

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 30/03/2018.

---

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

---

Otimização da produção de D(-) ácido lático por *Sporolactobacillus nakayamae* e *Lactobacillus delbrueckii* utilizando subprodutos agro-industriais

SUSAN MICHELZ BEITEL

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

Rio Claro

2016

**Otimização da produção de D(-) ácido lático por *Sporolactobacillus nakayamae* e *Lactobacillus delbrueckii* utilizando subprodutos agro-industriais**

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

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

Rio Claro

2016

547.29 Beitel, Susan  
B423o Otimização da produção de D(-) ácido láctico por  
Sporolactobacillus nakayamae e Lactobacillus delbrueckii  
utilizando subprodutos agro-industriais / Susan Beitel. - Rio  
Claro, 2016  
149 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Jonas Contiero

1. Fermentação. 2. Delineamento experimental. 3.  
Batelada alimentada. 4. Sporolactobacillus nakayamae. I.  
Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE D(-) ÁCIDO LÁTICO POR Sporolactobacillus nakayamae e Lactobacillus delbrueckii utilizando subprodutos agro-industriais**

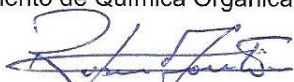
**AUTORA: SUSAN MICHELZ BEITEL**

**ORIENTADOR: JONAS CONTIERO**

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

  
Prof. Dr. JONAS CONTIERO  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

  
Profa. Dra. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. RUBENS MONTI  
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. MOACIR ROSSI FORIN  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / Universidade Federal de São Carlos

  
Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 30 de setembro de 2016

## **Dedicatória**

Ao meu querido pai Jaime Beitel,  
dedico.

“Faça o que você pode, com o que você tem, no lugar onde você está”  
Theodore Roosevelt

## Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Jonas Contiero, pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa em seu laboratório, pela orientação e solicitude, pelos conhecimentos repassados e valores transmitidos, sugestões, incentivo e amizade.

Às colegas do grupo de pesquisa do “Ácido láctico”, e, sobretudo amigas Luciana e Daiane, pelas colaborações em várias etapas deste trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, pelo carinho e amizade.

Ao meu pai Jaime pela formação pessoal e educação, por ter me mostrado como o trabalho e dedicação edificam, pelo carinho e incentivo.

Aos meus avós e irmã, pelo carinho e apoio.

À minha avó Eunice “*In Memoriam*” pelo carinho e atenção.

Ao Instituto de Biociências da UNESP por fornecer infraestrutura necessária para este trabalho.

À Braskem pela bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (Processo nº: 10/52416-8).

A todos que colaboraram direta ou indiretamente durante esses anos de desenvolvimento do doutorado, meu reconhecimento.



## RESUMO

O ácido láctico tem sido alvo de ampla investigação devido a sua ampla possibilidade de aplicações, despertando interesse em vários setores biotecnológicos e industriais. Pode ser obtido através de via química ou fermentativa; a vantagem da produção por fermentação é a obtenção de isômeros opticamente puros. Um dos principais interesses é reduzir os custos de produção, assim como desenvolver processos que não gerem resíduos. Os substratos utilizados na fermentação e a etapa de purificação do ácido láctico são os principais responsáveis pelo custo do processo. Para tanto, o objetivo do atual estudo foi selecionar substratos disponibilizados por baixo custo, assim como estudar as melhores condições de fermentação que propiciem uma eficiente produção de D(-) ácido láctico por cepas selvagens de *Sporolactobacillus nakayamae* e *Lactobacillus delbrueckii*. Os componentes dos meios de cultivo, assim como suas respectivas concentrações foram selecionados a partir de planejamentos experimentais. Por sua vez, foi avaliada a influência de diferentes agentes neutralizadores de pH na fermentação. Também foram estudados os parâmetros fermentativos como pH, temperatura, agitações e proporções de inóculo. A fim de elevar os níveis de produção e produtividade, foram estudadas diferentes estratégias de bateladas alimentadas. Foi desenvolvido um processo de purificação utilizando recursos de baixo custo. A partir do meio de cultivo composto de açúcar cristal, farinha de amendoim e Tween 80, *S. nakayamae* foi capaz de produzir 112,93 g/L de D(-) ácido láctico. A purificação e recuperação do ácido láctico foram realizadas por filtração do meio fermentado em carvão e celite, em seguida passado por resina de troca catiônica. Essa técnica revelou-se eficiente na remoção de açúcares e proteínas assim como na recuperação do ácido láctico. Ainda utilizando *S. nakayamae* outro meio de cultivo foi estudado, a partir da mesma fonte de carbono, porém usando extrato de levedura (subproduto da produção de etanol) como fonte de nitrogênio e adicionado de alguns sais. Após estudar as melhores condições de cultivo em biorreator (pH 6,0, 35 °C, 20% de volume de inóculo e 125 rpm), alcançou-se uma produção de 122,41 g/L de ácido láctico e produtividade de 3,65 g/L.h por fermentação em batelada alimentada multi pulsos, em 54 horas. O agente controlador de pH selecionado foi NaOH, que colabora evitando a geração de resíduos durante a purificação. A produção de D(-) ácido láctico foi estudada por um segundo micro-organismo (*L. delbrueckii*), desenvolvendo-se um processo fermentativo eficiente, de baixo custo, a partir do qual os mais altos níveis de produção (162 g/L) foram alcançados. O meio de fermentação foi composto de melaço de cana-de açúcar, água de maceração de milho e alguns sais, tais resíduos foram utilizados sem necessidade de

hidrólise. A fermentação foi conduzida por 48 horas em batelada alimentada multi pulsos a 39 °C, 150 rpm, 25% de inóculo, pH 5.5, controlado por  $\text{Ca(OH)}_2$  que, além de ser economicamente viável, apresenta a vantagem de não aumentar drasticamente a pressão osmótica do meio de cultivo. A produção de D(-) ácido láctico de elevada pureza óptica a partir dos resíduos agro-industriais utilizados, é uma alternativa econômica para o processo em escala industrial.

Palavras-chave: D(-) ácido láctico. Delineamento experimental. Fermentação. Batelada alimentada. *Sporolactobacillus nakayamae*. *Lactobacillus delbrueckii*.

## ABSTRACT

Lactic acid has been extensively studied due to its wide range of applications, receiving more attention in several industrial and biotechnological fields. This molecule can be obtained by chemical or fermentative pathways; only by fermentation the optically pure isomers could be achieved. Reducing the fermentation cost as well as residues generated is a real need. The substrates used in fermentation and the purification step are the mainly responsible for the costs of the process. Therefore, the aims of this study were to select affordable substrates and study the fermentation conditions to improve D(-) lactic acid production by wild strains of *Lactobacillus delbrueckii* and *Sporolactobacillus nakayamae*. In order to evaluate the components of media and its ideal concentration, experimental designs were applied. The influence of temperature, pH, inoculum percentage, agitation conditions and pH controlling agents were also verified. Moreover, fed-batch feeding strategies were studied in order to increase production and productivity levels of D(-) lactic acid. A purification technique based on low-cost material was developed. D(-) lactic acid concentration of 112.93 g/L was obtained using commercial sucrose, peanut flour, and Tween 80 by *S. nakayamae*. The purification and recovery of D(-) lactic acid from this fermentation medium were performed using filtration on activated carbon, followed by celite and cation resin exchange. This approach showed a high efficiency in protein and sugar removal as well as in D(-) lactic acid recovery from the fermentation medium. Other culture media was developed using *S. nakayamae*, achieving 122.41 g/L of D(-) lactic acid and 3.65 g/L.h of productivity by multi-pulse fed-batch fermentation at 54 h, using initial media containing yeast extract (byproduct of alcohol production), crystallized sugar and salts. The best parameters for fermentation setting for this process were pH 6.0, 35 °C, 20% inoculum and 125 rpm. The pH agent controller selected was NaOH, which is interesting to avoid future waste generation on purification step. The production from other microorganism (*L. delbrueckii*) was studied, describing an efficient and very low cost process, using molasses and corn steep liquor as substrate. A maximum D(-) lactic acid concentration of 162 g/liter was achieved at 48 hours of fermentation, the productivity at this point is 3.37 g/L.h. It was found that the optimal conditions to run this process were 39 °C, 150 rpm, 25% size of inoculum (v/v) and pH 5.5 controlled by addition of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , which provides economy to process and prevent cell stress that could be caused by high osmotic pressure of the culture media. The production of D (-) lactic acid of high

optical purity from agro-industrial wastes is an economical alternative process at industrial scale.

Keywords: D(-) lactic acid. Experimental design. Fermentation. Fed-batch fermentation. *Sporolactobacillus nakayamae*. *Lactobacillus delbrueckii*.

## Lista de figuras

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estruturas químicas de Fischer dos enantiômeros de ácido láctico .....                           | 18 |
| Figura 2. Vias catabólicas das bactérias ácido lácticas: a) Homofermentativa B) Heterofermentativa.. ..... | 19 |
| Figura 3. Métodos de produção de ácido láctico a) Síntese química e b) Fermentação microbiana.. .....      | 21 |
| Figura 4. . Número de publicações relacionadas com a produção de ácido láctico via fermentativa.. .....    | 21 |
| Figura 5. Previsão de Rendimento Global do mercado de Ácido láctico, 2014-2022 (USD Milhões).. .....       | 22 |
| Figura 6. Vias de síntese de PLA. ....                                                                     | 23 |
| Figura 7. Aplicações biotecnológicas do ácido láctico .....                                                | 24 |
| Figura 8. Demanda global de produção de biopolímero. ....                                                  | 25 |
| Figura 9. Capacidade de produção de Bioplástico. ....                                                      | 26 |

## Capítulo I

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Pareto graph for D(-) lactic acid production. a) PBED; b) FFD .....                                                                         | 58 |
| Figure 2. Response surface for lactic acid production by <i>S. nakayamae</i> showing the interaction between peanut flour and commercial sucrose..... | 59 |
| Figure 3. Response surface for lactic acid production by <i>S. nakayamae</i> showing the interaction between Tween 80 and commercial sucrose .....    | 60 |
| Figure 4. Response surface for lactic acid production by <i>S. nakayamae</i> showing the interaction between Tween 80 and peanut flour.....           | 61 |

## Capítulo II

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Response surface for lactic acid production by <i>S. nakayamae</i> . The interactions between (a) Yeast extract and Crystallized sugar, (b) Salts and Crystallized sugar and (c) Yeast extract and Salts..... | 91 |
| Figure 2. Time course of lactic acid and residual sucrose concentration under the conditions of using different neutralizing agents .....                                                                               | 92 |
| Figure 3. Effect of (a) temperature and (b) pH on D(-) lactic acid production and sucrose consumption by <i>S. nakayamae</i> . ....                                                                                     | 93 |
| Figure 4. Effect of (a) agitation and (b) inoculum size on D(-) lactic acid production and sucrose consumption by <i>S. nakayamae</i> . ....                                                                            | 94 |

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 5. Time courses of sucrose consumption, D(-) lactic acid production and cell growth in batch fermentation (a), pulse fed-batch (b) and multi-pulse fed-batch fermentation (c and d) by <i>S. nakayamae</i> . .... | 95 |
| Figure 6. Time courses of sucrose consumption, D(-) lactic acid production and cell growth in constant feed rate (a) and exponential fed-batch fermentation (b) by <i>S. nakayamae</i> . ....                            | 96 |

### Capítulo III

|                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1. The interaction of media elements on lactic acid production using RSM. a) Corn step liquor and Salts solution; b) Corn step liquor and sugar molasses and c) Salts solution and sugar molasses. ....        | 115 |
| Figure 2. Effect of neutralizing agents on D(-) Lactic acid production and residual sugar content by fermentation process with molasses sugar (150 g/L), corn step liquor (65 mL/L) and salts solution (5 mL/L). .... | 116 |
| Figure 3. The effects of temperature (a) and pH (b) on lactic acid fermentation. ....                                                                                                                                 | 117 |
| Figure 4. The effects of agitation (a) and inoculum size (b) on lactic acid fermentation. ....                                                                                                                        | 118 |
| Figure 5. Fed-batch fermentations of D(-) lactic acid by the <i>L. delbrueckii</i> . a and c) pulse; b) multi-pulse; d) continuous feed rate. ....                                                                    | 119 |

## Lista de tabelas

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Micro-organismos do gênero <i>Sporolactobacillus</i> envolvidos na produção de D(-) ácido láctico..... | 34 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 2. Micro-organismos do gênero <i>Lactobacillus</i> envolvidos na produção de ácido láctico ..... | 35 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Capítulo I

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. Variables and their levels in lactic acid production under a PBED ..... | 62 |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 2. Design matrix for the fractional 2 <sup>5</sup> -1 factorial experiments, used to study the influence of 5 factors on <i>S. nakayamae</i> D(-) lactic acid production ..... | 63 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 3. Variables and their levels of lactic acid production under an RSM ..... | 64 |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 4. Influence of carbon sources on <i>S. nakayamae</i> lactic acid production, productivity and yield ..... | 65 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 5. Influence of nitrogen sources on <i>S. nakayamae</i> lactic acid production, productivity and yield ..... | 66 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 6. PBED with coded values and experimental results for lactic acid production, productivity, yield and residual sugar concentration..... | 67 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 7. Fractional factorial design with coded and experimental results for lactic acid production, productivity, yield and residual sugar concentration ..... | 68 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 8. RSM design with coded values and experimental results for lactic acid production, productivity, yield and residual sugar concentration..... | 69 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Table 9. Purification parameters of the fermentation media ..... | 70 |
|------------------------------------------------------------------|----|

## Capítulo II

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. Variables and their levels for D (-) lactic acid production under a RSM..... | 87 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 2. RSM design with real values and experimental results for lactic acid production, productivity, yield and residual sugar concentration..... | 88 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 3. ANOVA with estimated regression coefficients for D(-) lactic acid production..... | 89 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 4. Comparison of D-lactic acid fermentation by <i>S. nakayamae</i> using different neutralization agents. .... | 90 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Capítulo III

|                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 1. Culture conditions on study of the parameters effect on lactic acid production ..... | 101 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 2. Influence of carbon and nitrogen sources on D(-) lactic acid production, productivity and Yield by <i>L. delbrueckii</i> ..... | 103 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 3. RSM design matrix with real/coded values and experimental results for lactic acid production, productivity, yield, and residual sugar concentration ..... | 104 |
| Table 4. ANOVA for the regression model with estimated regression coefficients for D(-) lactic acid production.....                                                | 105 |
| Table 5. Fed-batch fermentation strategies on D(-) lactic acid production .....                                                                                    | 108 |
| <b>Anexo</b>                                                                                                                                                       |     |
| Table 10. ANOVA with estimated regression coefficients for D(-) lactic acid production...                                                                          | 145 |



## Lista de abreviaturas e siglas

|           |                                        |
|-----------|----------------------------------------|
| %         | Por cento                              |
| ANOVA     | Análise de variância                   |
| ATP       | Adenosina Trifosfato                   |
| D(-)      | Levógiro                               |
| D-LDH     | D-lactato Desidrogenase                |
| FFD       | Fractional Factorial Designs           |
| g         | Grama                                  |
| GYP       | Glucose, Yeast and Peptone             |
| h         | hora                                   |
| HPLC      | High Performance Liquid Chromatography |
| L         | Litro                                  |
| L(+)      | Dextrógiro                             |
| LDH       | Lactato Desidrogenase                  |
| L-LDH     | L-lactato Desidrogenase                |
| LR        | Lactato Racemase                       |
| mg        | miligrama                              |
| mL        | Mililitros                             |
| °C        | Graus Celsius                          |
| PBED      | Plackett-Burman Experimental Design    |
| PDLA      | Poli D- ácido láctico                  |
| PDLLA     | Poli DL- ácido láctico                 |
| pH        | Potencial hidrogeniônico               |
| PLA       | Polímero de Ácido Láctico              |
| PLLA      | Poli L-ácido láctico                   |
| rpm       | rotação por minuto                     |
| RSM       | Response Surface Methodology           |
| V         | volume                                 |
| $Y_{p/s}$ | Rendimento produto substrato           |

## Sumário

|       |                                                                                                                                                                                     |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Introdução.....                                                                                                                                                                     | 15 |
| 2     | OBJETIVOS.....                                                                                                                                                                      | 17 |
| 2.1   | Objetivo geral: .....                                                                                                                                                               | 17 |
| 2.2   | Objetivos específicos: .....                                                                                                                                                        | 17 |
| 3     | Revisão da Literatura .....                                                                                                                                                         | 18 |
| 3.1   | O ácido láctico .....                                                                                                                                                               | 18 |
| 3.2   | Polimerização do ácido láctico .....                                                                                                                                                | 22 |
| 3.3   | Aplicações biotecnológicas do ácido láctico e seu polímero (PLA) .....                                                                                                              | 24 |
| 3.4   | Fatores que influenciam na produção de ácido láctico .....                                                                                                                          | 27 |
| 3.5   | Meio de cultivo para fermentação láctica: Fontes alternativas de carbono e nitrogênio<br>28                                                                                         |    |
| 3.6   | Produção do ácido láctico por fermentação .....                                                                                                                                     | 30 |
| 3.7   | Neutralizadores de pH .....                                                                                                                                                         | 31 |
| 3.8   | Micro-organismos envolvidos na produção de ácido láctico .....                                                                                                                      | 33 |
| 3.8.1 | O gênero <i>Sporolactobacillus</i> .....                                                                                                                                            | 33 |
| 3.8.2 | O gênero <i>Lactobacillus</i> .....                                                                                                                                                 | 34 |
| 3.9   | Planejamento experimental como ferramenta na otimização de processos .....                                                                                                          | 35 |
| 3.10  | Extração e purificação do ácido láctico .....                                                                                                                                       | 36 |
| 4     | Metodologia e Resultados .....                                                                                                                                                      | 39 |
|       | Capítulo I .....                                                                                                                                                                    | 40 |
|       | High D(-) lactic acid levels production by <i>Sporolactobacillus nakayamae</i> and an efficient<br>purification .....                                                               | 40 |
|       | Capítulo II .....                                                                                                                                                                   | 71 |
|       | Environmentally friendly production of D (-) lactic acid by <i>Sporolactobacillus</i><br><i>nakayamae</i> : Investigation of fermentation parameters and fed-batch strategies ..... | 71 |
|       | Capítulo III- Artigo submetido à revista ( <i>a definir</i> ) .....                                                                                                                 | 97 |

|                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Efficient conversion of agro-industrial wastes into D(-) lactic acid by fed-batch fermentation using <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....                     | 97  |
| 5 Considerações finais.....                                                                                                                                     | 120 |
| Referências bibliográficas .....                                                                                                                                | 122 |
| Anexo .....                                                                                                                                                     | 135 |
| Artigo publicado (referente ao capítulo I) .....                                                                                                                | 135 |
| Material suplementar referente ao artigo I “High D(–) lactic acid levels production by <i>Sporolactobacillus nakayamae</i> and an efficient purification” ..... | 145 |

## 1 Introdução

O ácido láctico é uma das moléculas mais investigadas nos últimos tempos apresentando diversas aplicações na área médica, alimentícia, farmacêutica, ortodôntica, têxtil, entre outras (WEE et al., 2004). Grande atenção tem sido voltada para a produção do biopolímero de ácido láctico (PLA). Diferentes polímeros podem ser construídos, apresentando características distintas direcionadas para determinadas aplicações. Isso é possível pelo fato de existirem dois isômeros da molécula de ácido láctico, D(-) e L(+) (GHAFAR et al., 2014). A proporção de cada isômero na constituição dos polímeros é responsável pela característica que o mesmo apresentará, polímeros resistentes ou maleáveis, duráveis ou biodegradáveis podem ser elaborados. O ácido láctico pode ser obtido através de via química ou fermentativa, a vantagem da fermentação por micro-organismos é a obtenção de um produto opticamente puro, alcançado pela seleção de cepas homofermentativas, ou seja, que produzem apenas um tipo de isômero (L ou D), enquanto a rota química produz uma mistura racêmica de ácido. Além do mais, podem-se reduzir os custos de produção quando utilizados substratos de baixo custo no meio fermentativo, como resíduos agro-industriais; a seleção de resíduos que dispensam a etapa de hidrólise adiciona economia ao processo. Nesse sentido, esforços têm sido dirigidos no intuito de descobrir novas linhagens microbianas, que sejam eficientes em produzir níveis elevados de apenas um isômero de ácido láctico, empregando-se substratos alternativos e de baixo custo.

O Brasil é um país que domina a produção de muitas culturas, com acentuado crescimento no setor de agronegócios, e geralmente o processamento industrial dessas matérias primas geram diferentes tipos de resíduos agro-industriais, que podem ser utilizados como fonte de carbono e nitrogênio nos processos fermentativos.

A produção de ácido láctico tem sido reportada por diversos micro-organismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ILMÉN et al., 2013; SUN e ZHU, 2012, DING e TAN 2006). As bactérias lácticas são as mais utilizadas, e diferentes processos fermentativos têm sido reportados. Cada linhagem de micro-organismo apresenta atividade metabólica em faixas específicas ótimas de pH e temperatura, que influenciam em fatores como atividade enzimática e permeabilidade da membrana microbiana, qual facilita a passagem dos nutrientes do meio e a saída de produtos, por exemplo. Outros parâmetros do processo fermentativo podem influenciar no desempenho dos micro-organismos; a agitação está intimamente relacionada com a homogeneidade do meio de cultivo, promovendo um

maior contato das células com os componentes do meio; por outro lado determinadas velocidades de agitação podem causar cisalhamento, assim como interferir no oxigênio disponível no sistema. A concentração de substrato também tem grande influência no processo. Elevadas concentrações de fonte de carbono podem causar repressão catabólica, inibindo a produção, enquanto baixas concentrações de substrato obviamente levam à conversão de pequenas quantidades de produto formado. As técnicas de bateladas alimentadas vêm solucionar esse impasse, uma vez que pode se manter uma baixa concentração de substrato no interior do reator, adicionando-se estrategicamente o substrato conforme a necessidade. Existem várias estratégias de alimentação, desde as mais simples como pulsos que podem ser aplicados manualmente, como as mais elaboradas a partir de softwares, onde são inseridos dados referentes à cinética fermentativa do micro-organismo utilizado, e o programa estima a quantidade necessária de suprimento de substrato necessário para o crescimento microbiano e a conversão em produto.

Durante a fermentação, o ácido láctico formado é responsável por baixar o pH do meio, o que pode interferir no metabolismo do micro-organismo, por isso se faz necessário o controle do pH por algum agente neutralizante (HONGO et al. 1986).. Vários controladores de pH podem ser utilizados, e a escolha deste no processo é muito importante, uma vez que o controlador associa-se ao ácido láctico transformando-o em lactato, o tipo de lactato formado direcionará os processos subsequentes de purificação do ácido láctico. O agente controlador de pH também está intimamente relacionado com os custos do processo.

O processo de *downstream* é uma etapa muito importante por apresentar expressiva contribuição referente aos custos finais de obtenção do produto, assim como a geração de resíduos. Diferentes técnicas de separação e purificação do ácido láctico têm sido reportadas dependendo da constituição do meio fermentado final (GONZALEZ et al., 2006; TIMBUNTAM et al., 2008). GONZALEZ et al., 2006; TIMBUNTAM et al., 2008;.

Diante da expressiva aplicabilidade industrial do D(-) ácido láctico e da necessidade de se desenvolver processos de produção economicamente competitivos e ambientalmente amigáveis, este estudo tem como objetivo estabelecer as melhores condições para a produção de D(-) ácido láctico pelos micro-organismos *Sporolactobacillus nakayamae* e *Lactobacillus delbrueckii* através de modificações no meio de cultivo e condições de fermentação.

## 4 Considerações finais

Os micro-organismos *S. nakayamae* e *L. delbrueckii* foram capazes de produzir elevados níveis de D(-) ácido lático por fermentação. Quanto aos planejamentos experimentais, o Plackett-Burman e o fatorial fracionado foram úteis na seleção dos componentes significativos do meio de cultivo, porém observa-se que, esta técnica deve ser aliada ao bom senso do pesquisador, levando em consideração particularidades do processo e do metabolismo microbiano, a fim de interpretar corretamente os resultados. A metodologia de superfície de resposta apresentou-se muito eficiente na seleção das concentrações adequadas dos componentes do meio de fermentação. Foram apresentados dois perfis de produção distintos, um para cada micro-organismo. A metodologia de produção de ácido lático pelo *S. nakayamae* é baseada em um meio de cultivo mais puro, considerando o açúcar cristal e extrato de levedura utilizados como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, apesar dessas fontes serem disponibilizadas por um custo acessível, ainda são mais dispendiosas que os resíduos agro-industriais. NaOH foi o controlador de pH utilizado neste processo, não é um dos controladores economicamente mais acessíveis porém oferece muita facilidade no processo por ser bastante solúvel, pode ser utilizado em altas concentrações, sem apresentar obstruções nas mangueiras que o conduzem até o interior do fermentador, assim como não aumentam demasiado o volume de trabalho do processo. Além disso, se for considerado um futuro processo de separação por eletrodialise, o NaOH poderia ser reutilizado na fermentação. As condições de temperatura, pH e agitação estão de acordo com relatos da literatura para esta espécie e a estratégia de alimentação utilizada por um pulso oferece facilidade do processo.

A técnica de purificação utilizada foi eficiente na separação dos resíduos do processo e recuperação do ácido lático, além de ser conduzida de forma simplificada utilizando materiais não onerosos.

Portanto, trata-se de um processo que apresenta um custo moderado, porém compensado pela facilidade de condução como também no processo de *downstream*, por não apresentar muitas impurezas no meio fermentado final, facilita a purificação, assim como minimiza a geração de resíduos.

Ainda para este micro-organismo, o meio de cultivo utilizando farinha de amendoim como fonte de nitrogênio é uma alternativa econômica, porém para este modelo de reator

foram apresentadas dificuldades na condução do processo uma vez que o meio de cultivo se torna bastante consistente, obstruindo mangueiras na coleta de amostras.

Um segundo perfil de produção de ácido láctico utilizando o *L. delbrueckii* como agente conversor apresenta uma produção mais econômica, baseada em resíduos agro-industriais, utilizando um neutralizador de pH  $\text{Ca(OH)}_2$  muito acessível economicamente. Este micro-organismo apresenta a uma maior velocidade de crescimento e produção e foi capaz de produzir níveis superiores de ácido láctico em relação ao *S. nakayamae*. Contudo, a purificação deste meio fermentado pode ser mais complexa, por conter impurezas oriundas dos resíduos agro-industriais utilizados, e se considerar o método de purificação usualmente utilizado nas indústrias para separação do Cálcio, a geração de resíduos deve ser considerada. Conclui-se que, os dois perfis são interessantes e oferecem diferentes possibilidades, que podem ser aproveitadas de acordo com determinados interesses e estruturas específicas operacionais para uma produção em maior escala.

## Referências bibliográficas

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; XIAO, Y. T.; TASHIRO, Y.; WANG, Y.; ZENDO, T.; SAKAI, K.; SONOMOTO, K. Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression. **J. Biosci Bioeng.** v.119, p.153-158, 2015.
- ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotech. Adv.** v.31, p, 877–902, 2013.
- ADNAN, A.F.M.; TAN, I.K.P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Biores. Technol.** v. 98, p. 1380–1385, 2007.
- AGARRY, S. E.; SOLOMON, B. O.; AUDU, T. O. K. Optimization of process variables for the batch degradation of phenol by *Pseudomonas fluorescens* using response surface methodology. **Int. J. Chem. Technol.** v.2, p.33-45, 2010.
- 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 peptone and yeast extract – optimization by RSM. **Process. Biochem.** v. p. 465-472, 2006.
- ALTAF, M.; VENKATESHWAR, M.; SRIJANA, M.; REDDY, G. An economic approach for L-(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. **J. of Appl. Microbiol.** v. 103. p.372–380, 2007.
- ANDERSEN, A. Z.; CARVALHO, A. L. NEVES, A. R.; SANTOS, H.; KUMMERC, U.; OLSENA, L. F. The metabolic pH response in *Lactococcus lactis*: An integrative experimental and modelling approach. **Comp. Biol. Chem.** v. 33, p.71–83, 2009.
- ASLAN, S.; CALANDRELLI, L.; LAURIENZO, P.; MALINCONICO, M.; MIGLIARESI, C. Poly(D,L-lactic acid)/poly(caprolactone) blend membranes: preparation and morphological characterization. **J. Mater. Sci.** v.35 p. 1615–1622, 2000.
- ASSAVASIRIJINDA, N.; GE, D.; YU, B.; XUE, Y.; MA, Y. Efficient fermentative production of polymer-grade D-lactate by an engineered alkaliphilic *Bacillus* sp strain under non-sterile conditions. **Microb. Cell Fact.** v.15, p. 1-10, 2016.
- AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S.; HERNANDEZ, R. Mechanical, physical, and barrier properties of poly(lactide) films. **J. Plastic. Film. Sheeting.** v.19, p.123–35, 2003.
- AURAS, R.; LIM, L.T.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H. **Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application.** New Jersey: Jhon Wiley & Sons, Inc; 2010.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In SALMINEN S., von WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects.** 3<sup>rd</sup> ed New York: Marcel Dekker, 2004. p.1-72.
- BAILY, J.E. Biochemical reaction engineering and biochemical reactors. **Chem. Eng. Sci.** v.35, p.1854-1886, 1980.



BANASIAK, L.J.; KRUTTSCHNITT, T.W.; SCHAFER, A.I. Desalination using electrodialysis as a function of voltage and salt concentration. **Desalination**. v. 205, p. 38-46, 2007.

BEITEL, S.M.; SASS, D.C.; COELHO, L.F.; CONTIERO, J. High D(-) lactic acid levels production by *Sporolactobacillus nakayamae* and an efficient purification. **Ann. Microbiol.** DOI: 10.1007/s13213-016-1224-4, p.1-10, 2016.

BIOFUELS DIGEST. The 30 Hottest Molecules of 2016: sneak preview preview. Disponível em : <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2016/01/04/the-30-hottest-molecules-of-2016-sneak->. Acesso em: Jul. 2016.

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

BRITO, G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M.; MÉLO, T.J.A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **REMAP**, v. 6.2, p. 127-139, 2011.

BULUT, S.; ELIBOL, M.; OZER, D. Effect of different carbon sources on L(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. **Biochem. Engine. J.** v. 21. p.33–37, 2004.

C.H. HOLTEN, A. MÜLLER. **Lactic acid**. Germany: VHC Weinheim, 1971.

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

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

CARR, F.J; CHILL,D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 28, p. 281–370, 2002.

CHARLES, M. Fermentation Scale-up: Problems and Possibilities. **Trends Biotechnol.** v. 3, p.134-139, 1985.

CHEN, C. C.; JU, L. K. Adsorption Characteristics of polyvinylpyridine and activated carbon for lactic acid recovery from fermentation of *Lactobacillus delbrueckii*. **Sep. Sci. Technol.** v.33, p.1423-1437, 1998.

COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B.; RODOVALHO, C. M.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* Imism6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Braz. J. Chem. Eng.** v.28, p.27-36, 2011.

COELHO, L.F.; LIMA, C.J.B.; BERNARDO, M.P.; ALVAREZ, G.M.; CONTIERO, J. Improvement of L(+)-lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. **J. Sci. Food. Agr.** v. 90, p. 1944-1950, 2010.

COUTO, A.F. **Análise de correlação no reconhecimento de interações em arranjos Plackett-Burman**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais, 2012.

CREDENCE RESEARCH. Lactic acid market by application (food and beverages, pharmaceuticals, industrial applications, personal care products) - growth, share, opportunities & competitive analysis, 2015 -2022. Disponível em:  
<<http://www.credenceresearch.com/report/lactic-acid-market>>. Acesso em Jul. 2016.

DAMMER, L.; CARUS, M.; RASCHKA, A.; SCHOLZ, L. **Market developments of and opportunities for biobased products and chemicals**. Nova-Institute for Ecology and Innovation, Germany, 2013. p. 1-69

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

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

DUMBREPATIL, A.; ADSUL, M.; CHAUDHARI, S.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in batch fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** v.74. p. 333–335, 2008.

FIEDLER, T.; BEKKER, M.; JONSSON, M.; MEHMETI, I.; PRITZSCHKE, A.; SIEMENS, N.; NES, I.; HUGENHOLTZ, J.; KREIKEMEYER, B. Characterization of three lactic acid bacteria and their isogenic ldh deletion mutants shows optimization for ATP (cell mass produced per mole of ATP) at their physiological pHs. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 77, p. 612-617, 2011.

FRANÇA, F.P.; JESUS, A.M.; OLIVEIRA, F.J.S. Enhancement of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* atcc 6949 using sugarcane molasses. **Can. J. Pure Appl. Sci.** v.3, p. 773-778, 2009.

FUKUSHIMA, K.; SOGO, K.; MIURA, S.; KIMURA, Y. Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice starch. **Macromol. Biosci.** v. 20, p. 1021-1027, 2004.

GARLOTTA D. A literature review of poly(lactic acid). **J. Polym. Environ.** v. 9, p. 63–84, 2001.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G.: Taxonomic Outline of the Procaryotes. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Verlag, New York: Springer, 2004.

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

GHAFFAR,T.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AQIL,T.; ZULIFQAR, Z.A.; TARIQ, M.; KAMRAN, N.; EHSAN, S.; MEHMOOD. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **J. Radiat. Res. Appl. Sci.** v. 7, p. 227-229, 2014.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC. Lactic Acid: global strategic business report. Research and Markets The World's Largest Market Research Store, Taylors Lane, Apr. 2011. Disponível em: <<http://www.researchandmarkets.com/research/pkzwxk/lactic/acid>> Acesso em: Jul. 2016.

GOLLWITZER, H.; THOMAS, P.; DIEHL, P.; STEINHAUSER, E.; SUMMER, B.; BARNSTORF, S.; GERDESMAYER, L.; MITTELMEIER, W.; STEMBERGER, A. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly (D,L- lactic acid) coating for orthopaedic implants. **J. Orthopaed. Res.** v. 23. p. 802-809, 2005.

GONZÁLEZ, M.I.; ALVAREZ S.; RIERA, F.A.; ALVAREZ R. Purification of lactic acid from fermentation broths by ion-exchange resins. **Ind. Eng. Chem.** v. 45. p. 3243-3247, 2006.

GONZÁLEZ, M.I.; ÁLVAREZ, S.; RIERA, F.; ÁLVAREZ, R. Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey, **J. Food Eng.** v. 80, p. 553–561, 2007.

GONZÁLEZ, T.; TERRÓN, M.; YAGÜE, S.; SILVA, R.; JUNCA, H.; ZAPICO, E.; TELLEZ, A. Melanoidin – containing wastewaters induce selective laccase gene expresión in the white-rot fungus *Trametes* sp. I – 62. **Res. Microbiol.** v.159, p.103-109, 2008.

GUYOT JP1, CALDERON M, MORLON-GUYOT J..Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. **J. Appl. Microbiol.** v.88, p. 176-82, 2000.

HABOVA, V.; MELZUCH, K.; RYCHTERA, M.; SEKAVOVA, B. Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth, **Desalination.** v.163, p. 361–372, 2004.

HAMMES, W.P. AND R.F. VOGEL. The genus *Lactobacillus*. In, WOOD, B.J.B.; W.H. Holzappel . **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 19-54.

HAULY, M. C. Influência do NaCl e do NaNO<sub>2</sub> sobre a fermentação láctica desenvolvida pelo *Lactobacillus curvatus* em meio MRS. **Semina: Ci. Exatas Tecnol.** v. 22. p.37-41, 2001.

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

HOLZAPFEL, W.H.; BOTHA, S.J. Physiology of *Sporolactobacillus* strains isolated from different habitats and the indication of in vitro antagonism against *Bacillus* species. **Int. J. Food Microbiol.** v.7. p.161-168, 1988.

HONGO, M.; NOMURA, Y.; IWAHARA, M.. Novel method of lactic acid production by electrodialysis fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** v.52, p. 314–319, 1986.

HU, Y.; DAOUD, W.A.; CHEUK, K.K.L.; LIN, C.S.K. Newly Developed Techniques on Polycondensation, Ring-Opening Polymerization and Polymer Modification: Focus on Poly(Lactic Acid). **Materials.** v.9, p. 133, 2016.

HUSSEIN, H. S. Optimization of plant-bacteria complex for phytoremediation of contaminated soils. **Internat. J. Bot.**, v. 4, p. 437-443, 2008.

ILMÉNEMAIL, M.; KOIVURANTA, K.; RUOHONEN, L.; RAJGARHIA, V.; SUOMINEN, P.; PENTTILÄ, M. Production of L-lactic acid by the yeast *Candida sonorensis* expressing heterologous bacterial and fungal lactate dehydrogenases. **Microb. Cell Fact.** v.12, p. 12-15, 2013.

INSTITUTE FOR BIOPLASTICS AND BIOCOMPOSITES. Polymers facts and estatics. Disponível em: <<http://ifbb.wp.hs-hannover.de/wp-content/uploads/2015/11/IfBB-Biopolymers-facts-and-statistics-edition-2-2015-e-version.pdf>>. Acesso em: Jul. 2016.

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

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 74, p. 524-534, 2007.

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*, **Process. Biochem.** v. 41, p. 759-763, 2006.

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

KADAM, S. R.; PATIL, S. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. A.; GOKHALE, D. V. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. **Process Biochem.** v.41, p. 120-126, 2006.

KANDLER, O.; N. WEISS. Genus *Lactobacillus*. In, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol 2, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1063-1065.

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

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

KÉKI, S.; BODNA ´R, I.; BORDA, J.; DEA ´K, G.; ZSUGA, M. Fast Microwave-Mediated Bulk Polycondensation of D,L-Lactic Acid . **Macromol. Rapid Commun.** v.22, p.1063, 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process. Biochem.** v.40. p. 607–619, 2005.

KIM, Y. H.; MOON, S. H. Lactic acid recovery from fermentation broth using one-stage electrodialysis, **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v.76, p.169–178, 2001.

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

KULKARNI, R.K.; MOORE, E.G.; HEGYELI, A.F.; LEONARD, F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. **J. Biomed. Mater. Res.** v.5, p.169, 1971.

KWON, S.; LEE, P. C.; LEE, E. G.; CHANG, Y. K.; CHANG, N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme Microb. Technol.** v. 26. p.209–215, 2000.

LASPRILLA, A.J.R.; MARTINEZ, G.A.R.; LUNELLI, B.H.; JARDINI, A.L.; FILHO, R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotech. Adv.** v. 30, p. 321–328, 2012.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LI, Y.; CUI, F. Microbial Lactic Acid Production from Renewable Resources. In: **Sustainable Biotechnology**, Wooster: Springer Science+Business Media, 2009. p 211-228.

LI, H.; MUSTACCHI, R.; KNOWLES, C.J.; SKIBAR, W.; SUNDERLAND, G.; DALRYMPLE, I.; JACKMAN, A. An electrokinetic bioreactor: using direct electric current for enhanced lactic acid fermentation and product recovery. **Tetrahedron**, v. 60, p. 661-665, 2004.

LI, Y.; SHAHBAZI, A.; WILLIAM, K.; WAN, C. Separate and concentrate lactic acid using combination of nanofiltration and reverse osmosis membranes. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.147, p. 1-9, 2008.

LIM, L.T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid). **Prog. Polym. Sci.** v.33, p. 820-852, 2008.

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. **Afr. J. Biotechnol.** v. 8, p. 5842-5846, 2009.

LIMA, C.J.B.; COELHO, L.F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: Focus on medium supplementation, temperature and pH control. **Food Technol. Biotech.** v.48. p.175-178, 2011

LIMA, C.J.B.; COELHO, L.F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: Focus on medium supplementation, temperature and pH control. **Food Technol. Biotech.** v.48. p.175-178, 2010.

LIU, H.; SONG, W.; CHEN, F.; GUO, L.; ZHANG, J. Interaction of microstructure and interfacial adhesion on impact performance of polylactide (PLA) ternary blends. **Macromolecules**. v.44, p. 1513–1522, 2011.

LIU, Y.; GAO, W.; ZHAO, X.; WANG, J.; GARZA, E.; MANOW, R.; ZHOU, S. Pilot scale demonstration of D-lactic acid fermentation facilitated by  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  using a metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biores. Technol.** v.169, p.559–565, 2014.

LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em <<http://www.bacterio.net/s/sporolactobacillus.html>>. Acesso em: Out. 2013.

LU, L.; PETER, S.J.; LYMAN, M.D. In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. **Biomaterials**, v.21, p.1837–1845, 2000.

LU, Z.; LU, M.; HE, F.; YU, L. An economical approach for D-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source. **Biores. Technol.** v. 100, p. 2026–2031, 2009.

LU, Z.; WEI, M.; YU, L. Enhancement of pilot scale production of L(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using membrane bioreactor. **Process Biochem.** v.47, p. 410–415, 2012.

MALHOTRA, A.; MELVILLE, N. P.; WATSON, R. T. Spurring impactful research on information systems for environmental sustainability. **MIS Quarterly**, v. 37, p. 1265–1274, 2013.

MANI, K.N.; HADDEN, D.K. Process for the recovery of organic acids and ammonia from their salts, **U.S. Patent No. 5,814,498**, 1998.

MARIAM, I.; MANZOOR, K.; ALI, S.; HAQ, I. Enhanced production of ethanol from free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under stationary culture. **Pak. J. Bot.** v.41, p. 821–833, 2009.

MARINOVA, M.; KYUCHOUKOV, G.; ALBET, J.; MOLINIER, J.; MALMARY, G. Separation of tartaric and lactic acids by means of solvent extraction. **Sep. Purif. Technol.** v.37, p.199–207, 2004.

MARQUES, S.; SANTOS, J. A. L.; GÍRIO, F. M.; ROSEIRO, J. C. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioch. Eng. J.** v. 41, p.210–216, 2008.

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

MEHTA, R.; KUMAR, V.; UPADHYAY, S.N. Mathematical modeling of the poly(lactic acid) ring-opening polymerization using stannous octoate as a catalyst. **Polym. Plast. Technol. Eng.** v. 46, p. 933–7, 2007.

- MENG, Y.; XUE, Y. F.; YU, B.; GAO, C. H.; MA, Y. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp WL-S20. **Biores. Technol.** v.116, p. 334-339, 2012.
- MILLER, A.; SITTER R. R. Using the folded-over 12-run Plackett-Burman design to consider interactions. **Technometrics**, v. 43, p. 44-55, 2001.
- MILLER, A.; SITTER, R. R. Using folded-over nonorthogonal designs. **Technometrics**, v. 47, p. 502-513, 2005.
- MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. Fermentation by the human large intestine microbial community in an in vitm semicontinuous culture system. **Appl. Environ. Microbiol.** v.42, p. 400-407, 1981.
- MOLDES, A.B.; ALONSO, J.L.; PARAJO, J.C. Recovery of lactic acid from simultaneous saccharification and fermentation media using anion exchange resins. **Bioproc. Biosys. Eng.** v.25. p. 357–363, 2003.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 7th ed. John Wiley & Sons, Inc, 2009.
- MOTTA, A. C. **Síntese e caracterização do Poli(L-ácido láctico)-PLLA e Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)-PLGA e estudo da degradação “in vitro”**. Dissertação de Mestrado. Unicamp, Campinas, 2002.
- MOTTA, A.C.; DUEK, E.A.R. Síntese, caracterização e degradação "in vitro" do Poli(L-ácido láctico). **Polímeros**, v.16, p.26-32, 2006.
- 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. **Biochem. Eng. J.** v. 40. p.437–444, 2008.
- 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. **Biochem. Eng. J.** v. 40, p.437–444, 2008.
- N. R. MERRITT, The influence of temperature on some properties of yeast. **J. Inst. Brew.**v. 72, p. 374-383, 1966.
- NAGAHATA, R.; SANO, D.; SUZUKI, H.; TAKEUCHI, K. Microwave-Assisted Single-Step Synthesis of Poly(lactic acid) by Direct Polycondensation of Lactic Acid. **Macromol. Rapid Commun.**v.28, p.437–442, 2007.
- NANCIB, N.; NANCIB, A.; BOUDJELAL, A.; BENSLMANE, C.; BLANCHARD, F.; BOUDRANT. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Biores Technol.** v. 78. p.149-153, 2001.
- NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Eletron. J. Biotechno.** v. 7. 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. **Biores. Technol.** v. 96, p. 485-490, 2005.

NCBI- National Center for Biotechnology Information. Taxonomy. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy)>. Acesso em: Out. 2013.

NIKOLIC, L.; RISTIC, I.; ADNADJEVIC, B.; NIKOLIC, V.; JOVANOVIC, J.; STANKOVIC, M. Novel Microwave-Assisted Synthesis of Poly(D,L-lactide): The Influence of Monomer/Initiator Molar Ratio on the Product Properties. **Sensors.** v. 10, p.5063-5073, 2010.

OHKOUCI, Y.; E INOUE, Y. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. **Biores. Technol.** v. 97. p.1554–1562, 2006.

OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology.** British Isles : Edenbridge Ltd, 2007.

OKANO, K.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 85, p. 413-423, 2010.

OKINO, S.; SUDA, M.; FUJIKURA, K.; INUI, M.; YUKAWA, H. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 78. p.449–454, 2008.

OSAWA, F.; FUJII, T.; NISHIDA, T.; TADA, N.; OHNISHI, T.; KOBAYASHI, O.; KOMEDA, T.; YOSHIDA, S. Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. **Yeast.** v. 26, p. 485–496, 2009.

P. PAL, P. DEY. Developing a sustainable technology for clean production of lactic acid. In: International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences, 2012, Bangkok, p.166-170.

PAREKH, S.; VINCI, V.A.; STROBEL, R.J. Improvement of microbial strains and fermentation process. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.54. p. 287- 301, 2000.

PELEG, M. A model of temperature effects on the microbial populations from growth to lethality. **J. Sci. Food Agr.** v.68, p.83–89, 1995.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Braz. J. Food Technol.** v.2, p.145-151, 2008.

QIN, J.; ZHAO, B.; WANG, X.; WANG, L.; YU, B.; MA, Y.; MA, C.; TANG, H.; SUN, J.; XU, P. Non-sterilized fermentative production of polymergrade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp 2–6. **Plos one.** v.4, p. 43-59, 2009.



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

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. **Ann. Biol. Res.** v.1, p. 218-228, 2010.

REIMANN, W. Downstreaming of lactic acid from hydrolysate of rye after fermentation. **Agric Eng Int: the CIGR Ejournal**. v.8, p.1-15, 2006.

RUSSELL, J.B.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that leads to rumen acidosis. **J. Dairy Sci.** v.68, p.1712-1721, 1985.

SAKATA, M. M.; RINCON, M.C.A.; DUEK, E. A. R. Estudo da interação polímero / cartilagem / osso utilizando Poli (ácido láctico - co - ácido glicólico) e Poli (p- Dioxanona) em condilo femural de coelhos. **Polímeros**, v. 14. p. 176-180, 2004.

SCHEPER, T. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, 1<sup>st</sup> ed. Nova Iorque: Springer, 2000.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; BORZANI, A. W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2. São Paulo: Ed Edgard Blücher LTDA, 2001.

SCOPUS. Lactic acid production by fermentation. Disponível em: <<https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=EAC47EC5A244F3FDB6879F63B0F0D5B1.I0QkgbljGqqLQ4Nw7dqZ4A%3a20&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28Lactic+acid+fermentation%29+AND+PUBYEAR+%3E+1989&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=39&count=11541&analyzeResults=Analyze+results&txGid=0>>. Acesso em: Jul. 2016.

SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Aproveitamento de resíduos agro-industriais: ácido láctico, uma alternativa. **SBCTA**. v.25. p.37-40, 1991.

SODEGARD, A.; STOLT, E.M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Prog. Polym. Sci.** v. 27, p.1123-1163, 2002.

SON, M.; KWON, Y. Direct fermentation of starch to L(+)-Lactic acid by fed-batch culture of *Lactobacillus manihotivorans*. **Food Sci. Biotechnol.** v. 22: p.289-293, 2013.

STOCK, D.W.; QUATTRO, J.M.; WHITT, G.S.; POWERS, D.A. Lactate dehydrogenase (LDH) gene duplication during chordate evolution: The cDNA sequence of the LDH of the tunicate *Styela plicata*, **Mol. Biol. Evol.** v.14, p.1273-1284, 1997.

STOKES, L. Fermentation of glucose by suspensions of *Escherichia coli*. **Bacteriol** v. 57, p. 147-158, 1949.

SUN, J.; ZHU, J.; LI, W. L-(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using pretreated dairy manure as carbon and nitrogen source. **Biomass Bioenerg.** v. 47, p. 442-450, 2012

T.B. VICKROY: Lactic Acid. In: M. Moo-Young. **Comprehensive Biotechnology**, Vol. 3, New York: Pergamon Press, 1985.

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. **Biores. Technol.** 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 Bioenerg.** v.16. p. 61–78, 1999.

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

TASKIN, M.; ORTUCU, S.; UNVER, Y.; ARSLAN, N.P.; ALGUR, O.F.; SAGHAFIAN, A. L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* MBG-10 using starch-rich waste loquat kernels as substrate. **Starch.** v.65, p. 322–329, 2012.

THE ESSENTIAL CHEMICAL INDUSTRY. Disponível em:  
<[www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/biotechnology-in-the-chemical-industry.html](http://www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/biotechnology-in-the-chemical-industry.html)>. Acesso em: Jul. 2016.

THOMAZ, C. M. Stereocontrolled ring-opening polymerization of cyclic esters: synthesis of new polyester microstructures. **Chem. Soc. Rev.** v.39, p.165–173, 2010.

TIMBUNTAM, W.; SRIROTH, K.; PIYACHOMKWAN, K.; TOKIWA, Y. Application of bipolar electrodialysis on recovery of free lactic acid after simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch. **Biotechnol. Lett.** v.30, p.1747–1752, 2008.

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

TOKUHIRO, K.; ISHIDA, N.; KONDO, A.; TAKAHASHI, H. Lactic acid fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying B-glucosidase on the cell surface. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 79, p. 481–488, 2008.

TONG-NGOK, T.; JUNNGAM, S.; WONGPAJAN, R.; PIVSA-ART, W.; PIVSA-ART, S. Synthesis of poly(D-lactic acid) using a 2-steps direct polycondensation process. **Energy Procedia.** v.34, p.604–609, 2013.

TRINDADE, M.C. **Estudo da recuperação do ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas e surfactantes.** Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

VODNAR, D. C.; DULF, F.V.; POP, O.L.; SOCACIU, C. L. (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol. **Microb. Cell Fact.** v.12, p. 1–9, 2013.

WANG, L.; ZHAO, B.; LI, F.; XU, K.; MA, C.; TAO, F.; LI, Q.; XU, P. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 89, p.1009–1017, 2011.

WANG, X.; WANG, Y.; ZHANG, X.; XU, T. In situ combination of fermentation and electrodialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: operational compatibility and uniformity. **Bioresour. Technol.** v. 125, p. 165–171, 2012.

WASEWAR, K.L.; PANGARKAR, V.G.; HEESINK, A.B.M.; VERSTEEG G.F. Intensification of enzymatic conversion of glucose to lactic acid by reactive extraction, **Chem. Eng. Sci.**, v. 58, p. 3385-3393, 2003.

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

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

WEE, Y. J.; YUN, J. S.; KIM, D.; RYU, H. W. Batch and repeated batch production of L(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 33. p.431–435, 2006.b

XU, G.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, S. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. **Biochem. Engin. J.** v. 38. p.189–197, 2008.

YANG, P.; TIAN, Y.; WANG, Q.; CONG, W. Effect of different types of calcium carbonate on the lactic acid fermentation performance of *Lactobacillus lactis*. **Biochem. Eng. J.** v.98, p. 38–46, 2015.

YEN,H.; CHEN,T.; PAN,W.; WU, H. Effects of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 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. **J. Ferment. Bioeng.** 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.

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. **Biochem. Eng. J.** v.39, p. 496-502, 2008.

YUMOTO, I. IKEDA, K. Direct fermentation of starch to L-(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. **Biotechnol. Letters.** v. 17. p.543-546, 2004.

ZHANG, J.F.; SUN, X. Poly (lactic acid)-based bioplastics. In: Smith, R. **Biodegradable Polymers for Industrial Application**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2005. p. 251-288.

ZHANG, Y.; CONG, W.; SHI, S. Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in lactic acid production. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.162, p. 2149 –2156, 2010.

ZHANG, Z. Y.; JIN, B.; KELLY, J. M. Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 23. p.229–236, 2007.

ZHAO, B.; WANG, L.; MA, C.; YANG, C.; XU, P.; MA, Y. Repeated open fermentative production of optically pure L-lactic acid using a thermophilic *Bacillus* sp. strain. **Bioresour. Technol.** v.101, 6494–6498, 2010.

ZHENG, H.; GONG J.; CHEN, T.; CHEN, X.; ZHAO, X. Strain improvement of *Sporolactobacillus inulinus* ATCC15538 for acid tolerance and production of D-lactic acid by genome shuffling. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 85. p. 1541–1549, 2011.