura 26 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a produção de ácido láctico.

Dessas variáveis, apenas o autolisado de levedura e a concentração de ART do caldo de cana tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95%, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumenta do nível -1 para o +1, ocorre um aumento na concentração de ácido láctico. Portanto, as variáveis utilizadas para a otimização da produção de ácido láctico foram o caldo de cana de açúcar e o autolisado de levedura. Desta forma, as concentrações dessas variáveis foram aumentadas, sendo que a temperatura e a agitação foram fixadas nos valores de 30°C e 150 rpm respectivamente.

4.6.4 Otimização da produção de D-(-) ácido láctico por planejamento composto central

A influência das variáveis, concentração de caldo de cana de açúcar (X_1) e de autolisado de levedura (X_2) na produção de D-(-) ácido láctico foi estudada segundo um planejamento fatorial composto central com quatro réplicas do ponto central, perfazendo um total de 12 experimentos. A matriz do planejamento, assim como a resposta (produção de ácido láctico) está apresentada na Tabela 40.

Tabela 40

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

Experimentos	Caldo de cana	AL ^a	Ácido láctico (g/L)
1	50 (-1) ^b	15 (-1)	16,00
2	50 (-1)	45 (1)	28,56
3	150 (1)	15 (-1)	6,40
4	150 (1)	45 (1)	58,80
5	29,5 (-1,41)	30 (0)	6,80
6	170,5 (1,41)	30 (0)	18,40
7	100 (0)	8,85 (-1,41)	4,72
8	100 (0)	51,15 (1,41)	59,40
9	100 (0)	30 (0)	56,80
10	100 (0)	30 (0)	56,50
11	100 (0)	30 (0)	57,12
12	100 (0)	30 (0)	57,00

^aAL= autolisado de levedura

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

Observa-se na Tabela 40 que a maior produção de ácido láctico foi de 59,40 g/L, obtido a partir de 100 g/L de ART de caldo de cana de açúcar e 51,15 g/L de autolisado de levedura.

A partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 40 foi feita a análise de regressão múltipla que gerou a equação de regressão (4.13), apresentada abaixo:

$$Y = 56,85 + 4,63X_1 + 17,78X_2 - 20,85X_1X_1 + 9,96X_1X_2 - 11,12X_2X_2 \quad (4.13)$$

Onde Y é a resposta predita, que é a concentração de ácido láctico, e X₁ e X₂ são as variáveis codificadas para caldo de cana e autolisado de levedura, respectivamente.

O teste de Fisher foi usado para checar a significância estatística da Equação (4.13). A Tabela 41 apresenta a distribuição *t* de *Student* e os correspondentes valores, juntamente com os parâmetros estimados. A identificação dos parâmetros significativos foi realizada através de testes de hipóteses utilizando a estatística *t* de *Student*. A probabilidade (*P*) foi utilizada como uma ferramenta para verificar a significância de cada um dos coeficientes. Foi estabelecida uma probabilidade máxima de erro no teste de 5%, desta forma, os parâmetros com valor de *p* < 0,05 foram considerados como significativos.

Tabela 41

Coeficiente do modelo estimado pela regressão linear

Fator	Coeficiente	Erro padrão	<i>t</i> -valor	<i>P</i> -valor
Intercepto	56,855	1,75	32,42	0,000
X ₁	4,63	1,24	3,73	0,0096
X ₂	17,786	1,24	14,34	0,000007
X ₁ X ₂	9,96	1,753	5,678	0,001284
X ₁ ²	-20,85	1,386	-15,038	0,000005
X ₂ ²	-11,12	1,386	-8,02	0,000201

Os resultados mostram que todas as variáveis independentes tiveram efeito significativo (Tabela 41, observados através do *P*-valor), sendo que as variáveis (X₁, X₂ e X₁X₂) tiveram efeito positivo, ou seja, um aumento nas suas concentrações acarreta um aumento da resposta (ácido lático).

O modelo quadrático da superfície de resposta foi realizado na forma de análise de variância (ANOVA) e os resultados estão demonstrados na Tabela 42.

Tabela 42

Análise de variância do modelo polinomial de segunda ordem.

Fonte	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	<i>p</i> > F
Regressão	6203,364	5	1240,673	100,8525	0,000011
Residual	73,811	6	12,302		
Falta de ajuste	73,591	3	24,530	334,05	
Erro puro	0,20	3	0,073		
Total	6277,176				

R² = 0,988; Ajustado R² = 0,978; R = 0,994;

A ANOVA do modelo de regressão quadrático demonstrou que o modelo é altamente significativo, como é evidente pelo teste de Fisher, teste-F (F_{calc} (5,6) = 100,8525 > Ft(5,6) = 4,39) e tem um valor de probabilidade muito baixo (*p* < 0,000011). O bom ajuste do modelo foi verificado pelo coeficiente de determinação (R²) e coeficiente de correlação múltipla (R). Neste caso, o valor de R² (0,988) indica que 98,80% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo. O coeficiente de determinação ajustado (R² = 0,978) também foi satisfatória para confirmar a significância do modelo.

A Figura 27 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero e a Figura 28, o gráfico de valores predito em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

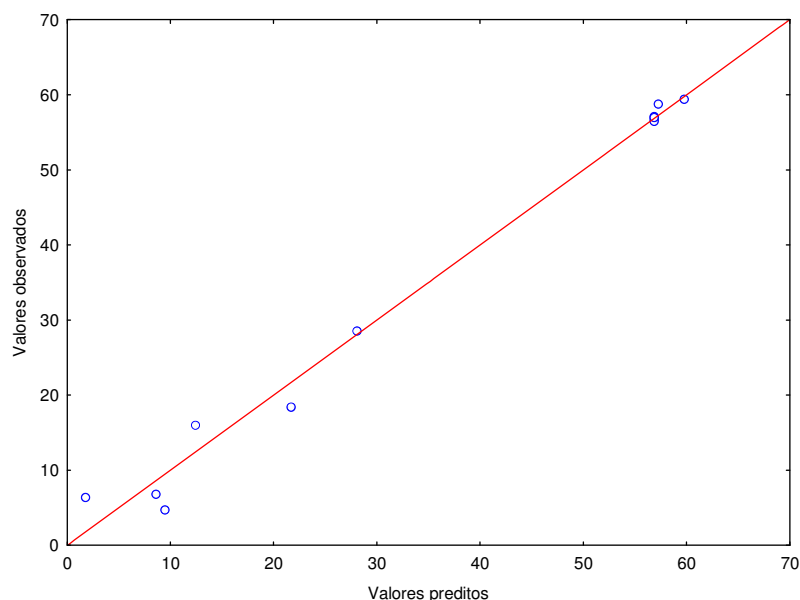


Figura 27 - Distribuição dos resíduos relativos à produção de ácido láctico

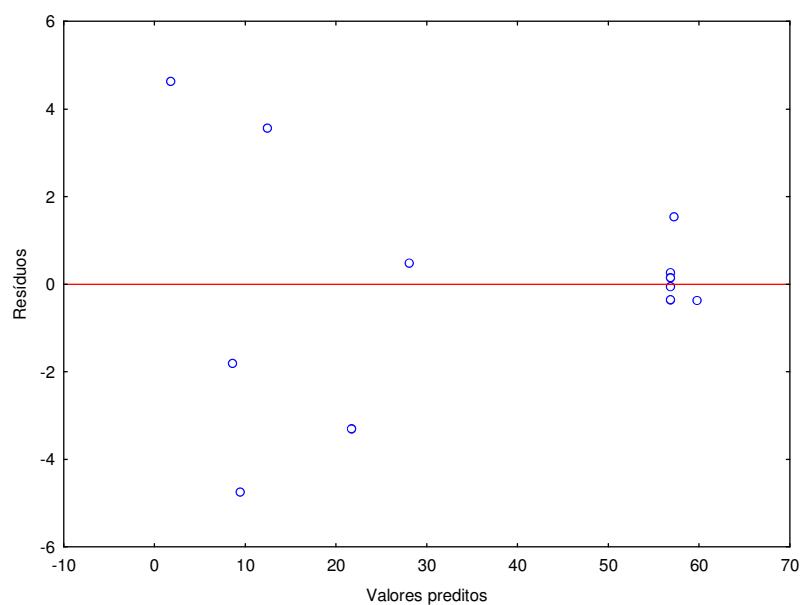


Figura 28 - Valores preditos em função dos observados relativos à produção de ácido láctico

A partir da equação completa 4.13, foi construída a superfície de resposta para produção de ácido láctico como uma função das variáveis, concentração de ART do caldo de cana e concentração de autolisado de levedura (Figura 29).

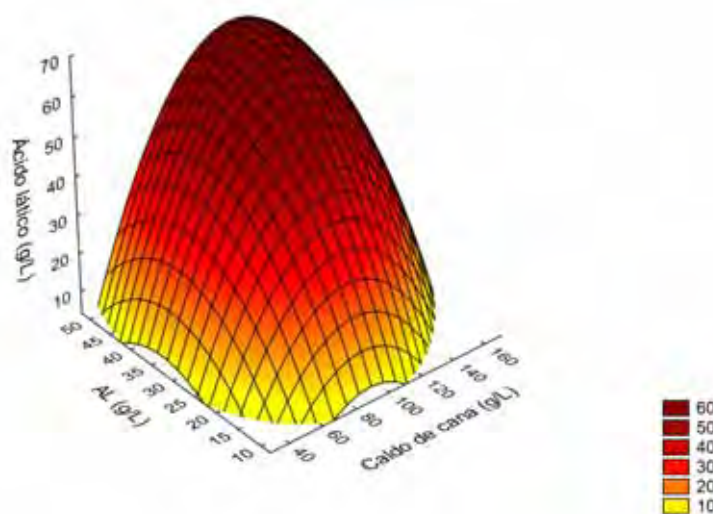


Figura 29 - Superfícies de resposta para a produção de ácido láctico como uma função das variáveis: concentração de caldo de cana e autolisado de levedura (AL).

Pela análise da Figura 29 é possível visualizar a forte influência do caldo de cana, assim como do autolisado de levedura. A região ótima para a produção de ácido láctico variou entre 100 e 130 g/L de ART de caldo de cana e entre 35 e 45 g/L de autolisado de levedura. Em concentrações inferiores ou superiores a esses valores ocorre uma diminuição da produção de ácido láctico. Vários estudos mostraram que o crescimento celular e a produção de ácido láctico por bactérias do gênero *Lactobacillus* são inibidos pelo substrato (GONÇALVES et al., 1991; BURGOS-RUBIO et al., 2000). Sule et al., (2004) observaram que a máxima produção de ácido láctico foi de 21 g/L utilizando 50 g/L de sacarose, sendo que o uso de 100 g/L de sacarose resultou em uma diminuição da produção de ácido láctico. Os autores atribuem este fato ao aumento da viscosidade do meio pela grande concentração de sacarose utilizada.

O ponto de máxima produção de ácido láctico foi determinado através de uma análise canônica do modelo ajustado. Foi realizado um estudo para identificar a natureza do ponto estacionário para verificar a ocorrência de um ponto de máxima ou mínima resposta, ou ainda de um ponto de sela. Isto foi feito calculando-se as raízes características da matriz B, que é a matriz dos coeficientes dos termos quadráticos e dos termos de interação do modelo ajustado. Portanto temos a Equação 4.14:

$$B = \begin{bmatrix} -20,85 & 4,98 \\ 4,98 & -11,12 \end{bmatrix} \quad (4.14)$$

Cujas raízes características são iguais a:

$$\lambda_1 = -22,947$$

$$\lambda_2 = -9,023$$

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

O vetor dos coeficientes dos termos de 1ª ordem da Equação 4.13 é dado por:

$$b = \begin{bmatrix} 4,63 \\ 17,78 \end{bmatrix} \quad (4.15)$$

Com o vetor b e com a matriz B calculou-se o ponto estacionário x_0 através da Equação 4.3.

$$x_0 = \begin{bmatrix} 0,34 \\ 0,95 \end{bmatrix} \quad (4.16)$$

No qual 0,338 e 0,951 correspondem respectivamente aos valores das variáveis independentes X_1 e X_2 no ponto estacionário. Utilizando as equações de codificação (3.8) e (3.9) obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da produção de ácido láctico.

A concentração ótima de caldo de cana de açúcar encontrada foi de 116,90 g/L e de autolisado de levedura foi de 44,25 g/L. A partir dos valores codificados das variáveis X_1 e X_2 no ponto de otimização, determinou-se que a concentração estimada de ácido láctico neste ponto é de 66,11 g/L. Para confirmar se o modelo estava adequado para prever a máxima produção de ácido láctico, três experimentos adicionais foram conduzidos com a composição do meio considerada ótima. A média dos valores de produção de ácido láctico foi de 60,20 g/L, que esta de acordo com o valor predito 66,11 g/L. Então, foi provado que este modelo é adequado.

Calabia e Tokiwa, (2007) utilizando meio de cultivo (MRS) contendo 20 g/L de extrato de levedura e 120 g/L de cana de açúcar, produziram 107 g/L de ácido láctico. Esta alta produção, segundo os autores, é atribuída ao alto valor nutritivo encontrado na cana de açúcar,

pois é um produto nutritivo, contendo açúcares naturais, proteínas, aminoácidos e vitaminas que são fundamentais para o crescimento das bactérias lácticas.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os micro-organismos selecionados apresentaram grande potencial para serem utilizados nos diversos ramos da indústria, principalmente, os isolados de iogurte e Keffir, assim como, o *Lactobacillus rhamnosus* B103, produtor de L-(+) ácido láctico, o *Leuconostoc mesenteroides* B512, produtor de D-(-) ácido láctico e o *Lactobacillus plantarum* LMISM6, que embora seja produtor de ácido láctico racêmico, apresentou alto rendimento.

O uso de manipueira no cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* B103 foi possível, além de ser uma proposta inovadora, uma vez que não foi encontrada nenhuma referência na literatura científica sobre o uso deste substrato para produção de ácido láctico. A concentração ótima de AMM e de Tween 80 que deve ser adicionada a manipueira, para produção de L-(+) ácido láctico, por *Lactobacillus rhamnosus* B103 foi de 65,4 mL/L e de 1,27 mL/L respectivamente, em temperatura de 37°C, sob agitação de 200 rpm. Nestas condições obteve-se 41,58 g/L de L-(+) ácido láctico após 48 horas de fermentação.

De todos os substratos e resíduos avaliados, o soro de queijo e a AMM foram os melhores para a produção de L-(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* B103, sendo que a composição do meio otimizado foi de 160 g/L de lactose, 60 g/L de AMM, 2 mL/L de Tween 80 e 0,1 g/L de MnSO_4 , em temperatura de 37°C e agitação de 150 rpm, pois nessas condições obteve-se alta produção de L-(+) ácido láctico (142 g/L) e baixo residual de lactose (3,2 g/L), o que poderá influenciar positivamente na redução dos custos de purificação do ácido láctico.

O meio de fermentação otimizado para produção de D-(-) ácido láctico a partir de *Leuconostoc mesenteroides* B512 constitui de 116,90 g/L de caldo de cana e 44,25 g/L de autolisado de levedura, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, nestas condições, este micro-organismo produziu 60,20 g/L de D-(-) ácido láctico e todo o açúcar foi consumido após 48 horas de fermentação.

Nas otimizações com *Lactobacillus plantarum* LMISM6, observou-se uma produção de 63,40 g/L de ácido láctico, 0,41 g/L de ART residual e alta conversão de substrato (99,41%), quando se utilizou 70 g/L de ART de melaço, 30 mL/L de AMM, 2 g/L de K_2HPO_4

e 1 mL/L de Tween 80. O foco deste trabalho estava em obter alta produção, com o menor residual possível de ART, para desta forma, reduzir os custos de purificação. Entretanto, estudos futuros que levem em consideração uma alta produtividade, além de uma maior produção, por meio de um sistema em batelada alimentada, com o objetivo de evitar inibição pelo substrato, são necessários para melhorar o processo de fermentação.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Utilização de fermentação em batelada alimentada, utilizando o *Lactobacillus rhamnosus* B103, com o objetivo de aumentar a produção, a produtividade e o rendimento do processo.

Obtenção de micro-organismos mais resistentes a altas concentrações de açúcares e de ácido, para melhorar a produção, produtividade e rendimento da fermentação e ao mesmo tempo diminuir os custos do processo, pela diminuição dos gastos com o NaOH.

Melhorar o rendimento, a produção e a produtividade de D-(-) ácido lático por meio da otimização dos parâmetros de fermentação, utilizando o isolado Y15c ou Y15a.

Avaliar diferentes métodos de extração e purificação do ácido lático, com o objetivo de se obter um produto de qualidade com o menor custo possível.

Produzir o PLA a partir do ácido lático produzido e purificado e avaliar a qualidade do polímero, assim como, o potencial de biodegradação desse polímero no meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, B.; CHIPMAN, H.; VIJAYAN, K. Some risks in the construction and analysis of supersaturated designs. **Technometrics**, v.41, n.2, p.135-141, 1999.

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

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.

ALTAF, M.; NAVEENA, B.J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E.V.; REDDY, G. Single step fermentation of starch to L-(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptona and yeast extract – optimization by RSM. **Process Biochemistry**, v. 41, p.465-472, 2006.

ALVES FILHO, M. A nata do soro. Jornal da Unicamp, Campinas, Brasil, 14-20, out.2002.

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

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

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

ANTONY, J.; KATE, M.; FRANGO, A. A strategic methodology to the use of advanced statistical quality improvement techniques. **The TQM magazine**, v.10, n.3, p.169-176, 1998.

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

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

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

AXELSSON, L. (2004). 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.

BELHOCINE, D. (1987) Investigations on lactose valorization by lactic acid fermentation. PhD dissertation, University of Rennes I, France.

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.

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

BURGOS-RUBIO, C.N.; OKOS, M.R.; WANKAT, P.C. Kinetic study of conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v.16, p. 305–314, 2000.

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.

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

BUYUKKILECI, A.O.; HARSA, S. Batch production of L-(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.1036-1040, 2004.

CALABIA, B.P.; TOKIWA, Y. Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnology Letters**, v.29, p.1329–1332, 2007.

CALLON C, MILLET L, MONTEL MC. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. **Journal of Dairy Research**, v.71 p. 231–244, 2004.

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

CHO, G.S; DO, H.K. Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from a traditional Jeotgal product in Korea. **Ocean Science Journal**, v. 41, n.2, p. 113-119, 2006.

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

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. (1957). Experimental designs. 2.ed. London, John Wiley.

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

COSTA, V.M.; BASSO, T.O.; ANGELONI, L.H.P.; OETTERER, M.; BASSO, L.C. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido lático por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 503-509, 2008.

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

COX, G.C.; MACBEAN, R.D. Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltration. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.32, p.19-22, 1977.

COX, R.P., THOMSEN, J.K. Computer-aided identification of lactic acid bacteria using the API 50 CHL system. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, p 257–259, 1990

CURRY, B.; CROW, V. (2003). *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.

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

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

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

DE LIMA, C.J.B; COELHO, L.F.; BLANCO, K.C.; CONTIERO, J. Response surface optimization of D-(-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative 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 and Biochemical Technology**, v.2, p.64-69, 2010.

DE OLIVEIRA, A.R.; BUZATO, J.B.; HAULY, M.C.O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 53-60, 2005.

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

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

DUNN, G. M. Nutritional requirements of microorganisms. In: Comprehensive Biotechnology, (Moo-Young, M., ed.). Pergamon Press Ltd., London, 1985, 113.

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

EL-SABAENY, A. H. Influence of medium composition on lactic acid production from dried whey by *Lactobacillus delbrueckii*. **Microbiologia**, v.12, p.411–416, 1996.

ERTEN H. Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. **Process Biochemistry**, v.33, p.735–739, 1998.

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.

FAO (2005) Food agricultural organization—statistical—database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Disponível em: <http://www.fao.org>.

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

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

FU, W.; MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**, v.3, p. 163-170, 1999.

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

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

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

GOFFIN, P.; DEGHOAIN, M.; MAINARDI, J.L.; TYTGAT, I.; CHAMPOMIER-VERGE'S, M.C.; KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P. Lactate racemization as a rescue pathway

for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 19, p. 6750-6761, 2005.

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

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

GOLLWITZER, H.; THOMAS, P.; DIEHL, P.; STEINHAUSER, E.; SUMMER, B.; BARNSTORF, S. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly (D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants. **Journal of Orthopaedic Research**, v.23, p.802–809, 2005.

GONÇALVES, L.D.M.; XAVIER, A.M.R.B.; ALMEIDA, J.S.; CARRONDO, M.J.T. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.316 – 319, 1991.

GONZALEZ-SISO, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1–17, 1996.

GOPAL, A.R.; KAMMEN, D.M. Molasses for ethanol: the economic and environmental impacts of a new pathway for the lifecycle greenhouse gas analysis of sugarcane ethanol. **Environmental Research Letters**, v. 4, p. 1-5, 2009.

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

HAMMES, W.P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows, A.; Truper, H.G.; Dworkin, M. et al (eds). *The prokaryotes*. 2.ed., Springer-Verlag, New York, 1992, v.2, p.1535-1594.

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

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

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edn. William and Wilkins, MD, pp 527-564.

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

HONORATO, T.L.; RABELO, M.C.; PINTO, G.A.S.; RODRIGUES, S. Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p.254-258, 2007.

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

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

HUOK, OH; WEE, W.J.; YUN, J.S.; HAN, S.H.; JUNG, S.; RYU, H.W. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. **Bioresource Technology**, v.96, p.1492-1498, 2005.

JÄRVINEN, M.; MYLLYKOSKI, L.; KEISKI, R.; SOHLO, J. Separation of lactic acid from fermented broth by reactive extraction, **Bioseparation**, v.9, p.163–166, 2000

JELLEN, P. (2003). Whey processing. In H. Roginski, J. W. Fuquay, eP. F. Fox (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences*, v.4, p. 2739–2751. London: Academic Press.

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

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

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

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

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

KASCAK, J.S.; J. KOMINEK; M. ROEHR (1996). Lactic acid. In: Biotechnology, Vol. 6, Rehm, H.J.; G. Reed; A. Puhler; P. Stadler, Eds, p. 293–306 Weinheim: VCH Press.

KIM, H.O; WEE, Y.J; KIM, J.N; YUN, J.S. RYU, H.W. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp., RKY2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 694-704, 2006

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

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

KRISCHKE, W.; SCHRODER, M.; TROSCH, W. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. casei. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.573–578, 1991.

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

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

LICK S. Typing systems for lactobacilli. **Milchwissenschaft**, v.58, p. 256 – 260, 2003.

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

LIGGETT, R.W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology, **Bacteriological Reviews**, v.12, p.297–311, 1948.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia: tecnologia das fermentações. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v.1

LIMSOWTIN, G. K. Y., BROOME, M. C., POWELL, I. B. (2003). 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.

LIU, S.Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 115–131, 2003.

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

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENT, J.M. Manual de Indústrias de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

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.

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

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

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Y.; QUIROZ-CAMACHO, M.H.; LEDEZMA-PÉREZ, A. S.; JARAMILLO-CORONADO, J.C. Producción de ácido láctico a partir de melaza pretratada utilizando *Lactobacillus delbrueckii*. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 209-214, 1988.

MARWAHA, S.S; KENNEDY, J.F. Review: Whey pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science and Technology**, v.23, p.323–336, 1988.

MAWSON, A.J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v. 47, n.3, p. 195-203, 1994.

MCCASKEY, T.A.; ZHOU, S.D.; BRITT, S.N.; STRICKLAND, R. Bioconversion of municipal solid waste to lactic acid by *Lactobacillus* species. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.45-46, p. 555–568, 1994.

MCGHIE, T.K. Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.634, p.107-112, 1993.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

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

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

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

MONTEAGUDO, J.M.; RODRIGUEZ, L.; RINCON, J.; FUERTES, J. Optimization of the conditions of the fermentation of beet molasses to lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii*. **Acta Biotechnologica**, v.14, p.251–260, 1994.

MONTGOMERY, D.C. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Trad. por Jaime Delgado Saldivar. Mexico, Iberoamérica.

MOUSTAFA, H.H., COLLINS, E.B. Role of galactose or glucose-1-phosphate in preventing the lysis of *Streptococcus diacetilactis*. **Journal of Bacteriology**, v.95, p.592–602, 1968.

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

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

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

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

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

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

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

OLIVEIRA, A.R.; BUZATO, J.B.; HAULY, M.C.O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 53-60, 2005.

OLIVEIRA, L.C. (1999). Uso integrado do método QFD e de técnicas estatísticas de planejamento e análise de experimentos na etapa do projeto do produto e do processo. Belo Horizonte, 270p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

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.

PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; KNILL, C.J.; KOSSEVA, M. Production of L-(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p. 219-226, 2010.

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

PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part II. Concentration of phenolics in sugar cane and colour of first expressed juice. *Int. Sugar J.* 1992, 94, 157-160.

PAULI, T.; FITZPATRICK, J.J. Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. **Process Biochemistry**, v.38, p.1–6, 2002.

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

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

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

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

ROJAN, P.J.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. L-(+)-Lactic acid recovery from cassava bagasse based fermented medium using anion exchange resins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n.6, Curitiba, 2008.

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

ROUKAS T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, v.33, p.805–810, 1998.

ROY, D.; GOULET, J.; LE DUY, A. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 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.

SAMUEL, W.A.; LEE, Y.Y.; ANTHONY, W.B. Lactic acid fermentation of crude sorghum extract. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p.757–778, 1980.

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

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

SCHLEIFER, K. H., W. LUDWIG. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic and Applied Microbiology**, v.18 p.461–467, 1995.

SELMER-OLSEN, E.; SORHAUG, T. Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. **Milchwissenschaft**, v.53, p.367–370, 1998.

SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **Journal of Biotechnology**, v.73, p.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.

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresourse Technology**, v.57, p.1-11, 1996.

SNEATH, P.H.A.; J.G. HOLT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. Vol. 1, p. 64. A Waverly Company, Williams eWilkins, Springer-Verlag, NY, USA, 2001.

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

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

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

SULE, B.; ELIBOL, M.; OZER, D. Effect of different carbon sources on L-(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v.21, p.33–37, 2004.

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.

TANGO, M.S.A.; GHALY, A.E.. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. **Biomass and Bioenergy**, v.16, p. 61-78, 1999.

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

TIMBUNTAM, W.; SRIROTH, K.; YUTAKA TOKIWA, Y. Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v.28, p.811–814, 2006.

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

TULI, A.; SETHI, R.P.; KHANNA, P.K.; MARWAHA, S.S. Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. **Enzyme and Microbial Tecnology**, v.7, p.164–168, 1985.

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

UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. Reference Manual for U.S. Whey And Lactose Products. Arlington, VA, 2004.

VAHVASELKA, M.I; LINKO, P. (1987) Lactic acid fermentation in Milk ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. In: Neijssel, O.M., Van der Meer, R.R. e Luyben, K.Ch A.M. (Eds.), Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology, 3 (123) Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 317-320.

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.

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

WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p.163-172, 2006.

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

WESTBY, A., 2002. Cassava utilization, storage and small-scale processing. In: Hillocks, R.J., Tresh, J.M., Bellotti, A.C. (Eds.), Cassava: Biology, production and utilization. CAB International, p. 281–300.

WIJTZES, T.; BRUGGEMAN, M.R; NOUT, M.J.R.; ZWIETERING, M.H. A computerised system for the identification of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 65–70, 1997

WIKIPÉDIA. O ácido polilático. Wikimedia Foundation. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polylactic_acid&oldid=407314317>. Acesso em: 19 fev. 2011.

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

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

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

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

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

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

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 and Microbial Technology**, v. 33, 416-423, 2003.

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

8. Anexo 1

8.1 Artigos publicados em periódicos referentes ao tema do doutorado

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.; 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, 2011.

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 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.

8.2 Artigos aceitos para publicação em periódicos referentes ao tema do doutorado

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**, 2011