

RODRIGO VICTORELLI

**PRODUÇÃO DE L-ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE CÉLULAS
BACTERIANAS IMOBILIZADAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero
Co-orientador: Dr. Cristian Jacques Bolner de Lima

Rio Claro
2011

547.29 Victorelli, Rodrigo
V645p Produção de L-ácido láctico a partir de células bacterianas
imobilizadas / Rodrigo Victorelli. - Rio Claro : [s.n.], 2011
102 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Co-Orientador: Cristian Jacques Bolner de Lima

1. Fermentação. 2. Ácido láctico. 3. Imobilização de células.
4. *Lactobacillus rhamnosus*. 5. Alginato. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

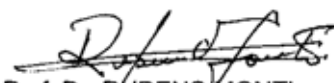
TÍTULO: PRODUÇÃO DE L-ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE CÉLULAS BACTERIANAS IMOBILIZADAS

AUTOR: RÓDRIGO VICTORELLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

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


Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Campus de Rio Claro - Ib / Instituto de Biociências de Rio Claro


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


Profa. Dra. ELIANA SETSUKO KAMIMURA
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga / USP

Data da realização: 15 de abril de 2011.

Agradecimentos

Ao professor Jonas Contiero pela orientação e confiança durante todo o trabalho;

Ao CNPq pela bolsa de estudos;

A todos os técnicos dos laboratórios, pelo apoio;

Aos meus amigos do laboratório pelas divisões de tarefas e por todo o tempo que passamos juntos;

Ao Cristian pela co-orientação;

À Cintia e Humberto pela ajuda fundamental no trabalho;

À professora Dejanira pela amizade e todo apoio;

À Milena, pela força, companheirismo, paciência e dedicação pelo meu trabalho;

Aos meus pais pelo apoio constante, meus irmãos e toda minha família;

Aos meus amigos de Rio Claro, dos seis anos que estive por aqui;

Aos meus amigos do peito de Artur Nogueira;

Muito Obrigado.

Resumo

O presente trabalho apresenta um estudo de produção de ácido lático a partir de *Lactobacillus rhamnosus* imobilizado por aprisionamento em alginato de cálcio, com a utilização de soro de queijo como fonte de carbono alternativa à glicose encontrada tradicionalmente no meio MRS para bactérias lácticas. A imobilização foi efetiva com 2 % de alginato, tendo eficiência de 99,99 %, e taxa de saída de células de 0,25 %, utilizando MRS como meio de cultivo. Estudou-se também o uso de fontes alternativas de nitrogênio como água de maceração de milho, Pro-Floo[®], autolisado de levedura e sulfato de amônio. Os melhores resultados de produção e rendimento foram obtidos a partir da utilização de soro de queijo com as fontes de nitrogênio do MRS (extrato de levedura, peptona e extrato de carne), chegando a um rendimento ($Y_{p/s}$) de 0,83, com produtividade de $0,90 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, seguido do cultivo com água de maceração de milho (AMM) e Pro-Floo[®], com $Y_{p/s}$ de 0,72 e 0,57 respectivamente. No cultivo com água de maceração de milho a produção de ácido lático atingiu $119,04 \text{ g/L}$ em 48 h. Com células livres, o melhor resultado de rendimento foi 0,73 quando se utilizou água de maceração de milho, com produtividade de $2,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e produção de ácido lático de $107,89 \text{ g/L}$. Foram realizados dois ensaios utilizando uma modificação no alginato com ácido palmítico, para melhoria na viabilidade das células imobilizadas. Houve melhora no $Y_{p/s}$ quando se utilizou o alginato modificado com ácido palmítico passando de 0,72 para 0,79 no cultivo com AMM e de 0,57 para 0,67 quando se utilizou Pro-Floo[®]. Outro cultivo foi conduzido em reator de leito empacotado com imobilização em alginato recoberto de polietilenoimina, utilizando meio MRS. No reator pode-se observar a produção contínua de ácido lático até 72 horas com rendimento de 0,88 em 4 horas de cultivo atingindo uma concentração de $11,79 \text{ g/L}$ de ácido lático.

Abstract

This work presents a study of lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized by entrapment technique in calcium alginate, using whey as alternative carbon source, avoiding glucose use in the traditional MRS medium for lactic acid bacteria. Cell immobilization was effective using 2% of alginate, with efficiency of 99.99% and rate of cell release of 0.25 %. Alternative nitrogen sources like corn steep liquor (CSL), Pro-Floo[®], autolyzed yeast and ammonium sulfate was also studied. The higher values of production and yield ($Y_{p/s}$) were obtained in the cultivation with whey and the MRS nitrogen sources (yeast extract, peptone and meat extract), reaching an $Y_{p/s}$ of 0.83, and productivity of $0.90 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, followed by the cultivation with corn steep liquor and Pro-Floo[®], with $Y_{p/s}$ of 0.72 and 0.57 respectively. With corn steep liquor, the lactic acid production reached 119.04 g/L in 48 h. In the culture with free cells the yield was 0.73 with corn steep liquor in 48 h, the productivity was $2.25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ and production 107.89 g/L. Two experiments were done with a palmitolation of alginate to improve of immobilized cell viability. Increase in yield was obtained when palmitolation was employed; the yield increased from 0.72 to 0.79 in the cultivation using corn steep liquor, and from 0.57 to 0.67 when Pro-Floo[®] was used an alternative nitrogen source. Another experiment was realized in a packed-bed continuous reactor, with polyethyleneimine coated alginate beads, using MRS as culture medium. It was observed continuous lactic acid production until 72 h, with a yield of 0.88 in 4 hours reaching a lactic acid concentration of 11.79 g/L.

Lista de figuras

Figura 1. Fermentação láctica. (a) via homofermentativa e (b) via heterofermentativa.	16
Figura 2. Produção de ácido láctico por via química a partir de acetaldeído.	17
Figura 3. Possíveis combinações para formação da cadeia polimérica do alginato.	26
Figura 4. Processo de gelificação do alginato de sódio em alginato de cálcio.	27
Figura 5. Biorreator de tanque agitado com células imobilizadas.	38
Figura 6. Biorreator de leite empacotado.	39
Figura 7. Biorreator de leite fluidizado.	40
Figura 8. Biorreator tipo <i>air lift</i> .	41
Figura 9. Usos do ácido láctico na indústria química.	43
Figura 10. Esquema geral da imobilização por aprisionamento em alginato de cálcio.	48
Figura 11. Extrusora utilizada para a imobilização das células em alginato.	48
Figura 12. Aminoetilação do alginato (1ª etapa da modificação do alginato com ácido palmítico).	50
Figura 13. Palmitolação do aminoetil alginato (2ª etapa da modificação do alginato com ácido palmítico).	51
Figura 14. Processo de imobilização por aprisionamento e recobrimento com PEI.	52
Figura 15. Sistema contínuo de fermentação com reator de leite empacotado.	53
Figura 16. Detalhe do reator de leite empacotado com células imobilizadas.	53
Figura 17. Preparo das amostras para análise em CLAE.	56
Figura 18. Produção de ácido láctico por <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> e <i>L. rhamnosus</i> em MRS modificado com três concentrações iniciais de lactose.	58
Figura 19. Produção de ácido láctico por <i>L. rhamnosus</i> utilizando diversas concentrações iniciais de lactose proveniente do soro de queijo.	59
Figura 20. Medida indireta de biomassa para <i>L. rhamnosus</i> em diversas concentrações iniciais de lactose proveniente do soro de queijo.	60
Figura 21. Medida indireta de biomassa de <i>L. rhamnosus</i> em meio MRS.	61
Figura 22. Produção de ácido láctico e consumo de glicose por <i>L. rhamnosus</i> imobilizada em diferentes concentrações de alginato de cálcio, em meio MRS.	62
Figura 23. Produção de ácido láctico e consumo de lactose por <i>L. rhamnosus</i> imobilizada em alginato de cálcio, em meio MRS modificado com lactose.	65
Figura 24. Produção de ácido láctico por <i>L. rhamnosus</i> imobilizada em alginato de cálcio, em fontes alternativas de nitrogênio.	67
Figura 25. Produção de ácido láctico por <i>L. rhamnosus</i> imobilizada em alginato de cálcio, em diferentes concentrações de Pro-Flo [®] .	69
Figura 26. Produção de ácido láctico por <i>L. rhamnosus</i> imobilizada em alginato de cálcio, em diferentes concentrações de água de maceração de milho.	70
Figura 27. Produção de ácido láctico e consumo de lactose por <i>L. rhamnosus</i> , em diferentes concentrações de água de maceração de milho, em cultivo de células livres.	72

Figura 28. Produção de ácido láctico e consumo de lactose por <i>L. rhamnosus</i> , imobilizado em alginato de cálcio, em diferentes concentrações de água de maceração de milho.	72
Figura 29. Produção de ácido láctico e consumo de lactose em cultivo com água de maceração de milho e modificação do alginato com ácido palmítico.	74
Figura 30. Produção de ácido láctico e consumo de lactose em cultivo com Pro-Floo [®] e modificação do alginato com ácido palmítico.	75
Figura 31. Produção de ácido láctico e consumo de glicose no cultivo contínuo em reator de leite empacotado.	79

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais ácidos orgânicos produzidos por via microbiológica	13
Tabela 2. Classificação das formas enantioméricas do ácido láctico	13
Tabela 3. Tipos de micro-organismos com relação à fermentação láctica	15
Tabela 4. Comparação dos aminoácidos das fontes de nitrogênio e carbono	19
Tabela 5. Composição de vitaminas do complexo B e sais minerais da água de maceração de milho	20
Tabela 6. Tipos de imobilização de células	24
Tabela 7. Vantagens obtidas com células imobilizadas em fermentações	29
Tabela 8. Comparação da fisiologia e do processo no cultivo de células imobilizadas e livres	30
Tabela 9. Propriedades Físicas do PLA	44
Tabela 10. Propriedades mecânicas do PLA	44
Tabela 11. Comparação das propriedades do PLA com outros polímeros	44
Tabela 12. Tempo de degradação de polímeros derivados do ácido láctico	44
Tabela 13. Adequação das concentrações de nitrogênio das fontes alternativas de nitrogênio	55
Tabela 14. Especificações da análise de açúcares e ácidos orgânicos em HPLC	55
Tabela 15. Especificações da análise dos isômeros D e L-ácido láctico	56
Tabela 16. Taxa de conversão de lactose em ácido láctico ($Y_{l/s}$) e ácido acético ($Y_{a/s}$) para os cultivos de células livres de <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , e <i>L. rhamnosus</i>	58
Tabela 17. Eficiência da imobilização de células de <i>L. rhamnosus</i>	63
Tabela 18. Porcentagem de saída de células no cultivo com MRS	63
Tabela 19. Produtividade e taxa de conversão no cultivo em diferentes fontes de nitrogênio	67
Tabela 20. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico com o uso do Pro-Floo [®]	69
Tabela 21. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico com o uso da água de maceração de milho como fonte de nitrogênio	70
Tabela 22. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico no cultivo de células livres	72
Tabela 23. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico no cultivo de células imobilizadas	73
Tabela 24. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico no cultivo com água de maceração de milho	75
Tabela 25. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico no cultivo com Pro-Floo [®]	76
Tabela 26. Comparação dos parâmetros de produção de ácido láctico em 48 horas	76
Tabela 27. Produção de ácido láctico por células imobilizadas	78
Tabela 28. Dados da fermentação contínua em reator de leite empacotado	79

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivos	12
3. Revisão da literatura	12
3.1 Ácido lático e fermentação lática	12
3.2 Meios de cultivo para fermentação lática	18
3.3 Imobilização de células	22
3.3.1 Propriedades e limitações da técnica de aprisionamento	31
3.3.1.1 Modificações do suporte para otimização do aprisionamento	31
3.3.1.2. Densidade e distribuição de células no suporte	32
3.3.1.3. Saída de células	34
3.3.1.4. Transferência de massa e difusão no suporte	35
3.3.1.5. Reuso do suporte com células imobilizadas	37
3.4 Fermentação com células imobilizadas em biorreatores	38
3.5. Purificação do ácido lático	41
3.6 Aplicações do ácido lático	42
4. Material e métodos	45
4.1 Micro-organismos	45
4.2 Meios de cultivo	45
4.2.1 Processamento do soro de queijo em pó	46
4.3 Quantificação da biomassa	46
4.3.1 Células livres	46
4.3.2 Células imobilizadas	46
4.4 Reativação bacteriana	46
4.5 Imobilização de células	47
4.5.1. Aprisionamento em alginato de cálcio	47
4.5.2. Aprisionamento em alginato de cálcio modificado com ácido palmítico	47
4.5.3. Cultivo em reator de leito empacotado com alginato de cálcio recoberto com polietilenoimina (PEI).	51
4.6 Eficiência da imobilização e avaliação da saída de células do suporte	54
4.7 Fontes alternativas de nitrogênio	54
4.8 Quantificação do ácido lático	55
4.9 Cálculo do rendimento e produtividade da reação	57
5. Resultados	57
5.1 Produção de ácido lático em cultivo de células livres	57
5.2 Produção de ácido lático por <i>L. rhamnosus</i> em cultivo de células livres em diversas concentrações iniciais de lactose	59
5.3 Curva de crescimento de <i>L. rhamnosus</i>	60

5.4 Imobilização de <i>L. rhamnosus</i> em diferentes concentrações de alginato	61
5.5. Eficiência da imobilização e avaliação da saída de células do suporte	63
5.6 Produção de ácido lático usando alginato 2 % e soro de queijo	64
5.7 Avaliação das fontes alternativas de nitrogênio	66
5.8 Produção de ácido lático a partir de Pro-Floo [®] como fonte alternativa de nitrogênio	68
5.9 Produção de ácido lático a partir de água de maceração de milho como fonte alternativa de nitrogênio	69
5.10 Comparação de produção de ácido lático com células livres e imobilizadas	71
5.11 - Produção de ácido lático com imobilização em alginato modificado com ácido palmítico	74
5.11.1 - Água de maceração de milho como fonte alternativa de nitrogênio	74
5.11.2 – Pro-Floo [®] como fonte alternativa de nitrogênio	75
5.12 – Produção contínua de ácido lático a partir de cultivo em reator com alginato recoberto com PEI	78
6. Conclusões	82
7. Perspectivas futuras	83
8. Referências bibliográficas	84

1. Introdução

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) é um ácido orgânico produzido a partir da fermentação por bactérias lácticas, sendo obtido nas formas isoméricas levógira (l) e destrógira (d). O uso do ácido láctico está presente em diversos ramos industriais, como na indústria alimentícia, onde age como conservante e emulsificantes; na indústria farmacêutica, na elaboração de loções e produtos cosméticos; além dos usos na indústria química como blocos construtores de outras moléculas como ácido acrílico e propilenoglicol (DATTA e HENRY, 2006). A produção de ácido láctico em 2007 foi de 150000 toneladas (SAUER et al., 2008). Atualmente o ácido láctico é utilizado para produção do polímero polilactato (PLA), que constitui um polímero biodegradável e assimilável no corpo humano, podendo ser usado na medicina, em fios de sutura, parafusos e placas reabsorvíveis; e na indústria química, para a manufatura de plásticos biodegradáveis (NAMPOOTHIRI, NAIR e JOHN; 2010). Na produção do PLA, a porcentagem dos enantiômeros D e L, determina as propriedades físico-químicas do polímero formado.

Dados da Associação Brasileira da Indústria do Plástico (Abiplast, 2007) revelam que a produção de plásticos no Brasil cresceu 7,1% em 2007, chegando a 4,9 milhões de toneladas e a reciclagem é da ordem de 500 mil toneladas, ou seja, cerca de 10 % do plástico produzido. A União Européia e os países da Europa Ocidental, com base em dados de 2004, possuem taxa média de reciclagem de 17,8%, a Alemanha lidera o *ranking* de reciclagem de plásticos, com 32,1%. Pode-se constatar que a porcentagem de reciclagem do plástico é mundialmente baixa. Devido ao grande impacto de poluentes derivados do petróleo e a degradação que esses acarretam na natureza, faz-se necessária a substituição dos produtos derivados de petróleo por produtos produzidos a partir de fontes renováveis. Polímeros biodegradáveis como os polihidroxicanoatos (PHAs) e o PLA, podem ser obtidos de fontes renováveis a partir de fermentação seguida de síntese química, além disso, o uso desses polímeros confere menor impacto ambiental.

Desta forma, o presente trabalho visa à produção de L-ácido láctico a partir da fermentação láctica de diferentes fontes alternativas, por uma bactéria láctica; utilizando a tecnologia de imobilização de células.

2. Objetivos

O presente trabalho objetiva a produção de ácido láctico utilizando células bacterianas imobilizadas com o uso da técnica de aprisionamento em matriz polimérica porosa. Primeiramente foram estudadas três espécies de *Lactobacillus*: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus* quanto à produção de ácido láctico com células livres em meio típico para bactérias lácticas, o MRS (MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960). Com a espécie que apresentou melhor produtividade e maior pureza óptica em relação ao L- ácido láctico, foi avaliada a produção de L-ácido láctico com o uso da técnica de imobilização celular em alginato, também foram avaliadas as concentrações de alginato no processo de imobilização. Com as condições de imobilizações estabelecidas, no intuito de baixar o custo da produção, o soro de queijo como fonte alternativa de carbono foi avaliado. Também algumas fontes alternativas de nitrogênio, como água de maceração de milho (Milhocina[®]), resíduo do processamento do óleo da semente de algodão (Pro-Flo[®]), sulfato de amônio e autolisado de levedura, foram estudadas. Uma modificação no alginato com ácido palmítico foi realizada no intuito de melhorar a viabilidade das células no interior do suporte. O cultivo contínuo em biorreator de coluna com leite empacotado, com células imobilizadas em alginato recoberto por polietilenoimina (PEI) foi feito com o objetivo de realizar uma fermentação contínua.

3. Revisão da literatura

3.1 Ácido láctico e fermentação láctica

Os ácidos orgânicos são moléculas de cadeia carbônica com um ou mais grupos carboxílicos, e são produzidos industrialmente principalmente por micro-organismos. Podem ser usados em processos diversos como na alimentação, na indústria farmacêutica e química. Como exemplos de ácidos orgânicos produzidos por via fermentativa têm-se o ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, entre outros (SAUER et al., 2008). O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) é um ácido orgânico produzido a partir da fermentação láctica por bactérias lácticas, e foi descoberto em meados do século XVIII por um químico sueco chamado Carl Wilhelm Scheele, ao pesquisar o coalho no soro do leite. O início da fabricação industrial de ácido láctico era feito em fermentadores de madeira devido à corrosão dos metais utilizados na

época, esse processo foi descrito primeiramente por Peckhan em 1944 (PENNA, 2002). Atualmente o ácido láctico é o terceiro ácido orgânico mais produzido por via microbiana, como ilustra a Tabela 1.

Tabela 1. Principais ácidos orgânicos produzidos por via microbiológica

Ácido orgânico	Produção anual (ton)	Micro-organismos	Aplicação
Ácido cítrico	1.600.000	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria de alimentos
Ácido acético	190.000	<i>Acetobacter</i> spp.	Indústria de alimentos
Ácido láctico	150.000	<i>Lactobacillus</i> spp.	Produção de polímeros
Ácido glucônico	87.000	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria de alimentos
Ácido itacônico	15.000	<i>Aspergillus terreus</i>	Produção de polímeros

(Adaptado de SAUER et al., 2008).

O ácido láctico ocorre naturalmente nas formas enantioméricas levógira (l) e destrógira (d). A nomenclatura dos isômeros do ácido láctico pode ser feita de três maneiras, como apresentado na Tabela 2. A síntese dos enantiômeros D e L é determinada pela presença da enzima L-lactato desidrogenase (LLDH) e D-lactato desidrogenase (DLHD) respectivamente, que realiza a reação final de redução do ácido pirúvico a ácido láctico na via glicolítica (GARVIE, 1980; MADIGAN et al., 2010).

Tabela 2. Classificação das formas enantioméricas do ácido láctico

Classificação	Isômeros	
	D	L
D-Gliceraldeído	D	L
Desvio da luz polarizada	(-) esquerda ou (l)	(+) direita ou (d)
Sistema de Cahn-Ingold-Prelog	R	S
Representação de Fischer	$\begin{array}{c} \text{CO}_2\text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CO}_2\text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

São características metabólicas e morfológicas das bactérias lácticas: o catabolismo de hexoses em ácido láctico como principal produto, são micro-organismos estritamente fermentativos (não possuem rotas de fosforilação oxidativa), mesófilos ou termófilos, gram positivos, catalase negativos, não esporulantes, bacilos ou bastonetes, anaeróbios ou

aerotolerantes (HUANG e TANG, 2007), além da capacidade biossintética limitada, que confere a dependência de meio nutricional complexo, com vitaminas e aminoácidos para o crescimento (STILES e HOLZAPFEL, 1997). Os principais aminoácidos requeridos para a fermentação láctica são a Leucina, Isoleucina e Valina (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1997), que estão presentes no soro de queijo e na água de maceração de milho, fontes alternativas comumente utilizadas na produção de ácido láctico.

O grupo das bactérias lácticas é composto por diversos gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Tetratogenococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Oenococcus*, *Weisseria*, além de algumas espécies dos gêneros esporulantes *Bacillus* e *Sporolactobacillus* (HOLT et al., 1994; STILES e HOLZAPFEL, 1997; MADIGAN et al., 2010). Geralmente as bactérias lácticas são isoladas de fontes ricas em carboidratos com leite, silagem e alimentos em geral (SALMINEN, WRIGHT e OUWEHAND, 2004; FRANÇOISE, 2010). As espécies do gênero *Lactobacillus* têm como característica comum a resistência e o crescimento em pH bastante ácido. Algumas espécies de bactérias lácticas são consideradas probióticos, que são definidos pela (ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como: “produtos biológicos que contêm micro-organismos vivos ou inativados capazes de prevenir ou tratar doenças humanas devido à interação com a microbiota ou epitélio intestinal, com células imunes, ou por outro mecanismo de ação”.

Dentro do gênero *Lactobacillus* - o gênero mais representativo das bactérias lácticas - podem-se distinguir três grupos de micro-organismos quanto à produção de ácido láctico: homofermentativos, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios (Tabela 3). Os homofermentativos, também chamados de homoláticos, constituem a maioria das espécies das bactérias lácticas e metabolizam hexoses pela via glicolítica, tendo como reação final a redução do ácido pirúvico em ácido láctico, regenerando um NAD^+ para a continuidade do metabolismo. Essa via contém a enzima frutose difosfato aldolase, que é capaz de gerar duas trioses, resultando em uma estequiometria em que uma molécula de hexose gera duas moléculas de ácido láctico (Figura 1a) (SALMINEN, WRIGHT e OUWEHAND, 2004, MADIGAN et al., 2010).

Tabela 3. Tipos de micro-organismos com relação à fermentação láctica

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

Os heterofermentativos facultativos possuem a enzima frutose difosfato aldolase e podem obter o ácido láctico pela via glicolítica, porém, possuem também enzimas que compõem a via metabólica do gluconato-6 fosfato, onde uma molécula de glicose é descarboxilada e gera uma pentose fosfato mais uma molécula de CO₂. A pentose fosfato gerada é clivada por uma enzima chamada fosfocetolase a um acetil fosfato e uma triose fosfato, que forma o ácido láctico nas etapas seguintes do metabolismo. Nesse caso gera-se além do ácido láctico, CO₂, e um acil fosfato, que pode formar etanol ou ácido acético, dependendo da presença e da atividade das respectivas enzimas que catalisam cada uma das reações. O terceiro tipo composto por bactérias estritamente heterofermentativa, possui apenas enzimas da via do gluconato-6P, as fosfocetolases (Figura 1b) (SALMINEN, WRIGHT e OUWEHAND, 2004; MADIGAN et al., 2010).

O grupo das bactérias heterofermentativas facultativas apresenta uma diversidade metabólica elevada, podendo metabolizar hexoses e pentoses devido à presença das enzimas aldolase e fosfocetolase. Em condições de anaerobiose e com limitação de nutrientes, a via homofermentativa pode sofrer alterações devido à atividade da enzima piruvato descarboxilase NAD dependente, gerando acetato e CO₂ a partir do piruvato, deslocando a produção do ácido láctico (KANDLER, 1983). Devido à ausência de citocromos e enzima catalase, na presença de O₂, pode ocorrer oxidação de compostos intermediários ao piruvato, como a redução de frutose a manitol, ou até mesmo a oxidação do ácido láctico a piruvato pela enzima lactato oxidase ou peroxidases e desidrogenases independentes de NAD (KANDLER, 1983; LIU, 2003). Esses fatores mostram a necessidade do acompanhamento da fermentação láctica para otimização do processo de obtenção de ácido láctico.

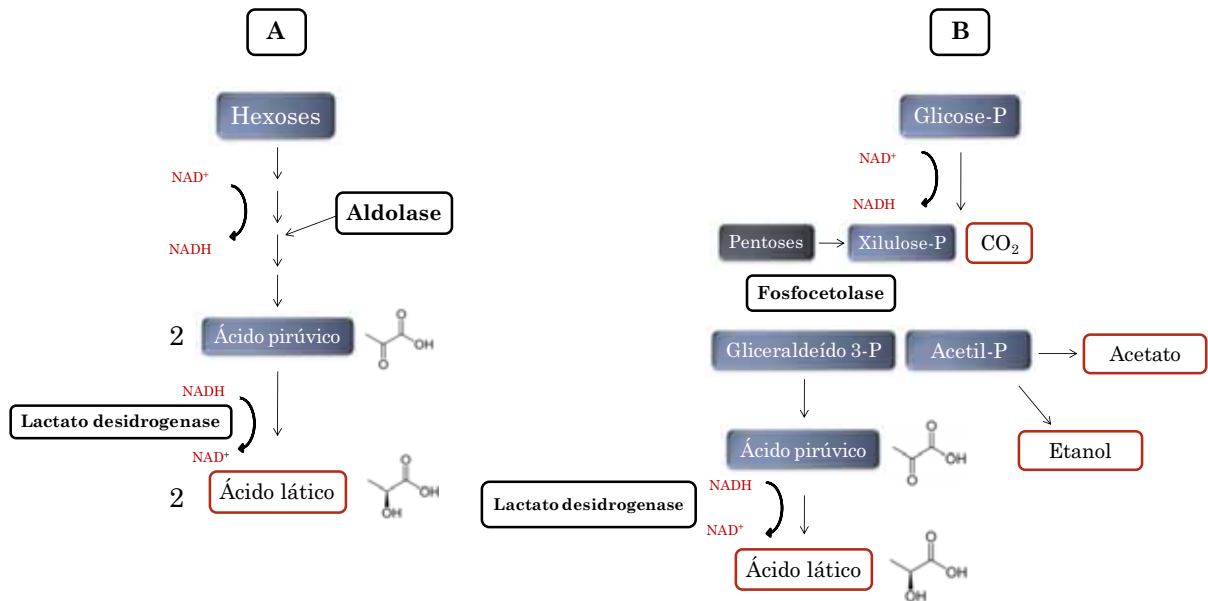


Figura 1. Fermentação láctica. (A) via homofermentativa e (B) via heterofermentativa.

A maioria das bactérias lácticas sintetiza as duas formas enantioméricas do ácido láctico. As enzimas responsáveis pela determinação de isomeria do ácido láctico, D-LDH, L-LDH e a lactato racemase (LR) (que converte o L-ácido láctico em D-ácido láctico) são expressas com intensidades diferentes dependendo de características genéticas dos micro-organismos e de características do meio de cultivo (GARVIE, 1980; KANDLER, 1983). Muitos são os trabalhos que visam obter a forma pura dos isômeros D (ZHOU et al., 2003; TANAKA et al., 2006; LU et al., 2009) e L (YUN, WEE e RYU, 2003; WEE et al., 2006; QIN et al., 2009), além disso, diversos são os estudos de engenharia genética e metabólica de bactérias lácticas como *Lactobacillus lactis* (VOS, 1999; KLEEREBEZEM et al., 2002; KLEEREBEZEM e HUGENHOLTZ, 2003; VOS e HUGENHOLTZ, 2004), *Lactobacillus plantarum* (ANDERSSON et al., 2005), *Lactobacillus helveticus* (KYLÄ-NIKKILÄ et al., 2000), *Escherichia coli* (CHANG, JUNG e RHEE, 1999; ZHOU et al., 2003) para a obtenção de formas enantioméricas puras do ácido láctico. Singh et al. (2006), detalham a abordagem de engenharia metabólica para melhoria na produção de ácido láctico em uma revisão. John et al. (2010) também revisam alguns mecanismos que estão sendo explorados para melhoria da produção de ácido láctico em nível genético, dentre eles o *genome shuffling*, sendo possível criar melhorias com relação à resistência ácida e tolerância a altas concentrações iniciais de açúcar. Duas revisões publicadas por Champomier-Vergès et al. (2002)

e Pessione et al. (2010) trazem a tona a importância das análises proteômicas de bactérias lácticas para o entendimento do metabolismo.

Alguns fungos filamentosos, como *Rhizopus oryzae*, também têm a capacidade de produção do L-ácido láctico (SAUER et al., 2008). A síntese de ácido láctico a partir de fungos tem certas vantagens, como a característica amilolítica, podendo degradar fontes de amido a hexoses, além da menor necessidade de nutrientes complexos quando comparado ao cultivo com bactérias lácticas (ZHANG, JINA e KELLY, 2007b). Além disso, as etapas de obtenção do ácido láctico do caldo fermentativo são mais simples devido à característica filamentosa do fungo e ao cultivo semi-sólido. Estudos genéticos de fungos filamentosos e leveduras também são utilizados para otimização da produção do enantiômero L-ácido láctico puro, com a espécie *Rhizopus oryzae* (BAI et al., 2004; LIU et al., 2005) e *Saccharomyces cerevisiae* (SAITOH et al., 2005), e também com o enantiômero D, com *Saccharomyces cerevisiae* (ISHIDA et al., 2006).

O ácido láctico também é sintetizado por algumas vias químicas, a principal via tem como matéria-prima o acetaldeído, e é realizada pela companhia Musashino no Japão e Sterling Chemicals Inc. nos Estados Unidos (Figura 2); outras vias químicas são: oxidação do propilenoglicol, hidrólise do ácido cloropropiônico, oxidação de propileno com ácido nítrico (NARAYANAN, ROYCHOUDHURY e SRIVASTAVA, 2004), bem como a partir do glicerol, utilizando catálise alcalina em alta pressão e temperatura (ZHANG et al., 2010). O ácido láctico obtido pelas vias químicas é constituído de uma mistura racêmica de D e L-ácido láctico.

Buscam-se hoje processos que envolvam menores gastos de produção e menores danos ambientais como o uso de micro-organismos capazes de sintetizar ácido láctico a partir de resíduos industriais como detalhado no item 3.2.

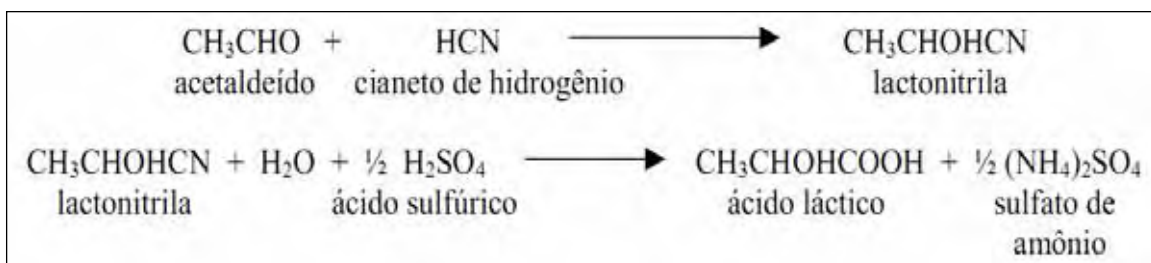


Figura 2. Produção de ácido láctico por via química a partir de acetaldeído.

3.2 Meios de cultivo para fermentação láctica

O meio de cultivo mais utilizado para cultivo e isolamento de bactérias lácticas é o meio MRS (MAM, ROGOSA e SHARPE, 1960). Trata-se de um meio nutricional rico em vitaminas, aminoácidos, peptídeos, sais minerais e açúcar. Para aplicação em larga escala, o meio MRS é inviável devido ao custo elevado das fontes de nitrogênio, por isso, busca-se fontes de carbono e fontes de nitrogênio alternativas.

As fontes alternativas de carbono mais utilizadas na obtenção de ácido láctico a partir de bactérias lácticas são: soro de queijo, com diferentes concentrações de lactose (SENTHURAN et al., 1999; KULOZIK e WILDE, 1999, GHALY et al., 2003, 2004; KIM et al., 2006, KOSSEVA et al., 2009), melão (WEE et al., 2004; HAULY, OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2003), caldo de cana (CALABIA e TOKIWA, 2007), caldo de caju (HONORATO et al., 2007), açúcar de beterraba (KOTZAMANIDIS, ROUKAS e SKARACIS, 2002; CALABIA e TOKIWA, 2007), polpa de mandioca hidrolisada (THONGCHUL, NAVANKASATTUSAS e YANG, 2010), óleo de soja hidrolisado (KWON et al., 2000), resíduo de óleo, amido (YUMOTO e IKEDA, 2004; OHKOUCHI e INOUE, 2006), amido de arroz (FUKUSHIMA et al., 2004), arroz (LU et al., 2009), palha de milho (NARITA et al., 2004), resíduo de papelão hidrolisado (YÁÑES, ALONSO e PARAJÓ, 2005), entre outros produtos e resíduos agrícolas. O soro de queijo é a fonte mais explorada na produção de ácido láctico como demonstram as revisões de Panesar et al. (2007b) e Kosseva et al. (2009).

As fontes de nitrogênio tradicionalmente utilizadas em cultivo de micro-organismo são peptona, extrato de levedura e extrato de carne. A peptona é obtida através da hidrólise enzimática de compostos protéicos de animais ou vegetais, porém Vázquez e Murado (2008) descrevem a hidrólise de restos de alimentos para obtenção desse produto, tornando-o mais acessível para cultivos em larga escala. Os resíduos mais comumente utilizados como fonte alternativa de nitrogênio são a água de maceração de milho (YU et al., 2008), sabugo de milho (RIVAS et al., 2004) e refugo do amido de batata (ZHANG et al., 2007a), que também contem açúcares. Também são utilizados produtos agrícolas como o milho (BAI et al., 2008), farinha de milho (ALTAF et al., 2006), lentilha vermelha (ALTAF et al., 2006, 2007a), farelo de trigo (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 1997, LU et al., 2009), uréia, sulfato de amônio (OGUNBANWO e OKANLAWON, 2009) e suco de caqui (LU et al., 2010). Wee et al. (2006)

realizaram uma revisão sobre a biotecnologia na produção de ácido lático, onde apresentam dados de fermentações utilizando diferentes fontes alternativas de carbono e nitrogênio.

A tabela 4 apresenta a composição de aminoácidos das fontes alternativas de carbono e nitrogênio mais comumente utilizadas na produção de ácido lático (água de maceração de milho e soro de queijo), assim como a composição do extrato de levedura (fonte de carbono mais utilizada nos meios sintéticos para produção de ácido lático).

Tabela 4. Comparação dos aminoácidos das fontes de nitrogênio e carbono

	Extrato de levedura	Água de maceração de milho	Soro de queijo
<i>Nitrogênio total (%)</i>	10-12,5	3,6	0,8
<i>Amino-nitrogênio (% massa seca)</i>	3	1,44	ND
<i>Aminoácidos (% massa seca)</i>			
Ácido aspártico	6,4	11,05	9,55
Ácido glutâmico	14,45	7,37	16,56
Alanina	15,65	15,03	4,42
Arginina	10,05	9,87	1,45
Cisteína	-	3,98	2,28
Fenilalanina	11,05	8,1	3,2
Glicina	24,7	3,83	1,66
Histidina	5,75	6,34	5,15
Isoleucina	7,55	4,86	5,29
Leucina	16,6	19,16	9,81
Lisina	10	6,78	9,27
Metionina	2,65	5,01	2,29
Prolina	-	11,64	5,55
Serina	6,15	9,87	5,14
Tirosina	9	2,51	2,92
Treonina	4,5	4,57	6,4
Valina	9,55	10,02	5,04

ND – não determinado (adaptado de Li et al., 2010)

Na Tabela 5, observa-se a composição de vitaminas e sais minerais da água de maceração de milho.

Tabela 5. Vitaminas e sais minerais da água de maceração de milho

Vitaminas	mg / 100g de massa seca
Niacina (B3)	8,4
Ácido pantotênico (B5)	1,5
Piridoxina (B6)	0,9
Tiamina (B1)	0,3
Biotina (B7)	0,03
Minerais	
K, P, Mg, Ca, S, Na, Fe,	8

(Adaptado de Li et al., 2010)

É importante salientar que a avaliação prévia dos componentes de fontes alternativas é fundamental para que sejam feitos possíveis ajustes como de pH, salinidade, viscosidade, entre outros. Além disso, o barateamento da fase de *upstream* utilizando substratos residuais pode ocasionar aumento no custo ou inviabilidade dos processos de purificação do ácido láctico (*downstream*).

Diversos são os fatores que influenciam a síntese de ácido láctico por bactérias lácticas (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000), como por exemplo, pH (GUYOT, CALDERON e MORLON-GUYOT, 2000; MUSSATTO et al., 2008; ANDERSEN et al., 2009), temperatura (TANGO e GHALY, 1999b), aeração (OHARA e YAHATA, 1996; TANGO e GHALY, 1999a; OKINO et al., 2008) fontes de carbono (BULUT, ELIBOL e OZER, 2004), fontes de nitrogênio (ARASARATNAM, SENTHURAN e BALASUBRAMANIAM, 1996; NANCIB et al., 2001, 2005; FIGUEIREDO e PASSOS, 2003; ALTAF et al., 2007b), sais minerais (HAULY, 2001) e vitaminas (YOO et al., 1996; XU et al., 2008).

Oh et al. (2005) apresentaram o uso de produtos agrícolas na produção de ácido láctico em cultivo de *Enterococcus faecalis*. No estudo, milho, trigo e cevada foram hidrolisados por enzimas amilolíticas para servirem como fonte de carbono para o micro-organismo. Os melhores resultados foram obtidos quando houve uma mistura de farinha de trigo hidrolisada (200,0 g/L), água de maceração de milho (15,0 g/L) e extrato de levedura (15,0 g/L), tendo uma produtividade de 5,36 g.L⁻¹.h⁻¹ de ácido láctico. Quando se compara esse cultivo com o cultivo em farinha de trigo hidrolisada pura observou-se um aumento de 106 % na produção do ácido láctico. Esse estudo evidencia a importância do tratamento enzimático de fontes vegetais para a liberação de açúcares, porém, esse processo ainda apresenta custo elevado e representa a fase mais cara do

processo de produção (AKERBERG e ZACCHI, 2000). O próprio metabolismo do micro-organismo ou enzimas associados podem hidrolisar fontes de polissacarídeos e disponibilizar açúcares para a fermentação, esse processo é conhecido como “sacarificação e fermentação simultâneas” (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Essa técnica já foi aplicada para produção de ácido láctico por diversos autores (ANURADHA, SURESH e VENKATESH, 1999; STENBERG, GALBEA e ZACCHI, 2000; MOLDES, ALONSO e PARAJO, 2001; RIVAS et al., 2004; TANAKA et al., 2006; MARQUES et al., 2008, MAAS et al., 2008). Para tornar o processo de SSF mais econômico pode-se usar resíduos de material lignocelulósico como fonte de carbono em um meio com o micro-organismo complementado de enzimas selecionadas para degradação desse material, que está presente na grande maioria dos resíduos agrícolas e agro-industriais. O processo de SSF deve manter condições compatíveis para a ação enzimática e fermentativa, como pH e temperatura. Mais detalhes do uso da técnica de SSF estão detalhados em uma importante revisão publicada por John et al. (2007b).

Outra vantagem do processo de SSF é a redução da alta concentração inicial de açúcares, que é usada normalmente e ocasiona um desequilíbrio osmótico. A sacarificação libera aos poucos os açúcares para a fermentação, conferindo uma maior estabilidade do meio de cultivo para as bactérias lácticas (STENBERG, GALBEA, ZACCHI, 2000). Tanaka et al. (2006) obtiveram o isômero D-ácido láctico em cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* usando a sobra de arroz de uma indústria de óleo de arroz no Japão. Devido à presença de celulose e amido, houve o uso conjunto de amilases e celulasas no cultivo, constituindo em sistema de SSF. A produção foi de 28 g/L de ácido láctico sendo que 95 % era constituído de isômero D.

Objetivando o aproveitamento de resíduos, Sakai, Fujii e Chukeatirote (2006), cultivaram *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* em resíduo alimentício de uma cidade do Japão. A intenção do estudo foi cultivar bactérias produtoras do L-ácido láctico. Porém, a espécie *Lactobacillus plantarum*, encontrada normalmente em resíduos alimentícios, prevaleceu e prejudicou a pureza ótica do ácido láctico produzido, já que esta produz ambos os isômeros. Uma solução proposta pelos autores é o cultivo de espécies que tem condições ótimas de produção e de sobrevivência diferentes da dominante *L. plantarum*, sendo necessário para isso um ajuste nas condições físico-químicas no meio de modo a inibir a espécie selvagem e favorecer a espécie inoculada. O aproveitamento de água de lavagem de peixe e água de lavagem de amido para produção de ácido láctico foi realizado por Huang et al. (2008).

Diversos são os estudos para otimização de meios de cultivo para produção de ácido láctico utilizando planejamento experimental como “*screening* de variáveis” (*Plackett-Burman*) (NAVEENA et al., 2005) e delineamento composto central (LIMA et al., 2010). Estudos estatísticos de *Plackett-Burman* são importantes para a avaliação simultânea de diversos parâmetros do meio como a fonte de nitrogênio, pH, temperatura e tempo de fermentação.

3.3 Imobilização de células

As técnicas de imobilização na microbiologia começaram com a imobilização de enzimas (BERNFELD e WAN, 1963), posteriormente, houve a adaptação para aplicação em células inteiras, sendo definida como o confinamento de células vivas a uma região definida com preservação de atividade celular, com troca de substratos e produtos do suporte para o meio (WILLAERT, 2007). O processo de imobilização pode ocorrer de maneira natural, como a formação de biofilmes, que são ocasionados pela liberação de exopolissacarídeos por algumas espécies de bactérias (BICKERSTAFF, 1997). São exemplos de biofilme formados naturalmente: a cárie pela bactéria *Streptococcus mutans* (BECKER et al., 2002), e reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) na etapa anaeróbica do tratamento de água (HAMER, 1990).





A imobilização de células apresenta-se como uma alternativa à imobilização de enzimas, pois não requer etapas de extração, isolamento e purificação, limitando-se à obtenção de biomassa bruta, por isso apresenta um custo menor. Porém, quando se imobiliza todo o maquinário enzimático que há no interior das células, há o risco da ocorrência de reações indesejadas, inerentes do metabolismo microbiano, o que não ocorre na catálise com enzimas imobilizadas, onde a reação é seletiva (NAJAFPOUR, 2007; MAHMOUD e HELMY 2009). A célula imobilizada tem conservada a estrutura interna e o microambiente natural das enzimas, podendo assim ter atividade por longo tempo, devido a essa manutenção do sistema enzimático (KLEIN e VORLOP, 1987). Hamer (1990) afirma que a imobilização favorece a estabilidade do sistema celular, porém com certas alterações fisiológicas, mesmo quando a célula não tem potencial para crescimento. Nesse caso, a maquinaria enzimática da célula funciona enquanto houver substrato e condições físico-químicas que a mantém estável, independentemente da viabilidade celular.

Para que o processo de imobilização de células seja efetivo, o suporte deve ser estável (resistente a diversos ciclos de fermentação dado o reuso dos *pellets*), reutilizável, atóxico, inerte, ou seja, não metabolizado pelo micro-organismo, e economicamente viável (ZHU, 2007). Além disso, o processo de imobilização deve ocorrer em condições brandas, seguras, e não ocasionar danos à célula, preservando a viabilidade da mesma. Para a imobilização, deve evitar substâncias tóxicas para as células ou para contaminação do produto final. Além disso, o processo deve ser simples e evitar mão de obra ou processos caros ou demorados, e principalmente, deve preservar as enzimas que estão presentes na célula (BICKERSTAFF, 1997; ZHU, 2007; COVIZZI, 2007).

A divisão dos tipos de imobilização é feita de maneira diferente por alguns autores. Zhu (2007) identifica dois tipos principais: o aprisionamento e a ligação em suporte. Outros autores apresentam além desses, o método de ligação cruzada (CHIBATA et al., 1986; NAJAFPOUR, 2007). Também se encontra a divisão dos tipos de imobilização em cinco métodos: Adsorção, ligação covalente em suporte, aprisionamento, encapsulação e ligação cruzada (BICKERSTAFF, 1997). Utiliza-se aqui a divisão de quatro métodos de imobilização de células: (1) adsorção, incluindo aqui as ligações em suporte ativado (ligação covalente em suporte); (2) ligação cruzada; (3) encapsulação e (4) aprisionamento (Tabela 6). Vale ressaltar que não existe um método ideal para imobilização de células, a seleção do método depende do objetivo de cada trabalho (BICKERSTAFF, 1997).

O método de imobilização de células por adsorção, também conhecido como ligação em superfície, ocorre quando o micro-organismo se liga a um suporte insolúvel por interações químicas do tipo van der Waals ou ligações de H entre moléculas presentes na superfície celular com a superfície do material, além de interações por hidrofobicidade, pela rugosidade da superfície e por polissacarídeos excretados pelas células (ZHU, 2007). A ligação da célula ao suporte pode ser induzida por uma prévia ativação do suporte, por agentes químicos (agentes de acoplamento) como α -aminopropiltriétoxissilano, isocianato, acrilato de hidroxietil, periodato de sódio e cloreto cianúrico (ZHU, 2007), constituindo assim interações covalentes entre compostos localizados na membrana externa do micro-organismo e o suporte ativado (SENTHURAN et al., 1997). A ligação em suporte ativado é o método mais utilizado para imobilização de enzimas (KLEIN e VORLOP, 1987).

Tabela 6. Tipos de imobilização de células

Imobilização	Esquema	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Adsorção		Processo natural ou artificial, reversível ou irreversível de ligação das células a um suporte insolúvel.	Processo natural e simples; diversos materiais podem ser utilizados como suporte.	Ligações por interações fracas; variações no meio podem lixiviar as células na superfície.
Ligação cruzada		Floculação natural ou artificial, interação da superfície das células.	Alta densidade de células decantadas facilita o processo de purificação.	Reagentes químicos podem causar danos às células.
Encapsulação		Processo artificial de retenção de células em membrana com interior líquido.	Processo não prejudicial às células; acúmulo de biomassa no interior do suporte.	Baixa resistência mecânica.
Aprisionamento		Processo artificial de retenção de células em membrana gelatinosa, com interior sólido.	Processo não prejudicial às células, matriz resistente e sólida; alta densidade de células.	Ação de agentes quelantes; limitações de transferência de massa.

Figuras adaptadas de Pilkington et al. (1998) In: Covizzi et al. (2007).

As vantagens do método de adsorção são a facilidade do preparo - sendo necessária apenas a adição do meio com as células no suporte -, a estabilidade na fisiologia do micro-organismo, além de representar um processo natural para a obtenção de alta densidade celular. Além disso, inúmeros suportes podem ser utilizados. No preparo de um suporte ativado é necessária a verificação da toxicidade desses reagentes para com as células. Nesse tipo de imobilização, variações no meio podem comprometer a fixação das células na superfície, podendo ocorrer o desligamento das células da superfície e saída de células para o meio (KLEIN e VORLOP, 1987, ZHU, 2007).

O segundo método de imobilização de células é a floculação artificial, também conhecido como ligação cruzada ou *crosslink*. Nesse método ocorre um estímulo ao fenômeno natural de floculação de células, por alguns agentes químicos que proporcionam a interação entre as células, como a quitosana e outros polieletrólitos (CHIBATA e TOSA, 1981; CHIBATA et al., 1986; KLEIN e VORLOP, 1987). A maior vantagem desse método é a formação de pequenos aglomerados de células, permitindo a difusão de substâncias do meio e facilitando o processo de remoção de células por decantação (NAJAPFOUR, 2007). Esse mesmo método é comumente utilizado para imobilização de enzimas, sendo o glutaraldeído um dos agentes químicos mais utilizados, que causa a ligação cruzada entre moléculas presentes na parede das células (OLIVANETO e MENÃO, 2009). Porém, o glutaraldeído é tóxico para as células, preservando apenas as enzimas e parte do conteúdo intracelular.

Já o método de aprisionamento, que é o mais usado atualmente, se baseia no confinamento das células em matriz gelificada. As principais matrizes utilizadas para imobilização de células por aprisionamento são compostas de géis hidrofílicos com alta massa molar (RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999). As mais comumente utilizadas são o alginato de cálcio, resina, polipropileno (PP), polivinil álcoois, poliacrilamida, pectina, agar, carragenato, colágeno e gelatina de origem animal e vegetal (TOMASKA et al., 1995). O processo de gelificação do alginato é realizado por cloreto de cálcio (CaCl_2) como mostrado na Figura 3. Estudos na área de preservação e estabilidade de géis são necessários para a adequação de processos de imobilização para escalas industriais. O alginato e o carragenato são as matrizes poliméricas mais utilizadas na imobilização por aprisionamento e ambos são derivados de material da parede de algas (KLEIN e VORLOP, 1987).

O alginato é um polissacarídeo encontrado na parede celular de algas marrons na forma de sais de Na, Ca ou K. A estrutura molecular do alginato é constituída dos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), unidos por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$, sendo que a porcentagem de cada ácido na cadeia do polímero determina as propriedades físico-químicas do alginato (Figura 3). Quanto maior a proporção do ácido α -L-gulurônico (G), maior é a viscosidade do alginato (ORIVE et al., 2004)

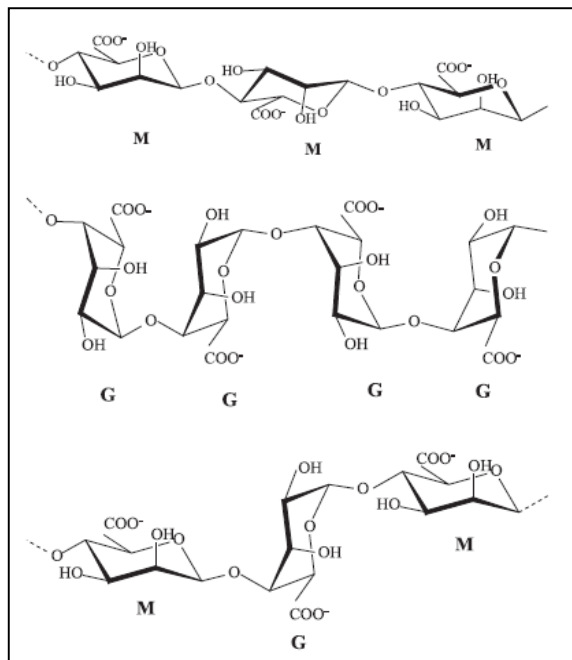


Figura 3. Possíveis combinações para formação da cadeia polimérica do alginato (GARCIA-CRUZ, FOGGETTI, e SILVA, 2008).

Alginato de sódio é a forma comercial mais comum do alginato, que constitui uma molécula com característica polieletrólítica quando dissolvido em água. Assim como todos os sais polieletrólíticos, o alginato de sódio se mantém na forma ionizada quando dissolvido em água, com as cargas OH⁻ expostas. Essas cargas, ao longo da fórmula do polímero, formam uma estrutura conformacional que se altera na presença de sais inorgânicos. Uma solução de alginato em presença de cátions divalentes muda sua conformação e forma um gel. A estabilidade do gel de alginato é crescente quando utilize-se soluções de Ba²⁺, Sr²⁺, Ca²⁺, e é menos efetiva na presença de Mg²⁺. Esse gel formado tem estrutura denominada modelo caixa de ovo (Figura 4) (MORRIS, et al, 1980 In: PAMIES et al., 2010). Íons Cu²⁺ e Zn²⁺ também podem estabelecer a gelificação do alginato (WANG e SPENCER, 1998).

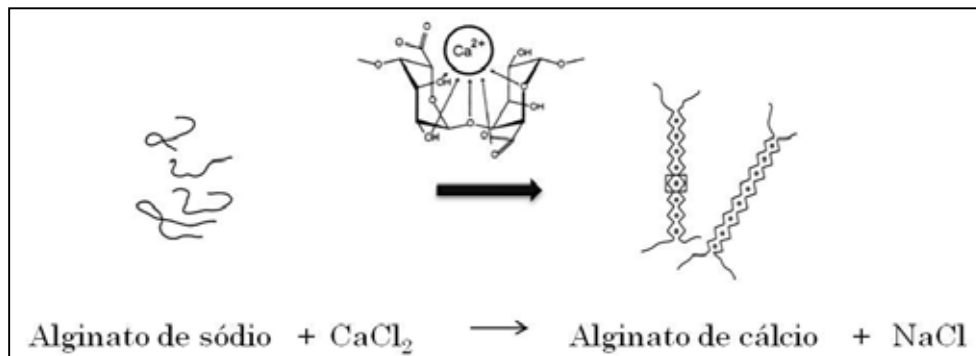


Figura 4. Processo de gelificação do alginato de sódio em alginato de cálcio.

O monômero G (alginato) possui maior afinidade ao Ca^{2+} , conseqüentemente, a resistência mecânica dos *pellets* formados por alginato com maior proporção de blocos G será maior, quando comparado a um alginato que tenha maior conteúdo de grupos M, além de melhor resistência à ação de agentes químicos quelantes como o fosfato. A suplementação do meio de cultivo com Ca^{2+} é requerida quando agentes quelantes estão presentes no meio (GIVRY, PREVOT e DUCHIRON, 2008). A alteração de volume do suporte com as células imobilizadas indica a baixa densidade de interação dos resíduos de alginato com Ca^{2+} (WANG e SPENCER, 1997).

Diversas são as variáveis que interferem no resultado da imobilização por aprisionamento, como a concentração e viscosidade do alginato, a proporção de blocos M e G no alginato, massa molar da molécula de alginato, pH, concentração de CaCl_2 , proporção células/matriz e tamanho do *pellet* (FRASER e BICKERSTAFF 1997; ZHU, 2007).

O método de encapsulação usa técnica similar ao aprisionamento, porém a biomassa é misturada à solução de CaCl_2 e depois gotejada em solução de alginato com Tween 80 (DEMBCZYNSKI e JANKOWSKI 2002). Cria-se um interior líquido e uma cápsula gelatinosa que impede a saída das células. Essa é a grande diferença da encapsulação e aprisionamento, a criação de um interior líquido, e não gelatinoso, sendo possível o crescimento e a manutenção das células em meio líquido (KRASAEKOOPT et al., 2003). Células encapsuladas são usadas na fabricação de produtos probióticos, como a inoculação de bactérias da flora intestinal humana, *Lactobacillus acidophilus*. Essas células não são destruídas nem perdem suas características quando submetidas ao baixo pH do suco gástrico estômago (KIM et al., 2008). Dentro do método de encapsulação existe a técnica da microencapsulação, onde há a encapsulação de poucas células

ou até mesmo uma única célula, com o intuito de proteger e manter a viabilidade da célula ao passar por um meio externo desfavorável (MORTAZAVIAN, RAZAVI e EHSANI, 2007).

O processo de imobilização pode ser reversível como no caso de adsorção em suporte por ligações iônicas, ligações por afinidade, ligações metálicas (quelação) e ligações dissulfeto; ou irreversível, como na adsorção por ligação covalente em suporte ativado, na floculação artificial por ligação cruzada, no aprisionamento e na encapsulação.

Em processos fermentativos a imobilização confere diversas vantagens quando comparada ao sistema de células livres como apresentado na Tabela 7. A imobilização propicia diversos efeitos nas bactérias lácticas, como a maior resistência às altas concentrações salinas, que são formados nos processos tradicionais de extração do ácido láctico do caldo fermentativo, e a resistência à penicilina (CHAMPAGNE, LACROIX e SODINI-GALLOT, 1994). Cachon Antérieux e Diviès (1998) constataram a prevenção da perda de plasmídeos quando utilizaram *Lactococcus lactis* imobilizado em alginato de cálcio em meio MRS. Todas essas vantagens vêm atraindo diversos estudos na área de imobilização de células para produção de ácido láctico (TANGO e GHALY, 2002; KOURKOUTAS et al., 2005; IDRIS e SUZANA, 2006; PANESAR et al., 2007a; GANGULY, DWIVEDI e SINGH, 2007).

Algumas limitações das técnicas de imobilização são: o prejuízo à célula durante o processo de imobilização, resistência mecânica da matriz ao crescimento celular, devido às altas densidades de células (até 30 % m/v), formação de gases, presença de agentes quelantes de cálcio no meio, como fosfato e citrato quando requeridos no meio de cultivo, transferência de massa (menor disponibilização de oxigênio e nutrientes), acúmulo de substâncias tóxicas na matriz, adaptação de reatores e novo manejo dos equipamentos, limitação do uso para metabólitos extracelulares, durabilidade da matriz, comprometimento da estabilidade do suporte devido às variações das condições físico-químicas do meio, como pH e temperatura e o custo adicional (NAJAPFOUR, 2007, RAO et al., 2008a).

Tabela 7. Vantagens obtidas com células imobilizadas em fermentações

Vantagens	Referência
Alta densidade de células	TANGO e GHALY (2002)
Maior estabilidade das células	GÖKSUNGUR, GÜNDÜZ e HARSA (2005)
Menor tamanho do fermentador	TANGO e GHALY (2002)
Maior resistência às condições desfavoráveis	DOLEYRES e LACROIX (2005)
Proteção contra inibição por substrato e produto	NAJAFPOUR (2007)
Menor contaminação	WILLAERT (2007)
Reuso das células	KOURKOUTAS et al. (2005)
Maior facilidade na obtenção do produto	GANGULY, DWIVEDI e SINGH (2007)
Melhores condições para cultivo contínuo	WILLAERT (2007)
Aumento na produtividade	JUNTER et al. (2002)
Aumento da vida útil do sistema*	WILLAERT (2007)
Retenção ao sistema de rolamento de plasmídeo	CACHON, ANTÉRIEUX e DIVIÈS (1998)
Melhoras no processo de conservação	WILLAERT (2007)
Maior estabilidade para a conservação	TOMASKA et al. (1995)
Aumento da disponibilidade do substrato**	WILLAERT (2007)
Maior taxa de consumo de substrato	GIVRY, PREVOT e DUCHIRON, (2008)
Aumento na conversão de substratos	PANESAR et al. (2007a)

*devido ao reuso.

** Transformações na parede deixam a parede da célula mais permeável para a entrada de substratos.

A imobilização de células cria algumas modificações químicas e físicas nas células, o que pode mudar o metabolismo e algumas propriedades bioquímicas das células, como demonstrado na tabela 7. A transferência de massa e a concentração de substrato no microambiente das células imobilizadas podem interferir na fisiologia das células.

As células imobilizadas no suporte se localizam principalmente na periferia, onde há maior troca de nutrientes, e células em estado de *starving* onde não há suprimento de nutrientes (KLINKENBERG et al., 2001). Nas células em *starving* a pressão mecânica exercida pelo suporte causa a perda de água e o tamanho da célula fica reduzido. Já as células na periferia têm a forma conservada, porém, existe um efeito negativo no crescimento celular quando comparado ao cultivo com células livres, devido à pressão exercida pelo suporte (KAREL, LIBICKI, e ROBERTSON, 1990).

Mudanças na fisiologia das células são evidentes quando se utiliza a imobilização (Tabela 8). O contato das células com superfícies porosas pode ocasionar a redução na tensão da parede (KAREL, LIBICKI, e ROBERTSON, 1990, ZHU, 2007, PETROV, PETROV e BESCHKOV, 2007). No caso de imobilização por adesão e conseqüente formação de biofilme, diversas

bactérias apresentam um acréscimo nas taxas metabólicas, principalmente em baixas concentrações de nutrientes.

Tabela 8. Comparação da fisiologia e do processo no cultivo de células imobilizadas e livres

	Fermentação com células imobilizadas	Fermentação com células livres
Densidade de células	- Maior densidade de células no sistema	- Menor densidade de células no sistema
Conversão de substrato	- Conversão mais rápida pela ausência da fase de crescimento*	- Conversão mais lenta pela necessidade de crescimento para produção
Produção	- Possibilidade de fermentação com alta concentração de substrato - Baixa inibição por produto	- Inibição por altas concentrações de substrato - Inibição por produto
Processo	- Ausência de saída de células em fermentação contínua - Fermentador de menor tamanho - Fácil separação do produto - Possibilidade de reuso de células	- Lavagem de células na fermentação contínua (<i>wash-out</i>) - Fermentadores maiores - Centrifugação para obtenção do produto - Reuso de células pouco eficiente

* A fase de crescimento ocorre previamente, para obtenção de biomassa para imobilização.
Adaptado de Junter et al. (2002) e Zhu (2007).

Com relação ao crescimento celular, a imobilização pode ocasionar o aumento, a redução ou pode não interferir nesse fator. Esses efeitos dependem do tipo de imobilização, do micro-organismo e do meio de cultivo utilizado (JUNTER et al., 2002).

Alguns cultivos com células imobilizadas são feitos de modo a controlar e evitar uma excessiva produção de biomassa para que haja um sistema de biocatálise preservado que seja capaz de converter um substrato exótico em um produto de interesse (MILAGRE et al., 2007).

Em matriz de alginato de sódio, Idris e Suzana (2006) estudaram a influência da concentração de alginato de sódio e do diâmetro da matriz na produção de ácido lático utilizando *L. delbrueckii*. Além disso, a matriz com menor concentração de alginato proporciona maior espaço para o crescimento e conseqüente maior produção devido à liberação de ácido lático na fase de crescimento celular. Foi constatada maior produção na concentração de 2% de alginato e diâmetro de 1 mm. A concentração de alginato e o diâmetro da matriz influenciam na difusão de nutrientes para a célula bem como a liberação de produtos (SYLDATK et al., 1990).

A pectina pode ser usada como matriz para a imobilização por aprisionamento e apresenta um custo baixo por se tratar de um subproduto da indústria cítrica, além de ser extraída de frutas como a maçã (KURILLOVA et al., 1992). Estudos feitos por Panesar et al. (2007a) comprovam a

eficiência dessa matriz para produção de ácido láctico por *L. casei* utilizando como fonte de carbono o soro de queijo. O sistema se manteve estável por 16 ciclos. Após esse período ocorre a degradação da matriz e subsequente decréscimo na conversão da lactose em ácido láctico. Nesse estudo também foi observado um aumento na conversão da lactose para ácido láctico quando se comparou células imobilizadas e células livres no sistema.

Géis de pectato de cálcio e alginato de cálcio foram usados por Tomaska et al. (1995) para imobilização da levedura *Kluyveromyces marxianus* para conversão de lactose em glicose e galactose. O gel de pectato de sódio apresenta menor sensibilidade a íons e agentes químicos presentes no caldo fermentativo como fosfato, citrato, gluconato, lactato, altas concentrações salinas como excesso de sódio, potássio e íons de amônio (BERGER e RÜHLEMANN, 2004).

Existem três estágios metabólicos em um sistema de células imobilizadas por aprisionamento: (1) crescimento de células viáveis e ativas, (2) células não viáveis, porém ativas, e (3) morte celular, com células não viáveis e inativas (HAMER, 1990). Essa teoria foi observada por Dembczynski e Jankowski (2002) em um cultivo de *Lactobacillus rhamnosus*, onde houve, em uma primeira fase o crescimento celular e acidificação, seguida de uma segunda etapa, com a parada do crescimento, porém manutenção da acidificação, demonstrando que as células ainda estavam ativas; já na terceira fase houve a inativação total das células e a acidificação cessou. Diversos são os estudos de produção de ácido láctico utilizando a técnica de imobilização de células.

Alguns estudos na literatura avaliam a produção de ácido láctico por bactérias lácticas imobilizadas, utilizando planejamento experimental (GARBAYO et al., 2004; GIVRY, PREVOT e DUCHIRON, 2008; MANEEBOON et al., 2010).

3.3.1. Propriedades e limitações da técnica de aprisionamento

3.3.1.1 Modificações do suporte para otimização do aprisionamento

Diversos estudos foram elaborados com a utilização de polímeros orgânicos e inorgânicos que reagem com o alginato e melhoram a estrutura do suporte de imobilização por aprisionamento, para minimizar a saída de células do suporte, como a quitosana (ZHOU, 1998; KLINKENBERG, 2001; GÖKSUNGUR, GÜNDÜZ e HARSA, 2005), a poli-L-lisina

(CHAMPAGNE et al., 1992, MANSFELD e DAUTZENBERG 1996), polivinilalcool (PVA) (QIN et al., 2010), polietilenoimina (PEI) (KAWAGUTI et al., 2006, TROTMAN et al., 2007, OLIVA-NETO e MENÃO, 2009), poliacrilamida (PAA) (PETROV, YANKOV e BESCHKOV, 2005), polietilenoglicol (PGA) (SIRISANSANEEYAKUL et al., 2007) e poliuretano (ORY et al., 2004). A estabilização do alginato foi realizada com a quitosana nos experimentos de Göksungur, Gündüz e Harsa (2005) para a produção de ácido lático a partir de soro de queijo.

Outra substância utilizada para estabilização do alginato para imobilização por aprisionamento ou encapsulação é o polímero polietilenoimina (PEI). Nesse caso, a matriz de alginato com as cargas negativas livres (OH^-) reage com o polímero PEI, que possui grupamentos de cargas positivas (NH_2^+) livres. A reação iônica faz com que o *pellet* tenha o diâmetro reduzido pela metade e tenha alta resistência mecânica. Substâncias que possibilitam ligações cruzadas, como o glutaraldeído podem ser colocadas após a interação iônica entre o alginato e o PEI, para aumentar a estabilidade do suporte (MANSFELD e DAUTZENBERG, 1997).

Rao et al. (2008a) apresentaram uma avaliação na estabilidade de matriz de alginato de sódio, alginato modificado com ácido succínico e carragenato na produção de L-ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* imobilizado. A imobilização com gel de alginato “succinilado” apresentou maior rendimento, estabilidade e durabilidade sob condições ácidas, além de menor produção de subprodutos metabólicos como o ácido acético e ácido propanóico. As moléculas de ácido succínico presentes nas cadeias do alginato conferem maior quantidade de grupos carboxilas no interior do suporte, atuando com ação tamponante no meio interno dos *pellets*. Outra derivatização do alginato feita por Rao et al. (2008b, 2009a) foi com ácido palmítico, para aumento da hidrofobicidade no interior do suporte. Cria-se nos dois casos um microambiente favorável às células bacterianas para produção de ácido lático.

3.3.1.2. Densidade e distribuição de células no suporte

Um dos principais benefícios da utilização de células imobilizadas é a alta densidade de células que se obtém no processo, devido à centrifugação da biomassa e imobilização.

A medida de biomassa de células imobilizadas por aprisionamento pode ser feita de acordo com diferentes metodologias. Bréant, Jézéquel e Lebeau (2002) utilizaram a relação de absorvância e peso de acordo com a confecção de uma curva de calibração. Nesse caso uma

massa estipulada de 0,3 g de *pellets* é coletada, e dissolvida em 2 mL de EDTA, para que possa ser realizada a análise por absorvância. Com relação às células livres, o meio de cultivo foi coletado e mediu-se a absorvância, que foi igualmente comparada à massa com o auxílio de uma curva de calibração. Também utilizando a técnica de absorvância, Petrov, Yankov e Beschkov (2005) realizaram as medidas de biomassa de *Lactobacillus rhamnosus* imobilizado em poliacrilamida para a produção de ácido láctico. Há estudos que realizam a contagem direta de células ao microscópio após a dissolução dos *pellets* (BOROSS, PAPP e SZAJÁNI, 1990; PAJIC-LIJAKOVI et al., 2007; GIVRY, PREVOT e DUCHIRON, 2008). Medidas de biomassa imobilizada por extração e quantificação de DNA foram feitas por Bergmaier, Champagne e Lacroix (2003, 2005) em estudos de produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus rhamnosus*.

Associadas às medidas de biomassa em grama ou em número de células, medidas de viabilidade celular são necessárias no estudo de células imobilizadas, e são expressas em UFC (unidades formadoras de colônia). Esses parâmetros de atividade celular são obtidos por plaqueamento, sendo expressos de algumas maneiras diferentes, como UFC/mL de suporte (BRIASCO, BARBOTIN, e THOMAS, 1990; MANSFELD e DAUTZENBERG, 1996; BRÉANT, JÉZÉQUEL e LEBEAU, 2002; DEMBCZYNSKI e JANKOWSKI, 2002), UFC/g de suporte (DENKOVA, KRASTANOV e MURGOV, 2004; GÖKSUNGUR, GÜNDÜZ e HARSA, 2005) e UFC/mL de meio de cultivo. As medidas feitas em UFC correspondem a real atividade de células no sistema imobilizado, por isso é o mais adequado para análise de conteúdo celular no interior dos *pellets*. Outras técnicas para medidas de atividade e viabilidade celular dentro do suporte de aprisionamento são: microscopia eletrônica, técnicas de coloração de RNA, coloração de enzimas ativas em secção do suporte e coloração de anticorpos. Com essas medidas podem-se avaliar diversos parâmetros como crescimento celular, degradação da biomassa no suporte, distribuição, movimento e migração de células dentro do suporte.

Altas densidades de células imobilizadas proporcionam um contato maior entre as células e um microambiente favorável e mecanicamente estável ao redor nas cadeias de alginato de cálcio (WILLAERT, 2007). Porém, a porcentagem de células a ser imobilizada deve ser estudada para que não se passe de um limite e ocorra saída de células para o meio externo. A concentração ideal de células a ser imobilizada depende do tipo de célula e do metabolismo, pois em células com baixo crescimento há a possibilidade de constituir a imobilização com maior concentração

de células (CHAMPAGNE, BAILLARGEON-CÔTÉ e GOULET 1989; POWELL 1990). Já quando o micro-organismo tem crescimento acelerado deve-se inocular uma quantidade menor de células, ou então inocular as células na fase final do crescimento, para que não ocorra muito crescimento e conseqüente saída de células (GÖKSUNGUR e GÜVENÇ, 1999).

Champagne et al. (1992) testaram diversas concentrações iniciais de células no alginato, e verificaram que entre $1,10^9$ a $2,10^{10}$ UFC/g de suporte não houve diferença significativa no metabolismo.

O crescimento das células aprisionadas em matriz polimérica ocorre na forma de colônias em pequenas cavidades, sendo mais intenso na periferia do suporte (AUDET, PAQUIN e LACROIX, 1988; BOROSS, PAPP e SZAJÁNI, 1990; KAREL, LIBICKI, e ROBERTSON, 1990). A força exercida pelo crescimento e a força de cisalhamento resultante da agitação do cultivo faz com que haja saída de células das cavidades onde ocorre o crescimento (ZHOU, 1998). Em um estudo conduzido por Boross, Papp e Szajáni (1990) também foi demonstrado que a maior concentração de células imobilizadas ocorre na periferia dos *pellets*, onde há maior difusão de nutrientes, e é nessa região periférica que pode se formar colônias e ocorrer a saída de células. Nesse sentido Champagne et al. (1992) realizaram o tratamento dos *pellets* de modo a inviabilizar as células da periferia, para evitar o escape para o meio de cultivo.

A eficiência do suporte no processo de imobilização de células pode ser avaliada pela capacidade da matriz em alojar a maior quantidade de células viáveis, sem limitar a transferência de massa entre o micro-organismo e o meio de cultivo (COVIZZI et al., 2007).

3.3.1.3. Saída de células

A saída de células do suporte na imobilização deve ser monitorada para que não haja células no meio externo, e assim facilitar o processo de purificação do produto de interesse do caldo fermentado.

A perda de biomassa e viabilidade das células dentro do suporte ocorre por diversos motivos como a morte celular, lise da parede celular, degradação da matriz, crescimento em biomassa, porosidade do suporte, presença de agentes quelantes no meio e resistência mecânica do suporte (FRASER e BICKERSTAFF, 1997). O material das células mortas pode servir para o

crescimento das células viáveis, principalmente na periferia do suporte (KAREL, LIBICKI, e ROBERTSON, 1990; BRITO et al., 1990).

A resistência mecânica da matriz é fundamental para que a saída de células seja controlada. Fatores como o tempo de gelificação, a concentração de CaCl_2 , a composição do alginato, e o grau de polimerização da matriz afetam a resistência mecânica do suporte (TAKEI et al., 2009).

Diversos são os fatores que influenciam na saída de células de um sistema de imobilização por aprisionamento, como a carga de células no sistema (NUNEZ et al., 1990), diâmetro do *pellet* (AUDET, PAQUIN e LACROIX, 1989), pH (KLINKENBERG et al., 2001) e o número de reuso de células quando se usa o sistema de batelada seqüencial (BRÉANT, JÉZÉQUEL e LEBEAU 2002). Alguns estudos mostram alternativas para minimizar o problema de saída de células da matriz como a reação com substâncias que reagem com o alginato, e aumentam a resistência dos *pellets*, como apresentado no final do item 3.3.

Em toda fermentação láctica com células aprisionadas ocorre saída de células para o meio externo, em diferentes proporções, porém, as células que saem não afetam a produção do ácido láctico como demonstrado por Göksungur e Gunserç (1999) no cultivo de *L. delbrueckii* em que se utilizou 10 bateladas seqüenciais.

Considerando a saída de células do suporte, Norton, Lacroix e Vuilleumard (1994) planejaram um reator em dois estágios para a produção de ácido láctico a partir de células imobilizadas em k-carragenato. O primeiro reator contém células imobilizadas, já o segundo, contém células livres provenientes do lixiviamento do primeiro reator, para o consumo do açúcar residual. Os autores obtiveram resultados satisfatórios mesmo com a redução de extrato de levedura no meio, o que torna a produção menos onerosa. Petrov, Yankov e Beschkov (2005) utilizaram aprisionamento em poliacrilamida (AA) para a produção de L(+) ácido láctico, e concluíram que o suporte serviu de doador de células para o meio externo e a conversão de ácido láctico pelas células livres no sistema se torna mais intensa conforme o reuso do suporte.

3.3.1.4. Transferência de massa e difusão no suporte

Como visto, o crescimento das células imobilizadas por aprisionamento ocorre mais intensamente na superfície do mesmo devido à disponibilização de nutrientes e oxigênio. Os

fenômenos de transporte de massa e difusão de substratos para as células constituem fatores importantes na técnica de imobilização por aprisionamento e tem efeito direto sobre a conversão do substrato no produto de interesse (PETROV, YANKOV e BESCHKOV 2005; WILLAERT, 2007). A transferência de massa também está relacionada com a densidade de células imobilizadas no suporte, concentração do substrato e o tamanho do agregado celular (KAREL, LIBICKI, e ROBERTSON, 1990).

Dois fenômenos de transporte são mais importantes quando se utiliza imobilização por aprisionamento. O primeiro é a transferência do substrato dissolvido no meio externo para a superfície do “biocatalizador”, e o segundo é a simultânea difusão e reação do substrato para dentro do suporte. (KATHIRAVAN et al., 2010). Sendo assim, um dos fatores que determina a transferência de massa é o diâmetro dos *pellets* formados no aprisionamento de células. Os *pellets* com menor diâmetro permitem melhor difusão do substrato até o interior do suporte, além disso, consegue-se maior número de *pellets* com o mesmo volume da mistura alginato/células, tendo como principal resultado uma área superficial maior (PANESAR et al., 2007b). O mesmo ocorre na etapa de gelificação do alginato, onde os íons Ca^{2+} na solução devem alcançar o interior do suporte de alginato para que a gelificação seja efetiva por todo o suporte. Na imobilização por aprisionamento, o diâmetro dos *pellets* é determinado pelo diâmetro interno do extrusor e pela vazão de gotejamento da mistura alginato/células, variando geralmente entre 1,0 e 4,0 mm. O consumo de substrato pelas células imobilizadas cria uma diferença de concentração dos nutrientes, que garante que esses continuem sendo fornecidos para o interior do suporte. O mesmo ocorre com o ácido lático produzido no interior do suporte, que acaba saindo do mesmo e dissolve no meio externo.

Rouxhet e Mozes (1990) prepararam um modelo matemático de consumo de substrato por células imobilizadas, e Jalili et al. (2010) realizaram estudos cinéticos de *Bifidobacterium animalis* imobilizado em K-carragenato.

Na produção de ácido lático por células imobilizadas em alginato, o diâmetro dos *pellets* entre 2,0 – 2,4 mm proporcionou maior produção de ácido lático quando comparado à produção utilizando *pellets* com 3,0 mm. Esse estudo foi conduzido por Göksungur e Güvenç (1999) utilizando a espécie *L. delbrueckii* e melão de beterraba como fonte de carbono. *Pellets* com menor diâmetro apresentaram maior estabilidade quando comparado a *pellets* com maior diâmetro (GIVRY, PREVOT e DUCHIRON, 2008; KATHIRAVAN et al., 2010).

3.3.1.5. Reuso do suporte com células imobilizadas

Alguns estudos de produção de ácido láctico por células imobilizadas por aprisionamento em alginato mostram reuso do suporte carregado de células em bateladas seqüenciais. Essa é uma grande vantagem do uso de células imobilizadas.

Petrov, Yankov e Beschkov (2005) estudaram a produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* imobilizado, com bateladas seqüenciais, fazendo o reuso do suporte de gel de poliacrilamida, que é mais resistente e estável que a matriz de alginato. Na primeira batelada observa-se uma fase de adaptação (*lag-phase*), porém, nas bateladas seguintes houve crescimento de células no interior do suporte, sendo 50 vezes menor que o crescimento em cultivo com células livres. Com o decorrer das bateladas, ocorre o aumento da saída de células e a degradação do ácido láctico produzido por enzimas lactato oxidase, ou pela oxidação do ácido láctico por enzimas peroxidases e desidrogenases independentes de NAD, como descrito acima (item 3.1). Na décima batelada foi observada novamente uma *lag-phase*, que se deve ao crescimento das células que restaram no suporte até esse ciclo.

Imobilização de células por alginato de cálcio foi utilizada para síntese de ácido láctico em bateladas seqüenciais por alguns autores como Roukas e Kotzekidou (1998), que utilizaram a imobilização por 12 vezes em bateladas seqüências para produção de ácido láctico com imobilização em alginato de cálcio, com uma mistura de bactérias *L. casei* e *Lactococcus lactis*. Panesar et al. (2007a) utilizaram 16 vezes a biomassa imobilizada em pectina (3 %), com a bactéria *L. casei*. Já Chantawongvuti et al. (2010), utilizando imobilização por adsorção em bucha vegetal tratada com quitosana, obtiveram alta produtividade até o quinto ciclo de fermentação, com o micro-organismo *L. salivarius*.

Um dos principais limitantes da estabilização do *pellet* é o efeito quelante do próprio ácido láctico sobre o Ca^{2+} do alginato, desfazendo o *pellet* ou deformando-o. Göksungur e Güvenç (1999) obtiveram melhoras no processo utilizando CaCO_3 para a neutralização do ácido láctico, dessa maneira conseguiram 14 bateladas seqüenciais sem significativa deformação dos *pellets*.

No reuso do suporte de células aprisionadas a concentração de células decai cerca de 60 % de um ciclo para outro devido ao estresse nutricional antes da difusão dos nutrientes no início de cada batelada (SENTHURAN et al., 1997). Geralmente a fase de adaptação leva 20 h, quando

a concentração de células aumenta e se torna estável. A avaliação do crescimento de células livres é fundamental para verificar a viabilidade do reuso das células imobilizadas (BRÉANT, JÉZÉQUEL e LEBEAU, 2002).

3.4 Fermentação com células imobilizadas em biorreatores

As condições ideais para um biorreator com células imobilizadas: minimização da limitação de transferência de massa, boa retenção de células (boa imobilização na matriz), condições de agitação adequadas para preservação da matriz (sem cisalhamento). Diversos são os tipos de reatores para imobilização, a seguir são fornecidas as características de cada um deles, bem como as vantagens e desvantagens.

O reator mais utilizado em microbiologia industrial é o reator de tanque agitado (*Continuous Stirred Tank Reactor - CSTR*) (Figura 5), que confere ao cultivo de células imobilizadas a vantagem da manutenção da agitação do meio, compensando a baixa transferência de massa de um sistema com células imobilizadas, porém deve-se avaliar a agitação máxima para evitar cisalhamento do *pellet* (WILLAERT, 2007).

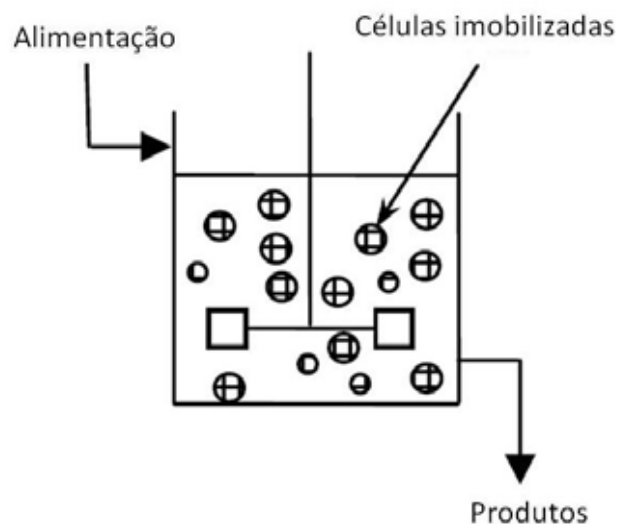


Figura 5. Biorreator de tanque agitado com células imobilizadas

O reator de leito fixo (*Packed Bed Reactor - PBR*) (Figura 6) é um reator onde as células imobilizadas em *pellets* ficam fixas em uma coluna por onde o substrato passa em uma vazão

determinada. Há possibilidade de formação de caminhos preferenciais, que são espaços onde a solução com substrato passa sem contato íntimo com os *pellets*, diminuindo o metabolismo. Além disso, deve-se verificar a vazão de modo a possibilitar transferência de massa e retirada do produto, para que não haja a redução do pH do meio com a produção de ácido lático, podendo causar danos à matriz e inibição por produto (KOSSEVA et al., 2009).

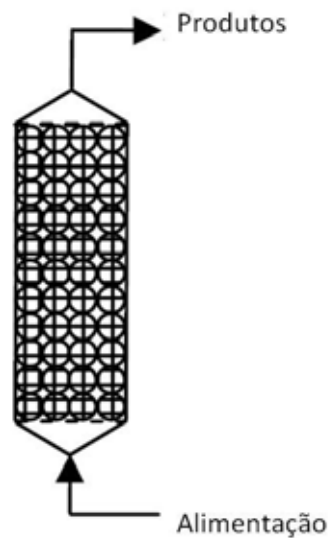


Figura 6. Biorreator de leito empacotado

No reator em leito fluidizado (*Fluidized Bed Reactor - FBR*) (Figura 7) os *pellets* são mantidos em agitação em uma coluna com fluxo ascendente de substrato. O sistema é semelhante ao PBR, porém há mobilidade nos *pellets*, o que otimiza a transferência de massa no sistema. Esse tipo de reator apresenta condições intermediárias entre o reator de tanque agitado e reator de leito fixo. Uma vantagem é a ausência de pá agitadora, o que evita o cisalhamento dos *pellets* e mesmo assim os mantém em agitação pelo fluxo de substrato. Porém, esse tipo de reator é de difícil aplicação em larga escala. (KOSSEVA et al., 2009).

O *air-lift bioreactor* (ALB) (Figura 8) consiste em um reator de coluna onde um gás é lançado por um tubo interno promovendo a mistura do meio e a movimentação dos *pellets*, minimizando o problema de transferência de massa do sistema imobilizado. Já o reator de leito fibroso (*Fibrous-Bed Bioreactor - FBB*) consiste em circular uma solução concentrada de células por um material fibroso inerte com alta área superficial de modo a aglutinar as células nessa

malha fibrosa, resultando em uma alta densidade de células na forma de biofilme. Esse sistema pode tolerar baixo nível de contaminação além de possibilitar maior resistência a produtos inibidores. Outro tipo de reator menos utilizado é o reator em cesto (*Basket Reactor - BR*) onde os *pellets* são aprisionados em um cesto dentro de um tanque agitado. Com isso não há o efeito prejudicial do cisalhamento provocado pelo choque das pás com os *pellets*. A agitação é um pouco menor, porém efetiva. (CARVALHO et al., 2003).

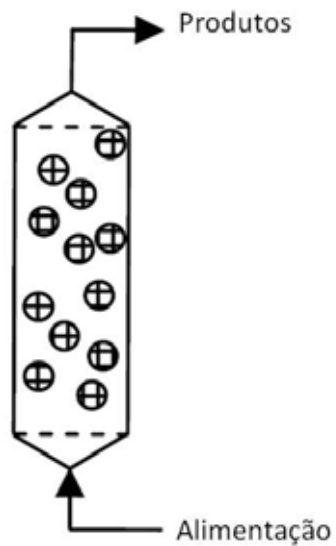


Figura 7. Biorreator de leito fluidizado

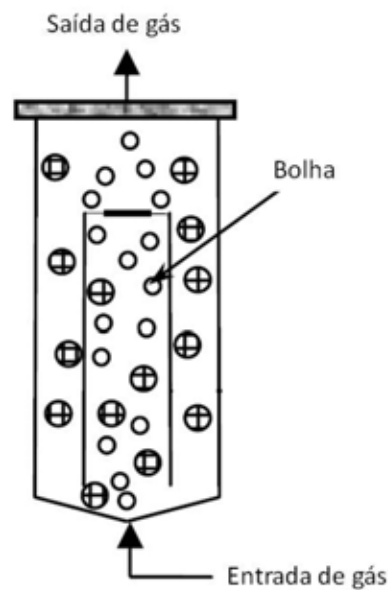


Figura 8. Biorreator tipo *air lift*

Uma revisão publicada por Verbelen et al. (2007) aponta os principais reatores utilizados na imobilização de leveduras, com o intuito de constituir uma fermentação contínua, com enfoque na produção de cerveja. Dentre os principais reatores estão o reator de leito empacotado, leito fluidizado, o *air-lift*, o reator de coluna de bolhas, e o reator de membrana com reciclo de células. Rao, et al. (2009), em um artigo de revisão, fazem uma análise dos tipos de reatores que podem operar em sistemas contínuos em reações de biocatálise.

Para o desenvolvimento e uso apropriado de reatores para fermentação com células imobilizadas, a fisiologia do micro-organismo utilizado e as propriedades do suporte para imobilização devem ser considerados (SALMON e ROBERTSON, 1987).

3.5. Purificação do ácido lático

O ácido lático é um inibidor tanto no crescimento das bactérias do cultivo, quanto da própria produção, por isso buscam-se maneiras de retirá-lo durante a fermentação. O sistema mais usado é a adição de carbonato de cálcio, obtendo-se o lactato de cálcio; ou a adição de hidróxido de sódio, para obtenção de lactato de sódio. Também há estudos na área de remoção do

ácido láctico com o uso de resinas como demonstrado por Yang, Lu e Tsao (1995), utilizando *R. oryzae*, com xilose como fonte de carbono.

Kaufman et al. (1996) desenvolveram um processo de produção simultâneo à extração de ácido láctico por um reator de leito fluidizado. Esse reator não necessita de agentes de controle de pH, e o ácido láctico é removido diretamente do fermentador, o que minimiza gastos no processo de purificação. Porém, ainda não há uma resina que tenha a capacidade, especificidade e que apresente resistência suficiente para se adaptar ao processo de produção e extração simultâneo. A resina Reillex 425 apresentou bons resultados de purificação do ácido láctico (PATEL et al., 2008). John, Nampoothiri e Pandey (2008) utilizaram resinas de troca iônica (Amberlite IRA 402 e Amberlite IRA 67) para adsorção do ácido láctico do meio de cultura da bactéria *L. delbrueckii* em meio de amido de mandioca. Yang et al. (2007) apresentam os diversos tipos de fermentação extrativa para a produção de ácidos orgânicos.

Além da tradicional adição de carbonato de cálcio e hidróxido de sódio como agentes de captação do ácido láctico em forma de precipitação de sais, e o sistema de adsorção em resinas de troca iônica, existem outros sistemas de purificação do ácido láctico como a esterificação, extração líquido-líquido e eletro diálise (NARAYANAN, ROYCHOUDHURY e SRIVASTAVA, 2004). Devido ao alto custo de purificação, o uso de materiais residuais na fermentação deve ser avaliado. Também, a alta concentração de açúcar no caldo poder ocasionar sobras de açúcar no caldo, o que leva a maior dificuldade na remoção de cor do caldo fermentado.

O custo para captação do ácido láctico do caldo fermentado compõe a maior parte do custo do produto final comercializado. Por isso, diversas são as pesquisas e patentes que dão enfoque na purificação do ácido láctico. (NARAYANAN, ROYCHOUDHURY e SRIVASTAVA, 2004)

3.6 Aplicações do ácido láctico

A produção de ácido láctico via microbiana é feita atualmente pelas empresas: Purac (Holanda), Sterling Chemicals (EUA), ADM (Archer Daniels Midland) (EUA), Nature Works LLC (EUA), Cargill (EUA), ECOCHEM (China), Musashino Chemical (Japão), GALACTIC (Bélgica), Yipu (China), Zechem (China). A produção anual de ácido láctico em 2008, segundo Sauer et al. (2008), Foi de 150.000 ton/ano.

Há grande interesse na produção do ácido láctico por sua aplicabilidade em diversos setores como na indústria de alimentos, onde atua como conservante alimentício (SOOMRO MASUD e ANWAAR, 2002), flavorizante, emulsificante, estabilizante, acidificante, antibiótico, ect. O ácido láctico é usado também em bebidas, produtos cárneos, saladas, molhos, doces e queijos e compõe algumas rações animais como aditivo (PURAC, 2010).

Nos demais setores industriais o ácido láctico pode ser usado para síntese de 1,2-propanodiol e ácido acrílico (Figura 9), e na composição de alguns detergentes na indústria química, por exemplo. Na indústria farmacêutica, pode ser usado como regulador de pH, umectante, sistema de entrega de fármacos, suplementação de metais e intermediador quiral., Já na indústria têxtil, é utilizado na acidificação durante o processo de obtenção do couro (PURAC, 2010; DATTA e HENRY, 2006).

O ácido láctico vem sendo usado recentemente como matéria prima para síntese do polilactato (PLA), um polímero biodegradável e absorvível (DATTA e HENRY, 2006). A síntese do polilactato foi apresentada por Kulkarni et al. (1971) em um estudo na busca de polímeros absorvíveis para uso em suturas no ramo da saúde humana. Esse estudo constatou reais possibilidades do uso do polilactato em tratamento de suturas e fraturas. O grande interesse para obtenção de formas puras é a síntese do polímero denominado Polilactato (PLA). A proporção dos isômeros L e D no processo de síntese do PLA determina a dureza do polímero formado. Quanto maior a porcentagem de L-ácido láctico, maior é a dureza do polímero.

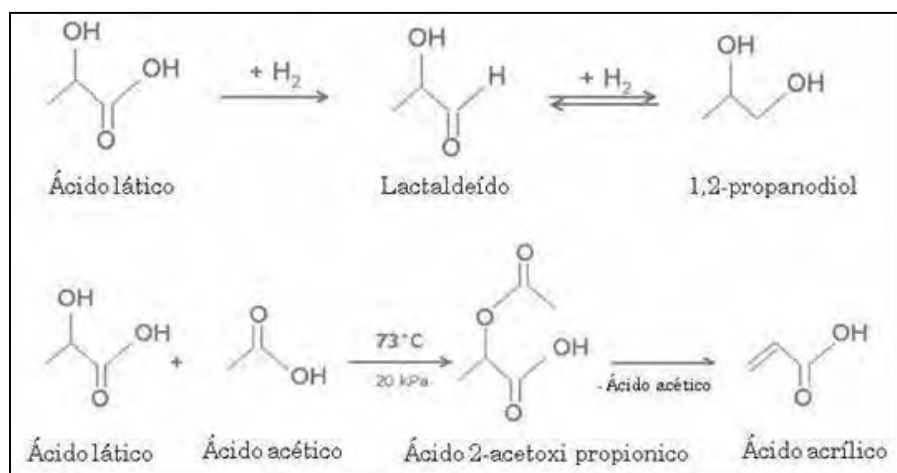


Figura 9. Usos do ácido láctico na indústria química (GALACTIC, 2010)

O PLA é produzido atualmente por diversas empresas como a NatureWorks LLC (EUA) Arkema (EUA), Dow Chemicals (EUA), Cargill (EUA), Birmingham Polymers (EUA), Mitsubishi Polymers (Japão), Shimadzu (Japão), Nestlé Chemicals (França), Phusi (França), Fortum Oyj (Finlândia), ICO Stationery Manufacturing (Hungria), EconCore (Bélgica), Hycail (Holanda) tendo demanda de 136 ton/ano em 2002 e estimativa de 500.000 ton/ano para 2010.

O PLA tem basicamente as mesmas propriedades que os polímeros convencionais como observado nas Tabelas 9 a 12.

Tabela 9. Propriedades Físicas do PLA

Massa molar (Dalton)	100.000 - 300.000
Temperatura de transição vítrea (°C)	55 – 70
Temperatura de fusão (°C)	130 – 215
Cristalinidade (%)	10 – 40
Energia superficial (dinas)	38
Parâmetros de solubilidade ($J^{0,5}cm^{-1,5}$)	19 – 20,5
Calor de fusão ($J^{0,5}g^{-1}$)	8,1 – 93,1
Gravidade específica	1,25
Velocidade de fusão (g/10min)	2 – 20

(Adaptado de Kulkarni et al., 2004).

Tabela 10. Propriedades mecânicas do PLA

	L - PLA	D,L - PLA
Força (Mpa)	70	53
Tensão (Mpa)	66	44
Elongação (%)	100 - 180	100 – 180
Flexibilidade (Mpa)	119	88
Impacto ($J.m^{-1}$)	66	18
Penetração (°C)	165	52

(Adaptado de Kolstad et al., 2002).

Tabela 11. Propriedades do PLA e outros polímeros

	PLA	PS	PVC	PP
Força (Mpa)	49	49	35	35
Elongação (%)	2,5	2,5	3	10
Tensão (GPa)	3,2	3,4	2,5	1,4
Flexibilidade (Mpa)	70	80	90	49

PS – Poliestireno, PVC – Polivinilálcool, PP - Polipropileno (Adaptado de Mobley, 1994).

Tabela 12. Tempo de degradação de polímeros derivados do ácido láctico

L- Polilactato	Meses – anos
D,L – Polilactato	Semanas – meses
Copolímero de L- Polilactato e D,L – Polilactato	Semanas – meses
Meso polilactato	Semanas
Poli L-ácido láctico	Semanas

(Adaptado de Mobley, 1994).

Dutkiewicz et al. (2003) realizaram a síntese de PLA por um processo de policondensação com solventes como *p*-xileno, *o*-clorotolueno e difenileter. Em contrapartida Jahno (2005), em sua dissertação, realizou a síntese do polilactato através do ácido láctico comercial por duas metodologias, ambas sem o uso de solventes. As técnicas usadas foram a policondensação direta e a policondensação em meio de CO₂ supercrítico (scCO₂). Ambas as técnicas possibilitaram a obtenção de polímeros de tamanhos variáveis e passíveis de uso em cirurgia. Gupta, Revagade e Hilborn (2007) publicaram uma revisão sobre o PLA, desde a síntese até as características físico-químicas e usos. Dentre esses está a confecção de materiais plásticos, pois o PLA apresenta estabilidade térmica e dureza necessária para uso como plástico (DATTA et al., 1995; SÖDERGARD e STOLT, 2002; MOBLEY, 2004).

4. Material e métodos

4.1 Micro-organismos

Os micro-organismos usados para o trabalho foram cedidos pela Dra. Georgina Michelena Alvarez do “Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar”. As espécies são: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus*.

4.2 Meios de cultivo

As bactérias foram cultivadas em meio MRS (MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960) para crescimento e obtenção de biomassa. Para produção de ácido láctico com o cultivo de células imobilizadas utilizou-se o meio MRS modificado: acetato de sódio (CH₃COONa) 5g/L; fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 2 g/L; citrato de amônio ((NH₄)₂HC₆H₅O₇) 2 g/L; sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) 0,1 g/L; sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) 0,05 g/L; carbonato de cálcio (CaCO₃) 45 g/L; composto de soro de queijo (70 % lactose) como fonte de carbono (120 g/L de lactose). As fermentações foram conduzidas em frasco Erlenmeyer de 300 mL com 100 mL de meio, a 35 °C, pH inicial ajustado para 6,5; em mesa agitadora a 150 rpm por 72 h.

4.2.1 Processamento do soro em pó

O soro de queijo em pó utilizado contém cerca de 70 % (m/m) de lactose. A partir de uma solução concentrada de soro (330 g/L) foi realizada a desproteïnização do soro com tratamento térmico (121°C, 15 min.). Após a retirada das proteínas, foi obtida uma solução de soro com 210 g/L de lactose, que foi usada como solução estoque para utilização nas concentrações de lactose desejadas nos meios de cultivo.

4.3 Quantificação da biomassa

4.3.1 Células livres

O crescimento microbiano foi determinado por turbidimetria, em espectrofotômetro a 540 nm. Foi mensurada a massa seca e massa úmida do cultivo para obtenção de biomassa para imobilização.

4.3.2 Células imobilizadas

Para medida de crescimento e de biomassa no cultivo imobilizado, foi utilizada a contagem de células (unidades formadoras de colônia, UFC). Para isso, 5 *pellets* foram coletados e adicionados a 10 mL de tampão citrato (0,3 M, pH 5), até dissolução completa dos *pellets* (por volta de 15 min.). Dessa biomassa dissolvida foram feitas diluições seriadas e cultivo em MRS sólido por 48 horas em 35°C. Esse método foi adaptado de Idris e Suzana (2006).

4.4 Reativação bacteriana

A reativação das linhagens foi feita em meio MRS. 1,6 mL de células armazenadas a 4 °C com 20 % de glicerol (estoque de células) foram inoculados em 20 mL de meio MRS a 35 °C, 150 rpm, em erlenmeyer de 125 mL, por 24 h. Uma alíquota de 5 mL foi adicionada a 45 mL de meio MRS novo, em erlenmeyer de 250 mL, cultivado nas mesmas condições. Após 24 h, 10 mL desse cultivo foram adicionados a 90 mL de meio, em erlenmeyer de 300 mL. Após essa

reativação o cultivo de 100 mL foi crescido nas mesmas condições para obtenção de biomassa para imobilização. A imobilização é realizada com os micro-organismos no final da fase de crescimento.

4.5 Imobilização de células

4.5.1. Aprisionamento em alginato de cálcio

A biomassa reativada e crescida em meio MRS por 30 horas foi centrifugada a 10000 rpm por 25 min. a 20 °C, ressuspensa em água destilada estéril para lavagem. Depois de centrifugada a biomassa foi ressuspensa em 10 mL água destilada estéril, e acrescida de igual volume de solução de alginato de sódio (2 %). A mistura foi agitada por 30 min. em temperatura ambiente. A mistura obtida foi então extrudada através de uma seringa com auxílio de uma bomba peristáltica (fluxo de 4 mL/min.) em uma solução de cloreto de cálcio (0,2 M) a temperatura ambiente, em agitação leve e constante, para gelificação do alginato e obtenção dos *pellets* com 2-3 mm de diâmetro. Os *pellets* foram deixados por 12 horas a 4 °C e então lavados com água destilada estéril para remoção do excesso de íons cálcio e células não aprisionadas (Figuras 10 e 11). Os *pellets* foram então cultivados para produção de ácido lático.

4.5.2. Aprisionamento em alginato de cálcio modificado com ácido palmítico

Com o intuito de melhorar a viabilidade das células dentro do suporte de alginato, realizou-se a modificação do alginato com adição de ácido palmítico. A palmitolação do alginato foi feito de acordo com Le-Tien et al. (2004).



Figura 10. Esquema geral da imobilização por aprisionamento em alginato de cálcio.



Figura 11. Extrusora utilizada para a imobilização das células em alginato

A adição da cadeia carbonada ao alginato foi feita a partir de um processo químico que envolve duas etapas, a *aminoetilação do alginato* e a *palmitolação do aminoetil alginato*. A primeira etapa foi realizada a partir de uma solução de 5 g de alginato de sódio dissolvido em 400 mL de NaOH (1,2M), que foi mantida em agitação em temperatura ambiente por 2 horas para

completa dissolução. A solução foi aquecida a 70 °C, e uma solução de hidrócloro de 2-cloroetilamina dissolvida imediatamente antes do uso foi adicionada à solução de alginato. A reação foi mantida a 70 °C por 1 hora sob agitação leve. A solução formada foi neutralizada a pH 7,0 com HCl (2 M), precipitada com excesso de etanol absoluto e centrifugada por 10 min a 10000 rpm. O precipitado foi ressuspensão em 200 mL de água destilada, passando por purificação por diálise, por 12 h. A solução purificada foi novamente precipitada com etanol absoluto e centrifugada por 10 min a 10000 rpm. O precipitado foi seco em acetona para remoção da água e obtenção do aminoetil alginato em forma de pó. (Figura 12).

A segunda etapa foi realizada a partir de 5 g de aminoetil alginato dissolvidos em 450 mL de água destilada a 60 °C e pH 7,5. A essa solução foi adicionado 20 mL de cloreto de palmitoil, e a reação foi mantida a 60 °C com adição constante de NaOH (0,5M) para manutenção do pH na faixa de 7,2 a 7,5, por 2 h. A solução foi finalmente neutralizada para pH 7,0 e precipitada com excesso de etanol absoluto. O precipitado foi coletado por filtração e lavado 3 vezes com etanol absoluto a 50 °C para remoção de ácidos graxos não ligados ao alginato. A massa filtrada de polímero foi seca em acetona pura para obtenção do alginato modificado com ácido palmítico em forma de pó. A metodologia está detalhada no esquema abaixo (Figura 13).

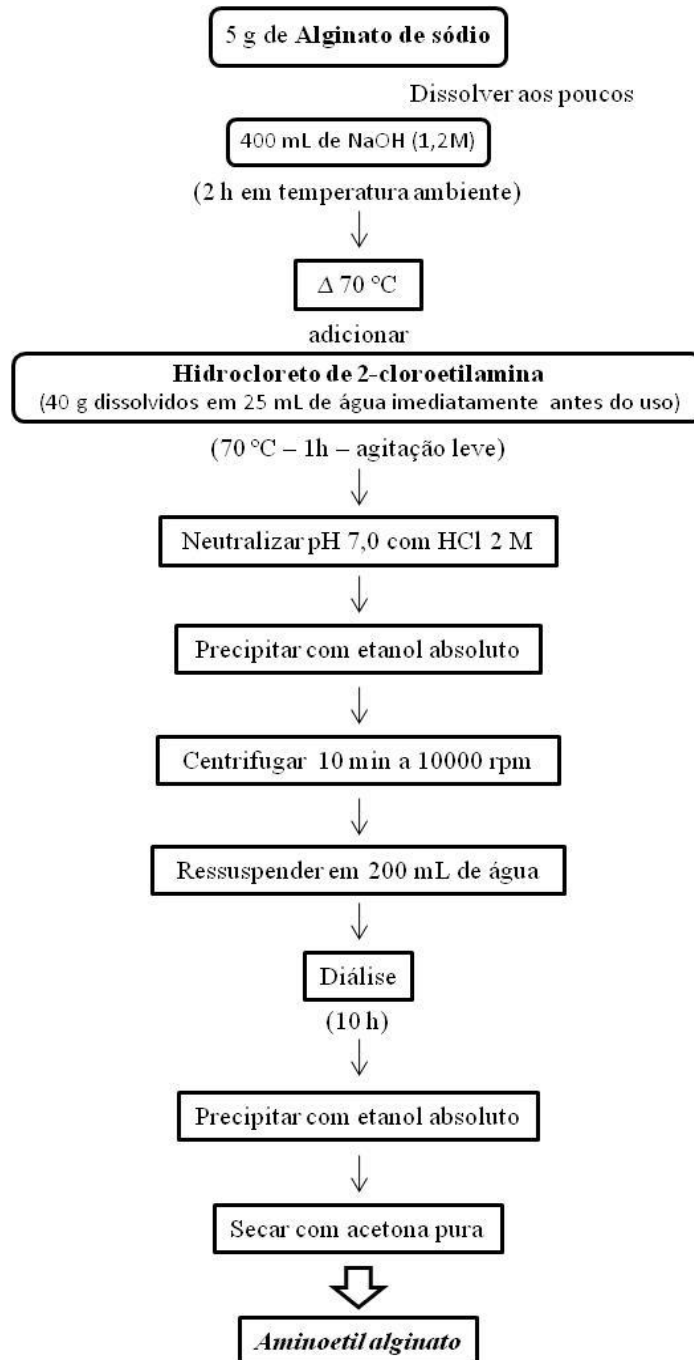


Figura 12. *Aminoetilação do alginato* (1ª etapa da modificação do alginato com ácido palmítico).

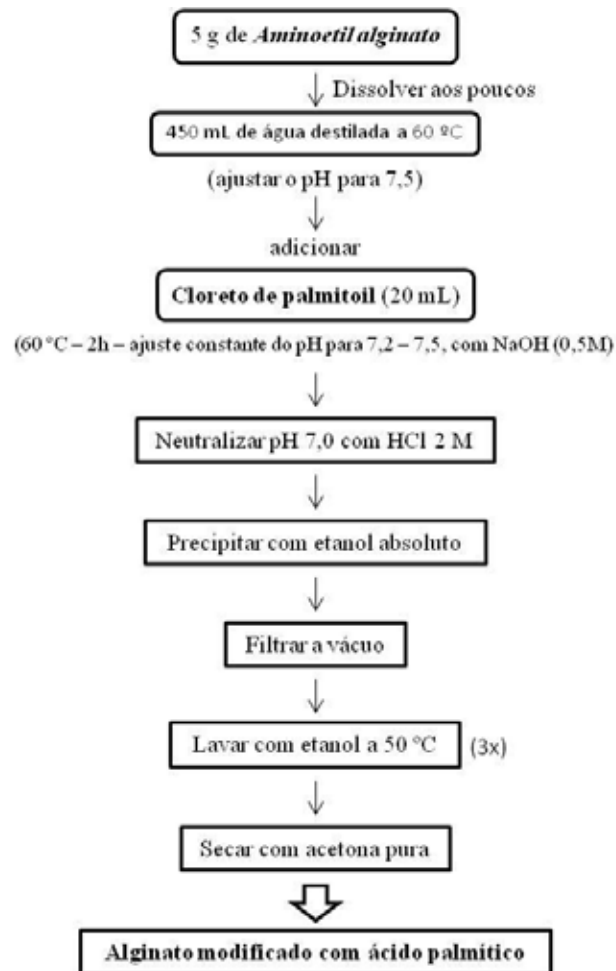


Figura 13. *Palmitolação do aminoetil alginato* (2ª etapa da modificação do alginato com ácido palmítico).

Para a imobilização de células, a concentração do alginato modificado foi de 1,5 % mais 1,5 % de alginato de sódio.

4.5.3. Cultivo em reator de leito empacotado com alginato de cálcio recoberto com polietilenoimina (PEI).

Para o cultivo contínuo em reator de leito empacotado a biomassa imobilizada foi adquirida a partir de 400 mL de pré-inóculo. Após gotejamento da mistura de células (aprox. 7 g massa úmida) e alginato (3 %) em CaCl_2 (0,3M), os *pellets* formados foram armazenados a 4 °C por 5 h. Os *pellets* foram coletados com peneira e lavados com água destilada estéril, e

adicionados a uma solução de polietilenoimina (PEI) (10 % m/v) por 30 min. O volume da solução de PEI utilizado foi suficiente para recobrir todos os *pellets*. A solução de PEI foi preparada imediatamente antes do uso, e teve o pH corrigido para 7 com HCl (50 % v/v). Nessa fase o diâmetro dos *pellets* passa de 3-4 mm para 1-2 mm. Para efetivação da ligação do alginato ao PEI, uma solução de glutaraldeído (0,6 %) foi adicionada à solução de PEI com os *pellets* e deixada em temperatura ambiente por 10 h. Novamente os *pellets* foram captados da solução com peneira, lavados intensivamente com água destilada estéril e colocados no reator (Figura 14).

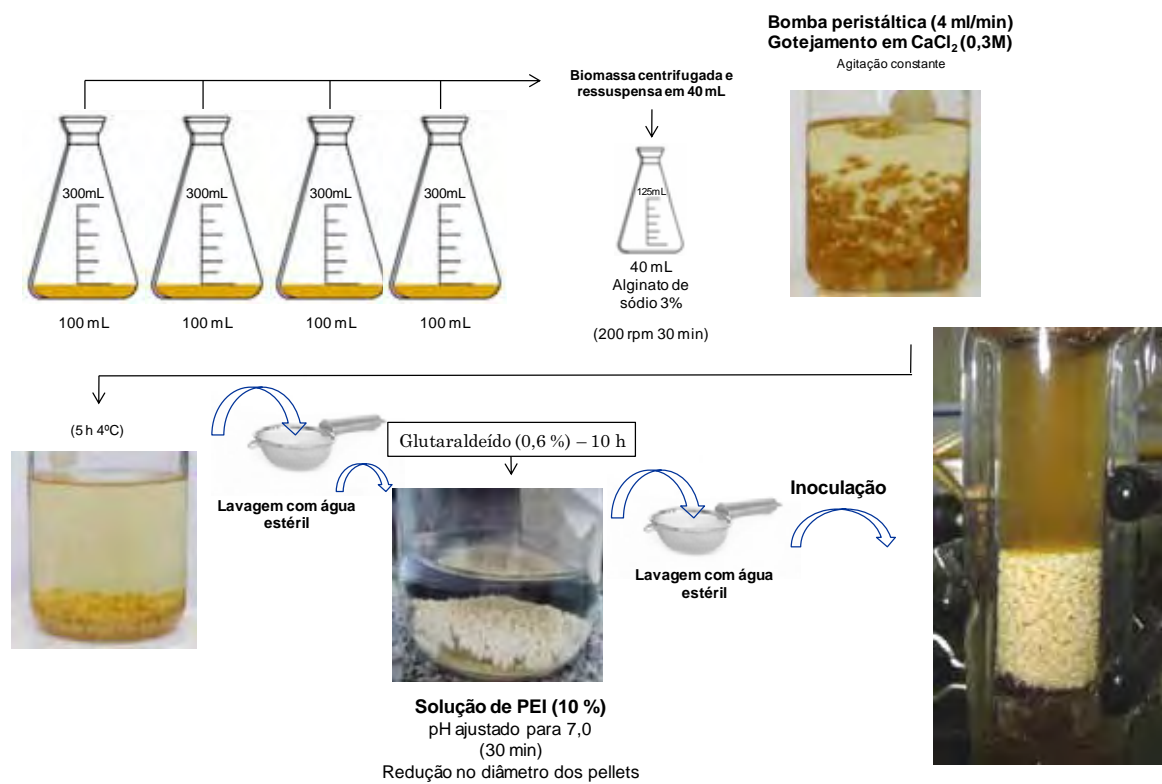


Figura 14. Processo de imobilização por aprisionamento e recobrimento com PEI.

O sistema da fermentação contínua está demonstrado nas figuras 14 e 15 abaixo. O meio de cultivo utilizado no ensaio foi MRS, com suplementação de CaCl_2 (20 mM) e pH ajustado para 7,0.



Figura 15. Sistema contínuo de fermentação com reator de leito empacotado.



Figura 16. Detalhe do reator de leito empacotado com células imobilizadas.

4.6 Eficiência da imobilização e avaliação da saída de células do suporte

Para verificar a eficiência do processo de imobilização de células por aprisionamento em alginato de cálcio, foram feitas as medidas de UFC no suporte (item 4.3.1), na solução de CaCl_2 e no meio de cultivo para verificação de células livres. Esse teste foi feito com imobilização com alginato a 2 %, e com meio MRS como meio de cultivo. O cálculo de eficiência da fermentação foi feito de acordo com a fórmula abaixo.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{UFC células imobilizadas}}{(\text{UFC células imobilizadas} + \text{UFC na solução de cloreto de cálcio})} \times 100$$

O teste de saída de células é expresso em porcentagem de células livres na fermentação, e é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Saída de células (\%)} = \frac{\text{UFC células livres}}{(\text{UFC células imobilizadas} + \text{UFC células livres})} \times 100$$

4.7 Fontes alternativas de nitrogênio

As fontes de nitrogênio utilizadas no meio MRS são extrato de levedura, extrato de carne e peptona. No intuito de estudar fontes alternativas de nitrogênio utilizou-se: autolisado de levedura, água de maceração de milho, Pro-Floo® e sulfato de amônio. Dados da literatura foram analisados para adequar as fontes alternativas em concentrações de nitrogênio equivalentes ao MRS, assim foram feitos os cálculos apresentados na Tabela 13. Preservadas as mesmas concentrações de nitrogênio final, as fontes alternativas utilizadas, autolisado de levedura, água de maceração de milho, Pro-Floo® e sulfato de amônio tiveram as concentrações estabelecidas em 26,2 g/L, 75,1 g/L, 31,7 g/L e 14,22 g/L, respectivamente.

Tabela 13. Adequação das concentrações de nitrogênio das fontes alternativas de nitrogênio

	Nitrogênio (% g/g)	Concentração (g/L)	Nitrogênio (g/L)
Peptona	11,5	10	1,15
Extrato de Carne	12,4	10	1,24
Extrato de Levedura	12	5	0,625
MRS	$\bar{X} = 11,9$	25	3,015
Água de maçeração de milho	3,6	75,1	3,015
Pro-Floo®	9,5	31,7	3,015
Autolisado de levedura	11,5	26,2	3,015
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	21,19	14,22	3,015

4.8 Quantificação do ácido lático

Para quantificação do ácido lático produzido e açúcar consumido (glicose ou lactose) foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas condições descritas na Tabela 14:

Tabela 14. Especificações da análise de açúcares e ácidos orgânicos em CLAE

Coluna	Phenomenex®, REZEX Organic Acids (ROA)
Dimensões	300 x 7,8 mm
Matriz	poli(estireno divinilbenzeno sulfonado)
Tamanho do particulado	8 µm
Tempo de corrida	45 min
Pressão	350 psi
Fluxo	0,4 mL/min
Temperatura	60°C
Volume de injeção	20 µL
Fase móvel	H ₂ SO ₄ 0,005 N
Detector de açúcares	Índice de refração (RID-10A)
Detector de ácidos	Absorbância em 210 nm (UV/VIS-20A)

A análise de pureza óptica foi feita em CLAE sob as condições apresentadas na Tabela 15:

Tabela 15. Especificações da análise dos isômeros D e L-ácido láctico

Coluna	Phenomenex [®] , CHIREX
Dimensões	150 X 4,6 mm
Matriz	N,S-dioctil-(D)-penicilamina
Tipo de ligação	Iônica
Tempo de corrida	35 min.
Pressão	1300 psi
Fluxo	1 mL/min
Temperatura	30 °C
Volume de injeção	5 µL
Fase móvel	CuSO ₄ 0,001 M
Detector	Absorbância em 254 nm (UV/VIS-20A)

Para os cultivos que utilizaram CaCO₃ as amostras foram preparadas de acordo com o esquema representado na Figura 17. Nessas condições o ácido láctico formado reage com o carbonato de cálcio formando lactato de cálcio, que é posteriormente removido pela reação com ácido sulfúrico.



Figura 17. Preparo das amostras para análise em CLAE.

4.9 Cálculo do rendimento e produtividade da reação

O rendimento da conversão de substrato ($Y_{p/s}$) em produto foi calculado a partir da fórmula:

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$$

Onde P_f , P_i , S_i e S_f representam respectivamente a concentração do produto de interesse no final da fermentação (g/L), concentração inicial do produto de interesse (g/L), concentração inicial do substrato (g/L) e concentração do substrato residual não metabolizado (g/L).

A produtividade (P) foi calculada a partir da fórmula:

$$P = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_0}$$

Onde P_f , P_i , t_0 e t_f representam respectivamente a concentração do produto de interesse no final da fermentação (g/L), concentração inicial do produto de interesse (g/L), tempo zero, e tempo da análise (h).

5. Resultados e discussão

5.1 Produção de ácido lático em cultivo de células livres

Para selecionar a cepa mais vantajosa em termos de produção de ácido lático foram realizados previamente estudos com as três cepas em meio MRS modificado, com a adição de soro de queijo desproteínizado ao invés de glicose. As concentrações de lactose proveniente do soro de queijo estudadas foram 54,4; 72,9 e 90,4 g/L. Os cultivos foram realizados em 50 mL, em erlenmeyer de 125 mL, por 48 h, com agitação de 150 rpm, a 35 °C, pH = 5,6; com 10 % de

inóculo. Os inóculos foram feitos após reativação de cada cepa como apresentado no item 4.4. Os resultados seguem na Figura 18 e na Tabela 16.

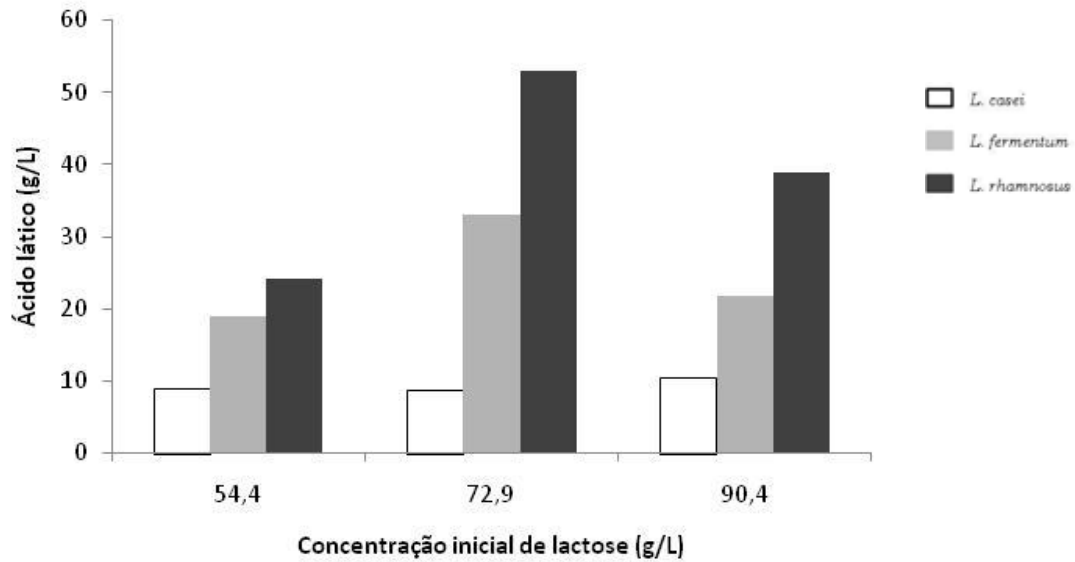


Figura 18. Produção de ácido láctico por *L. casei*, *L. fermentum*, e *L. rhamnosus* em MRS modificado com três concentrações iniciais de lactose.

Tabela 16. Taxa de conversão de lactose em ácido láctico ($Y_{l/s}$) e ácido acético ($Y_{a/s}$) para os cultivos de células livres de *L. casei*, *L. fermentum*, e *L. rhamnosus*

Concentração inicial de lactose	$Y_{l/s}$			$Y_{a/s}$		
	54,4	72,9	90,4	54,4	72,9	90,4
<i>L. casei</i>	0,27	0,27	0,36	0,31	0,32	0,58
<i>L. fermentum</i>	0,35	0,45	0,25	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	0,45	0,73	0,66	-	-	-

A espécie *L. casei* apresentou baixa produção de ácido láctico, e produção mediana de ácido acético, cerca de 10 g/L. As espécies *L. fermentum* e *L. rhamnosus* apresentaram elevada produção de ácido láctico e valores irrelevantes de produção de ácido acético. Assim, como o objetivo do trabalho é atingir a máxima produção de ácido láctico, a espécie *L. rhamnosus* foi escolhida para os testes posteriores.

5.2 Produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* em cultivo de células livres em diversas concentrações iniciais de lactose

Com o intuito de estudar a concentração inicial de lactose em células livres, foi feito um ensaio de produção de ácido láctico com meio MRS modificado, tendo como única fonte de carbono o soro de queijo, ajustado em diferentes concentrações iniciais de lactose de 50, 60, 70, 80 e 90 g/L (Figura 19). A avaliação da biomassa foi feita no mesmo cultivo a partir da leitura em espectrofotômetro, segundo metodologia descrita no item 4.3.1. Os cultivos foram realizados em erlenmeyer com 50 mL de meio de produção (erlenmeyer de 125 mL de capacidade) por 48 h. A partir de parâmetros retirados da literatura (para a espécie *L. rhamnosus*), foram utilizados agitação de 150 rpm, temperatura a 35 °C e pH 6,5 (ajustado com NaOH 2M) com 10 % de pré-inóculo.

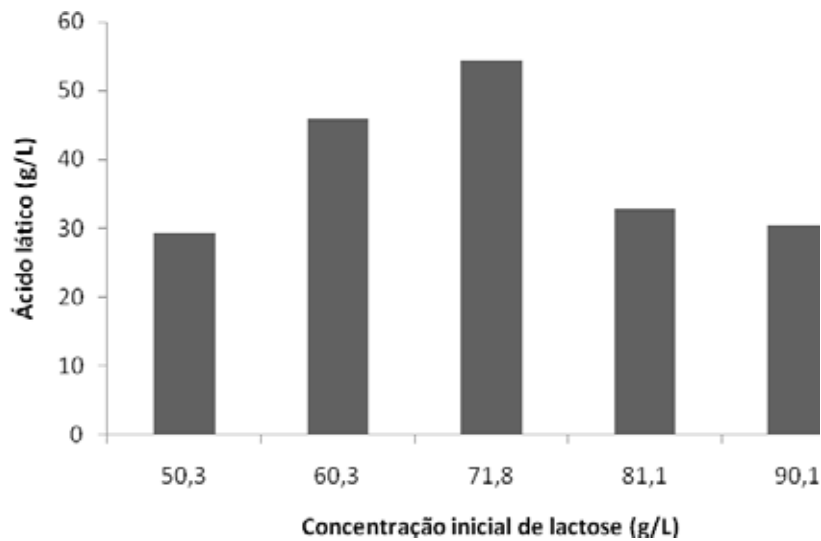


Figura 19. Produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* utilizando diversas concentrações iniciais de lactose proveniente do soro de queijo.

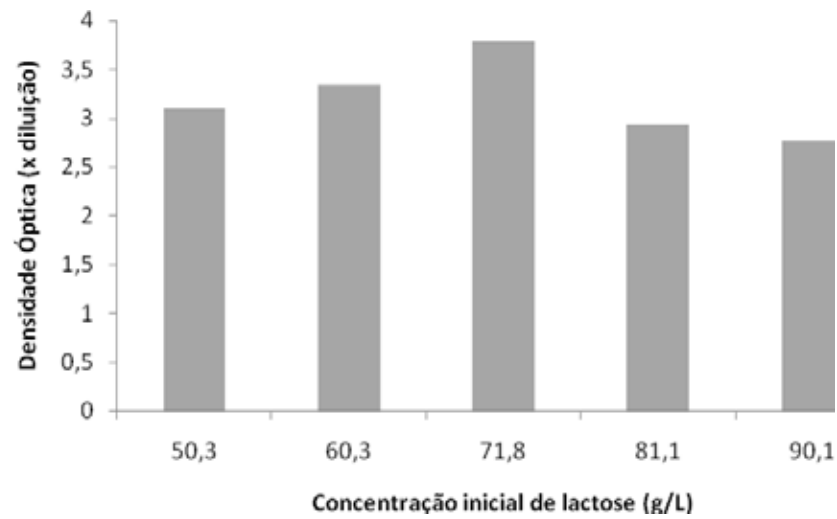


Figura 20. Medida indireta de biomassa para *L. rhamnosus* em diversas concentrações iniciais de lactose proveniente do soro de queijo.

Como apresentado na Figura 19, verificou-se maior produção de ácido láctico no cultivo com 70 g/L de concentração inicial de lactose. Quando se utilizou concentrações de lactose inicial acima de 80 g/L, houve inibição da produção devido, provavelmente, à alta concentração de substrato. Assim como produção de ácido láctico, foi observada maior biomassa quando utilizado a concentração de 70 g/L de lactose inicial (Figura 20).

5.3 Curva de crescimento de *L. rhamnosus*

Com o objetivo de verificar o tempo de cultivo para obtenção de biomassa suficiente para a realização da imobilização e para conhecimento da curva de crescimento da bactéria *L. rhamnosus*, foram realizadas medidas indiretas de biomassa através de leitura em espectrofotômetro a 650 nm em diversos tempos de cultivo (Figura 21). Para esse teste foi utilizado 50 mL de meio MRS original, em erlenmeyer de 125 mL, por 48 h, agitação de 150 rpm, temperatura 35 °C e pH ajustado para 6,5 com NaOH (2 M).

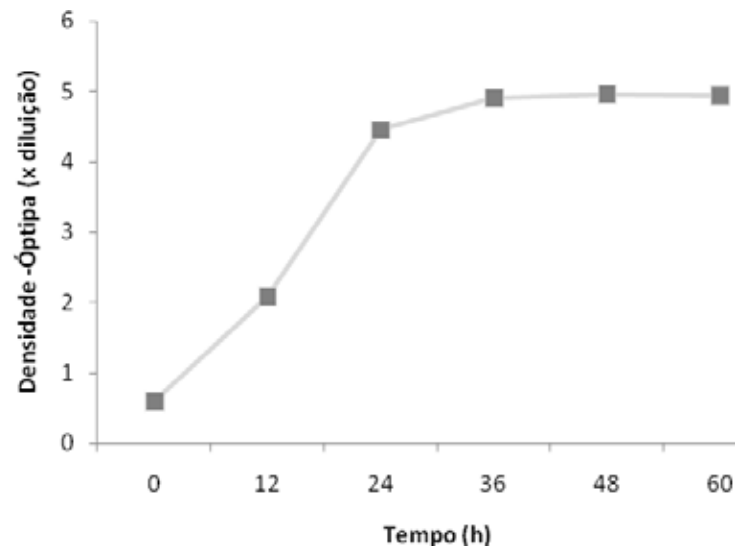


Figura 21. Medida indireta de biomassa de *L. rhamnosus* em meio MRS.

O pH do meio de cultivo, após autoclavagem, caiu de 6,56 para 6,21; e após 24 horas o pH medido atingiu 4,09 devido à produção de ácido lático. O pH depois de 48 horas chegou a 3,77; e após 72 horas a 3,72. A biomassa seca final resultou em 2,66 g/L após 48 h. Pode-se verificar o crescimento de *L. rhamnosus* até 36 horas (Figura 21). Para a imobilização, o cultivo para obtenção de biomassa foi realizado durante 30 h, para que as células fossem imobilizadas no estágio final da fase *log* de crescimento. Na maioria dos estudos de produção de ácido lático com células imobilizadas por aprisionamento, as células utilizadas para a imobilização estão no final da fase de crescimento, para que o crescimento não prejudique a integridade da matriz no sistema imobilizado.

5.4 Imobilização de *L. rhamnosus* em diferentes concentrações de alginato

A imobilização foi feita de acordo com o processo descrito no item 4.5.1 (Figura 10). As concentrações de alginato utilizadas no experimento foram 2,0; 2,5; e 3,0 %. A biomassa inicial imobilizada foi de 0,235 g de massa seca. As células foram imobilizadas em alginato de cálcio, resultando em cerca de 300 *pellets* com 3 mm de diâmetro. O meio de cultivo utilizado para o estudo foi MRS modificado, sem fosfato e com 4 % (m/v) de CaCO_3 para ação tamponante, visto

que com o decaimento do pH, há a dissolução do alginato, liberando as células para o meio externo. Amostras foram retiradas em 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108, e 120 horas (Figura 22).

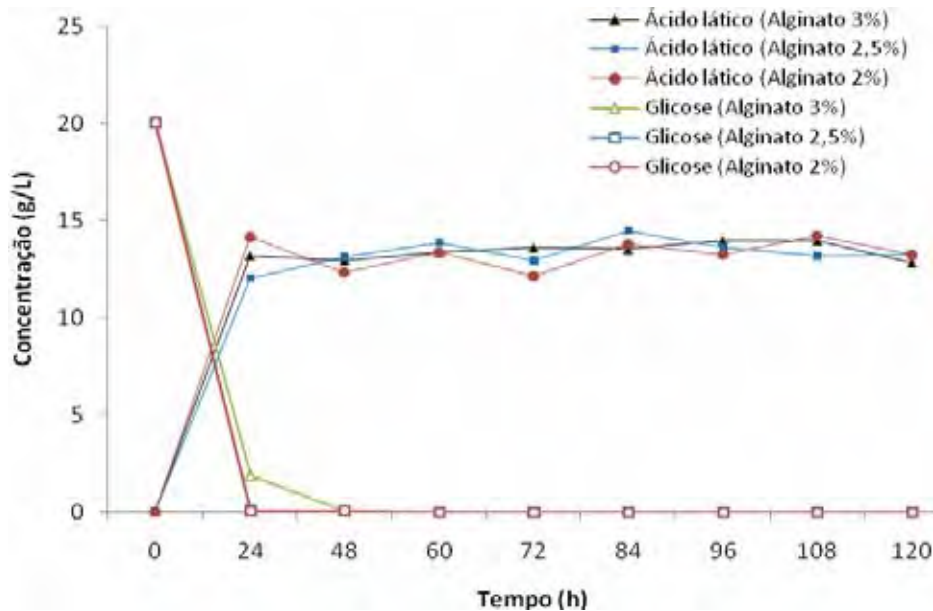


Figura 22. Produção de ácido láctico e consumo de glicose por *L. rhamnosus* imobilizada em diferentes concentrações de alginato de cálcio, em meio MRS.

Observa-se na Figura 22 que diferentes concentrações de alginato apresentaram resultados similares nos parâmetros analisados. Os melhores resultados de produção de ácido láctico e consumo de glicose foram respectivamente 14,45 g/L e 100 %, ocorrendo em 24 horas com a utilização de 2 % de alginato. Tendo em vista a concentração inicial de glicose, a maior taxa de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) observada foi de 0,72, também para a imobilização com 2 % de alginato em 24 horas de cultivo. Os demais valores de rendimento em 24 horas foram 0,6 e 0,66 para a imobilização com 2,5 e 3 % de alginato, respectivamente. Assim, tendo em vista os resultados acima mencionados, as próximas imobilizações foram realizadas com 2 % de alginato.

Em matriz de alginato de cálcio, Idris e Suzana (2006) estudaram a influência da concentração de alginato de sódio e do diâmetro da matriz na produção de ácido láctico pela bactéria *L. delbrueckii*. Obtiveram maior produção na concentração de 2% de alginato e diâmetro de 1 mm. A concentração de alginato e o diâmetro da matriz influenciam diretamente na difusão de nutrientes do meio líquido para o suporte e para as células, bem como na liberação de produtos do metabolismo celular (KATHIRAVAN et al., 2010).

5.5. Eficiência da imobilização e avaliação da saída de células do suporte

De acordo com o procedimento descrito no item 4.3.2 foi realizado um cultivo para avaliar a eficiência do processo de imobilização e a saída de células do suporte de alginato com base na carga inicial de células. A solução de células e alginato (40 mL no total) resultou na formação de cerca de 300 *pellets* de 2 mm cada. A tabela 17 abaixo mostra os dados para o cálculo da eficiência da imobilização.

Tabela 17. Eficiência da imobilização de células de *L. rhamnosus*

	Resultado	Unidade
Pré-inóculo (células livres)	$3,53 \cdot 10^9$	UFC/mL
Células imobilizadas após tratamento em <i>overnight</i> (12 horas a 4 °C)	$3,46 \cdot 10^8$	UFC/mL
Células no CaCl ₂ após <i>overnight</i>	$3,90 \cdot 10^3$	UFC/mL

Segundo a fórmula apresentada no item 4.6, a eficiência da imobilização foi de 99,99 %. Poucos trabalhos de imobilização de células trazem a avaliação da eficiência da imobilização, sendo mais comumente utilizado na imobilização de enzimas. Pode-se afirmar que o processo de imobilização foi eficiente.

As células imobilizadas se mantiveram estáveis durante 96 h, ocorrendo apenas uma queda na atividade das células após 120 h. As células livres correspondem em 6 horas de fermentação a 0,25 % do total de células (Tabela 18).

Tabela 18. Porcentagem de saída de células de *L. rhamnosus* no cultivo com MRS

Tempo (h)	Células imobilizadas UFC/mL	Células livres UFC/mL	Saída de células (%)	Ácido lático (g/L)
6	$6,50 \cdot 10^8$	$1,62 \cdot 10^6$	0,25	4,18
12	$8,43 \cdot 10^8$	$4,77 \cdot 10^6$	0,56	9,48
24	$3,16 \cdot 10^8$	$3,02 \cdot 10^6$	0,95	14,68
48	$3,94 \cdot 10^8$	$2,18 \cdot 10^6$	0,55	14,65
72	$2,40 \cdot 10^8$	$1,72 \cdot 10^6$	0,71	14,69
96	$1,42 \cdot 10^8$	$8,74 \cdot 10^5$	0,61	14,59
120	$7,10 \cdot 10^6$	$8,75 \cdot 10^5$	10,97	14,58

Os resultados obtidos são similares aos apresentados por Göksungur e Gunserç (1999) no cultivo de *L. delbrueckii* também imobilizado em 2 % de alginato de cálcio, provando que o ácido lático é produzido pelas células imobilizadas, e a porcentagem de produção de ácido lático obtido pelas células livres é desprezível. Uma das maneiras de se evitar a saída de células é usar o

recobrimento dos *pellets* formados com quitosana, como fez Zhou et al. (1998), no cultivo de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Nesse estudo, os autores obtiveram uma redução de 100 vezes o número de UFC/mL no meio externo quando o *pellet* foi recoberto. Yoo et al. (1996) realizaram um teste de encapsulação de *L. casei* em alginato de cálcio, alginato de bário, ambos com cobertura de quitosana, no intuito de evitar a saída de células do suporte. Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou o alginato de bário recoberto com a quitosana, pois, além da capa protetora, o Ba^{2+} apresenta maior estabilidade frente a agentes quelantes como fosfato e lactato quando comparado a íons Ca^{2+} .

Já Champagne et al. (1992) apresentaram redução de saída de células diminuindo a população das mesmas na periferia, levando em conta que a saída de células ocorre também pelo fato de haver crescimento de células em colônias nesse local., Nesse estudo, com a espécie *Lactococcus lactis* imobilizada em alginato, três tratamentos foram conduzidos: o primeiro com o tratamento dos *pellets* com etanol (60 %) por 2,5 min, o segundo com $Al(NO)_3$ (0,1 M) estéril por 1 min, e o terceiro com $CaCl_2$ (0,1 M) a 55 °C por 25 min. O tratamento com etanol apresentou diminuição significativa na saída de células do sistema imobilizado em alginato.

Utilizando *pellets* de alumínio, Tango e Ghaly (2002), montaram um sistema de fermentação contínua para produção de ácido láctico pela espécie *Lactobacillus helveticus*. A taxa de saída de células se manteve entre 5 a 10 %. Göksungur, Gündüz e Harsa (2005) obtiveram uma taxa de saída de células de 2,8 %, utilizando imobilização em alginato recoberto de quitosana, com a espécie *L. casei*. Quando se faz o reuso de células imobilizadas para a produção de ácido láctico a taxa de saída de células tende a aumentar devido à degradação do suporte principalmente por ação quelante do próprio ácido láctico (YOO et al., 1996; YAN et al., 2001). Na produção de ácido propiônico pela bactéria *Propionibacterium thoenii*, Rickert, Glatz e Glatz (1998) utilizaram aprisionamento em alginato de cálcio e obtiveram uma taxa de saída de células de 2 %. A avaliação do crescimento de células livres é fundamental para verificar a viabilidade do reuso das células imobilizadas (BRÉANT, JÉZÉQUEL e LEBEAU, 2002).

5.6 Produção de ácido láctico usando alginato 2 % e soro de queijo

Com o objetivo de estudar fontes alternativas de carbono, a lactose, proveniente do soro de queijo foi usada em substituição à glicose do meio MRS no cultivo com células imobilizadas.

A concentração inicial de lactose utilizada foi de 26 g/L. O cultivo foi realizado a 35 °C, pH 6,1; com 4,0 g/L de CaCO₃, e agitação de 150 rpm.

Percebe-se na Figura 23 uma conversão efetiva de lactose em ácido lático em 24 h, chegando a 21,7 g/L de ácido lático, com conversão de lactose em ácido lático ($Y_{p/s}$) igual a 0,83 e produtividade de 0,90 g.L⁻¹.h⁻¹. Os resultados mostram que o alto rendimento se deve ao uso de fontes complexas de nitrogênio, como no caso, o extrato de levedura, extrato de carne e peptona, estabelecidos no meio MRS. A produção de ácido lático a partir de soro de queijo suplementado com minerais e extrato de levedura foi feita por diversos estudos, que obtiveram bons resultados de produção.

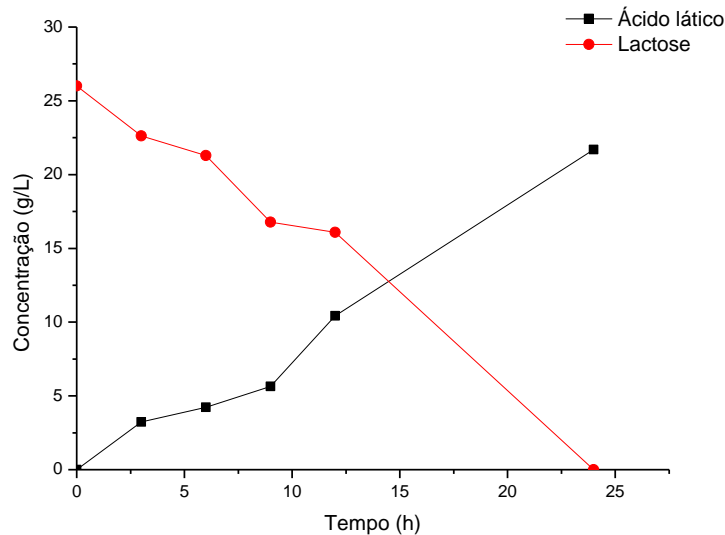


Figura 23. Produção de ácido lático e consumo de lactose por *L. rhamnosus* imobilizado em alginato de cálcio, em meio MRS modificado com lactose.

Günsür (2005) utilizaram soro de leite em pó, extrato de levedura e CaCO₃ como variáveis em um planejamento experimental para estudo de produção de ácido lático por *L. casei* imobilizado em alginato. A melhor condição de produção foi obtida a partir de 147,35 g/L de lactose inicial, 28,81 g/L de extrato de levedura e 97,55 g/L de CaCO₃, resultando em 136,3 g/L de ácido lático após 72 horas de cultivo. Esses resultados expressivos podem ser explicados pelo uso de altas concentrações de extrato de levedura, que contém diversas vitaminas e aminoácidos essenciais para a bactéria, e também pelo uso de alta concentração de CaCO₃, proporcionando o seqüestro do ácido lático produzido, minimizando o efeito de inibição por produto. Altas

concentrações iniciais de açúcar podem ser usadas em cultivo de células imobilizadas, pois quando imobilizadas, as células sofrem menor efeito da alta concentração de substrato como pode ser verificado em diversos estudos (YOO et al., 1996; SENTHURAN et al., 1999; RAO et al., 2009a).

Elezi et al. (2003) obtiveram melhora na produtividade de ácido láctico quando comparados cultivos apenas com lactose como fonte de carbono e com soro de queijo como fonte de carbono, utilizando *L. brevis* imobilizado por adsorção em celulose. Esse resultado indica que o soro possui nutrientes como aminoácidos, capazes de melhorar o rendimento na produção de ácido láctico.

Utilizando aprisionamento em pectina (3 % m/v), Panesar et al. (2007a) realizaram a produção de ácido láctico a partir de soro de queijo suplementado com 0,75 % (m/v) de extrato de levedura e 1,5 % (m/v) de CaCO_3 . A espécie utilizada foi *L. casei*, e a produção foi de 32,95 g/L.

Dembczynski e Jankowski (2002) utilizaram além do extrato de levedura, a triptona, e obtiveram a produção de 45 g/L de ácido láctico com $Y_{p/s}$ de 0,88, também com a espécie *L. rhamnosus* imobilizada em alginato de cálcio. Esse mesmo meio também foi utilizado por Bergmaier, Champagne e Lacroix (2003, 2005) no cultivo para produção de exopolissacarídeos pela espécie *L. rhamnosus*.

Outras fontes alternativas de carbono utilizadas para obtenção de ácido láctico a partir de células imobilizadas são os derivados de celulose. Hemicelulose hidrolisada, como fonte alternativa à glicose no meio MRS, foi utilizada em estudo feito por Givry, Prevot e Duchiron (2008) com imobilização de *L. bifementans* em alginato de cálcio, tendo como resultados de produção e rendimento ($Y_{p/s}$) de, 62,77 g/L e 0,83 respectivamente.

5.7 Avaliação das fontes alternativas de nitrogênio

A fonte de nitrogênio mais adequada para o crescimento de bactérias lácticas e produção de ácido láctico é o extrato de levedura, porém, devido ao alto custo desse insumo, buscam-se fontes alternativas para utilização em processos de larga escala. As fontes de nitrogênio alternativas ao extrato de levedura testadas no presente trabalho foram água de maceração de milho, sulfato de amônio, autolisado de levedura e Pro-Floo[®].

Para o estudo das fontes alternativas de nitrogênio, o meio de cultivo utilizado foi o MRS com fonte de carbono modificada por soro de queijo, na concentração de 50 g/L de lactose e as fontes alternativas de nitrogênio, com concentrações equivalentes ao do meio MRS (Tabela 13). Os cultivos foram conduzidos em 100 mL, a 35 °C, pH ajustado para 6,5, com 4,5 g/L de CaCO₃ e agitação de 150 rpm.

Os melhores resultados de produção de ácido láctico a partir de soro de queijo foram 31,9 g/L e 27,2 g/L; quando se utilizaram água de maceração de milho e Pro-Floo[®], como fonte alternativa de nitrogênio, respectivamente (Figura 24). São parâmetros essenciais para a avaliação de um processo em larga escala a produtividade e o rendimento, em determinados tempos de reação. Os resultados de produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹) e rendimento (Y_{p/s}) estão dispostos na Tabela 19.

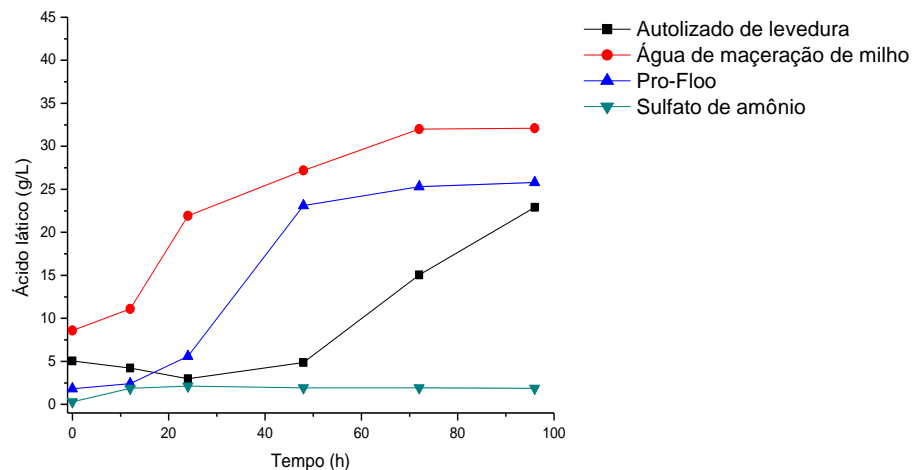


Figura 24. Produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* imobilizada em alginato de cálcio, em fontes alternativas de nitrogênio.

Tabela 19. Produtividade e taxa de conversão no cultivo em diferentes fontes de nitrogênio

	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)		Rendimento (Y _{p/s})	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Água de maceração de milho	0,91	0,57	0,44	0,54
Autolizado de levedura	0,12	0,10	0,06	0,10
Pro-Floo [®]	0,23	0,60	0,11	0,58
Sulfato de Amônio	0,08	0,02	0,04	0,02

A produtividade permite a delimitação do tempo em que a reação está ocorrendo e o rendimento mostra a taxa de conversão do substrato específico usado no produto desejado. A produtividade de ácido lático em 24 h, teve melhor resultado quando se utilizou água de maceração de milho, ficando em torno de $0,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; nesse mesmo tempo a conversão foi de 0,44; contudo, em 48 h, a produtividade passou para $0,57 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e a conversão passou para 0,54. Dado similar de conversão foi obtido quanto utilizado o Pro-Floo[®], no valor de 0,58 em 48 horas de cultivo. Essas duas fontes foram selecionadas para estudos com diferentes concentrações.

Quando utilizado o autolisado de levedura, a produção foi mais lenta e menos efetiva, já ao utilizar uma fonte de nitrogênio inorgânica como o sulfato de amônio, a produção de ácido lático praticamente não ocorreu devido à ausência de vias de síntese de aminoácidos na bactéria estudada, comprometendo assim o crescimento celular e a produção de metabólitos.

A maioria dos estudos de fontes alternativas de nitrogênio para produção de ácido lático com células livres ou células imobilizadas utiliza a água de maceração de milho, que apresenta componentes fundamentais para a fermentação láctica como aminoácidos, vitaminas e sais minerais (Tabelas 4 e 5, do item 3.2). Senthuran et al. (1999) utilizaram como fonte alternativa de nitrogênio a proteína hidrolisada do soro de queijo, em um reator de leito empacotado com reciclo de células. O estudo foi feito com a espécie *L. casei* e a proteína hidrolisada de soro de queijo constituiu uma fonte alternativa ao extrato de levedura, resultando em maior produção de ácido lático. Já o Pro-Floo[®] está começando a ser explorado para esse fim, e apresenta resultados promissores, como visto acima.

5.8 Produção de ácido lático a partir de Pro-Floo[®] como fonte alternativa de nitrogênio.

Para otimização do uso do Pro-Floo[®], utilizou-se diferentes concentrações iniciais (20; 31,7; 50 e 70 g/L). Os cultivos foram conduzidos em 100 mL, a 35 °C, pH ajustado para 6,5, com 4,5 g/L de CaCO_3 e agitação de 150 rpm. O resultado do ácido lático produzido está apresentado na Figura 25. Os dados demonstram que a produção de ácido lático foi efetiva pós 48 horas de cultivo, com produtividade de $0,47 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $Y_{p/s}$ de 0,57 (Tabela 20), para o cultivo com 31,7 g/L de Pro-Floo[®]. Menor concentração da fonte de nitrogênio leva a uma produção tardia, como demonstrado no gráfico para a concentração de Pro-Floo[®] de 20 g/L, em que a produção ocorreu após 72 horas (Figura 25).

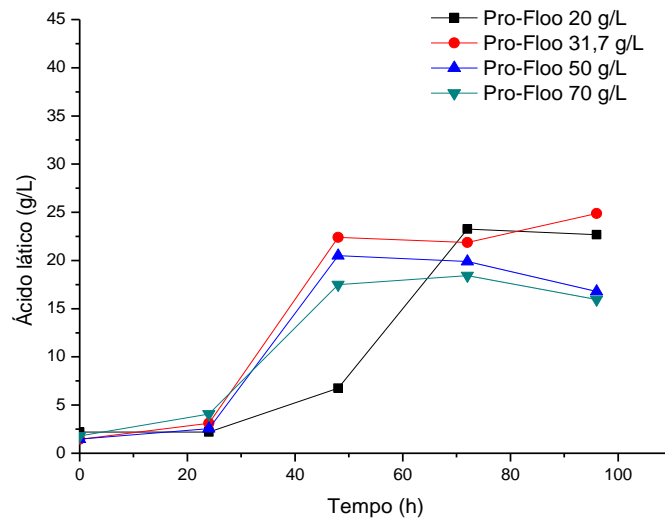


Figura 25. Produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* imobilizada em alginato de cálcio, em diferentes concentrações de Pro-Floo®.

Tabela 20. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico com o uso do Pro-Floo®

	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)		Rendimento ($Y_{p/s}$)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Pro-Floo® - 20 g/L	0,00	0,09	0,01	0,45
Pro-Floo® - 31,7 g/L	0,04	0,47	0,05	0,57
Pro-Floo® - 50 g/L	0,05	0,40	0,08	0,53
Pro-Floo® - 70 g/L	0,04	0,33	0,01	0,41

Pode-se observar na Tabela 20 que o aumento da concentração de Pro-Floo®, acarreta maior produção de ácido láctico, porém, em concentrações acima de 40 g/L, ocorre leve inibição da produção. Isso ocorre, pois em altas concentrações de substrato, no caso o Pro-Floo®, há um desequilíbrio osmótico, causando uma situação de estresse para as células, que passam a ter o metabolismo mais lento.

5.9 Produção de ácido láctico a partir de água de maceração de milho como fonte alternativa de nitrogênio.

Os ensaios utilizando a água de maceração de milho foram realizados nas concentrações de 50, 75, 115 e 165 mL/L, com concentração inicial de lactose a 100 g/L (Figura 26). Os

cultivos foram conduzidos em 100 mL, a 35 °C, pH ajustado para 6,5, com 4,5 g/L de CaCO₃; e agitação de 150 rpm. Na Tabela 21 encontram-se os valores de produtividade e a taxa de conversão de lactose em ácido láctico com o uso da água de maceração de milho como fonte de nitrogênio.

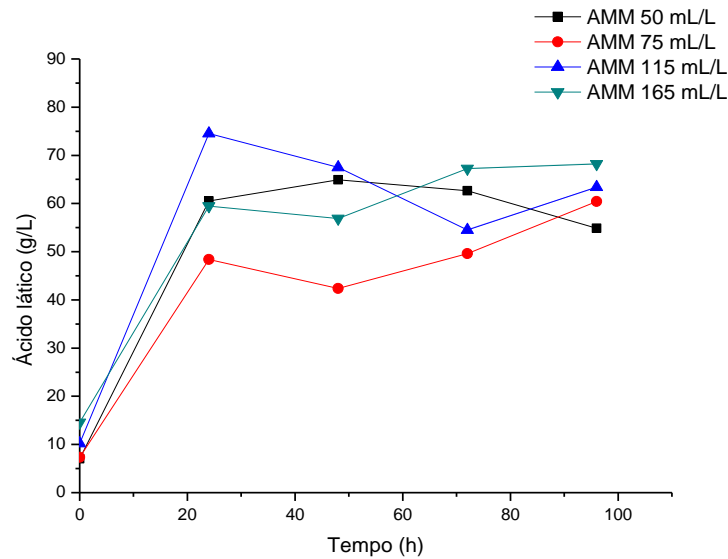


Figura 26. Produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* imobilizada em alginato de cálcio, em diferentes concentrações de água de maceração de milho.

Tabela 21. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico com o uso da água de maceração de milho como fonte de nitrogênio

	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)		Rendimento (Y _{p/s})	
	24 h	48 h	24 h	48 h
AMM – 50 mL/L	2,52	1,35	0,82	0,81
AMM – 75 mL/L	2,02	0,88	0,75	0,44
AMM – 115 mL/L	3,10	1,41	0,88	0,75
AMM – 165 mL/L	2,48	1,19	0,76	0,70

A partir da Figura 26 pode-se observar a produção de ácido láctico de 74,51 g/L em 24 horas de cultivo com 115 mL/L de água de maceração de milho, tendo uma produtividade de 3,1 g.L⁻¹.h⁻¹, e Y_{p/s} 0,88 (Tabela 21). Não houve inibição da produção quando se utilizou altas concentrações de água de maceração de milho. Quando comparada ao Pro-Floo[®], a água de maceração de milho proporcionou maior produtividade e rendimento. Assim, se essas condições

foram mantidas para teste de comparação entre cultivo de células livres e imobilizadas (item 5.10).

5.10 Comparação de produção de ácido lático com células livres e imobilizadas

A partir das condições de cultivo apresentadas no item 4.8 foi feito o teste comparativo de produção de ácido lático por células livres e imobilizadas, com diferentes concentrações de água de maceração de milho. No cultivo de células livres a biomassa obtida da reativação em 100 mL de MRS foi centrifugada e ressuspensa em 100 mL do meio de cultivo. Em contrapartida, o cultivo de células imobilizadas foi feito a partir da imobilização da mesma quantia obtida por reativação em 100 mL em MRS (item 4.4). A concentração inicial de lactose ficou em torno de 110 g/L.

Com relação às fermentações realizadas com células livres, obteve-se 107,89 g/L de ácido lático, com máxima produtividade de 2,25 g/L, a partir de 75 g/L de AMM (Figura 27, Tabela 22), atingindo um rendimento de 0,73 após 48 horas de cultivo. Na Figura 28 estão apresentados os dados do cultivo com células imobilizadas, onde ocorreu um aumento da concentração de ácido lático após 48 horas de cultivo. Nesse cultivo, a maior produção foi de 114,04 g/L de ácido lático, com máxima produtividade de 2,38 g.L⁻¹.h⁻¹, e conversão de 0,72, utilizando 115 g/L de AMM (Tabela 23). As células imobilizadas apresentaram valores similares de produção e produtividade de ácido lático com relação ao cultivo com células livres, demonstrando que o *L. rhamnosus* se manteve estável e viável, imobilizado em matriz de alginato de cálcio, durante o processo fermentativo.

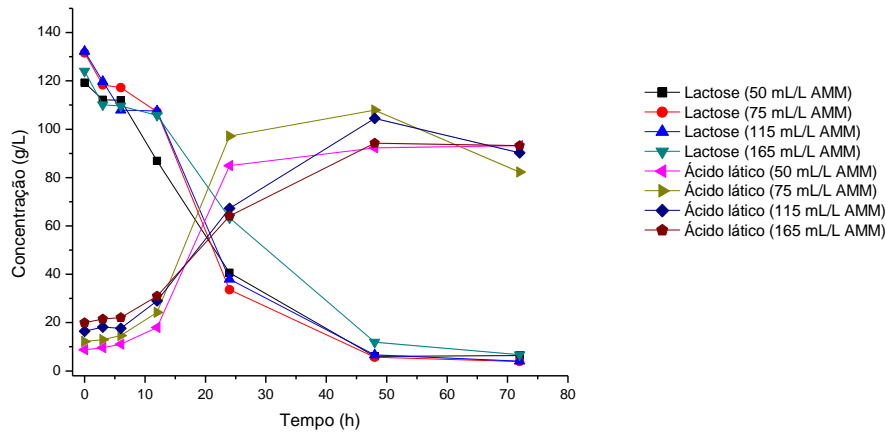


Figura 27. Produção de ácido láctico e consumo de lactose por *L. rhamnosus*, em diferentes concentrações de água de maceração de milho, em cultivo de células livres.

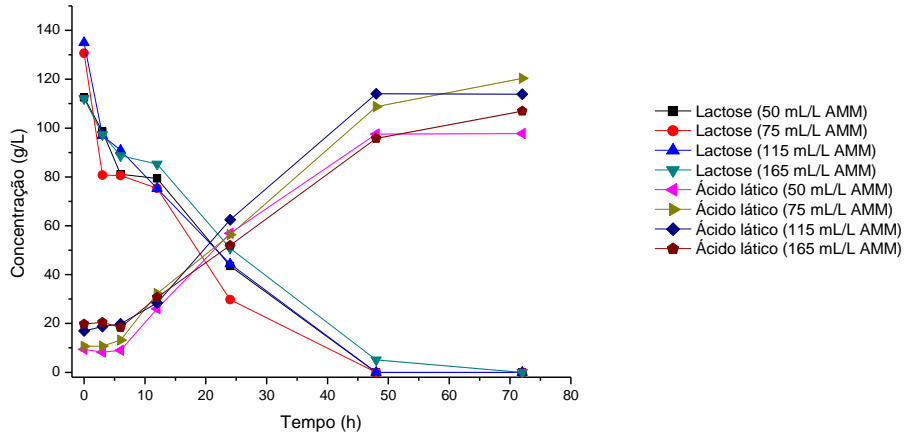


Figura 28. Produção de ácido láctico e consumo de lactose por *L. rhamnosus*, imobilizado em alginato de cálcio, em diferentes concentrações de água de maceração de milho.

Tabela 22. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico no cultivo de células livres

	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)		Rendimento ($Y_{p/s}$)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
AMM – 50 mL/L	3,54	1,92	0,64	0,70
AMM – 75 mL/L	4,05	2,25	0,65	0,73
AMM – 115 mL/L	2,80	2,18	0,38	0,67
AMM – 165 mL/L	2,67	1,96	0,36	0,60

Tabela 23. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido lático no cultivo de células imobilizadas

	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)		Rendimento (Y _{p/s})	
	24 h	48 h	24 h	48 h
AMM – 50 mL/L	2,37	2,03	0,69	0,78
AMM – 75 mL/L	2,35	2,27	0,45	0,75
AMM – 115 mL/L	2,60	2,38	0,50	0,72
AMM – 165 mL/L	2,17	2,00	0,53	0,68

A principal vantagem do sistema imobilizado em relação ao cultivo com células livre é a facilidade do reuso dessas células por uma simples etapa de filtração dos *pellets*, além disso, o caldo fermentado terá o de purificação do produto facilitado quando comparado ao processo com células livres, onde há necessidade de centrifugação das células. O consumo de ácido lático observado após 48 horas de cultivo nas células livres se deve à ação de enzimas que convertem o ácido lático a piruvato, principalmente a lactato oxidase e a própria lactato desidrogenase. Isso ocorre em condições limitantes de substrato, quando o micro-organismo regenera o piruvato para posterior obtenção de energia. Rao et al. (2008a) obtiveram melhora na produção de ácido lático quando utilizaram a imobilização em alginato modificado com ácido succínico quando comparado com o cultivo de células livres. Elezi et al. (2003) apresentou melhores resultados de produção e produtividade de ácido lático com células de *L. brevis* imobilizados por adsorção em celulose deslignificada, quando comparado ao cultivo com células livres.

Diversos estudos de produção de ácido lático por células imobilizadas por aprisionamento obtiveram maiores resultados de produção com relação aos mesmos cultivos com células livres (ROUKAS e KOTZEKIDOU, 1998). Porém, Dembczynski e Jankowski (2002) obtiveram no cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado em alginato, menor produção e produtividade de ácido lático quando comparado com cultivo de células livres. Já Göksungur e Güvenç (1999) obtiveram resultados similares de produção de ácido lático por células de *Lactobacillus delbrueckii* aprisionadas em alginato de cálcio e células livres. Yan et al. (2001) apontaram um efeito da imobilização de células na concentração necessária de extrato de levedura para a produção de ácido lático por *L. amylovorus*. Segundo dados dos autores, o requerimento de extrato de levedura pode ser reduzido de 3,0 para 0,75 % quando se utiliza células aprisionadas em alginato de cálcio.

5.11. Produção de ácido láctico com imobilização em alginato modificado com ácido palmítico

A modificação do alginato foi realizada de acordo com o item (4.5.2). O meio utilizado foi o MRS modificado sem citrato e sem fosfato, com a água de maceração de milho ou Pro-Floo® como fontes alternativas de nitrogênio.

5.11.1 Água de maceração de milho como fonte alternativa de nitrogênio

Os cultivos utilizando imobilização em alginato modificado foram realizados com água de maceração de milho nas concentrações de 50, 75, 115 e 165 mL/L e soro de queijo desproteínizado, ajustado para 100 g/L de lactose inicial., Os resultados estão dispostos na figura 29.

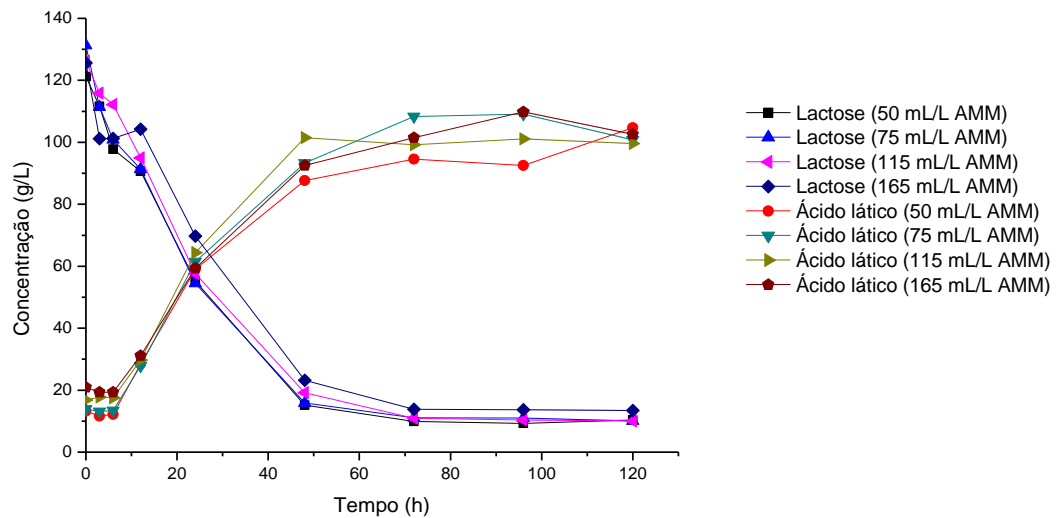


Figura 29. Produção de ácido láctico e consumo de lactose em cultivo com água de maceração de milho e modificação do alginato com ácido palmítico.

Assim como no cultivo utilizando a matriz de alginato sem modificação, as diferentes concentrações de água de maceração de milho utilizadas não influenciaram na produção de ácido láctico. A máxima produção de ácido láctico ocorreu após 48 horas de cultivo (Figura 29), chegando a $2,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de produtividade e 0,79 de rendimento de lactose em ácido láctico, quando utilizado a concentração de 115 mL/L de água de maceração de milho (Tabela 24).

Tabela 24. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico no cultivo de células imobilizadas com água de maceração de milho

	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)			Rendimento ($Y_{p/s}$)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
AMM – 50 mL/L	2,46	1,83	1,31	0,69	0,70	0,73
AMM – 75 mL/L	2,56	1,94	1,50	0,62	0,69	0,79
AMM – 115 mL/L	2,68	2,11	1,38	0,70	0,79	0,72
AMM – 165 mL/L	2,47	1,93	1,41	0,69	0,70	0,72

5.11.2 Pro-Floo[®] como fonte alternativa de nitrogênio

Os cultivos utilizando imobilização em alginato modificado foram realizados com Pro-Floo[®] nas concentrações de 20; 31,7; 50 e 70 g/L e soro de queijo desproteínizado, ajustado para 90 g/L de lactose inicial., Os resultados estão dispostos na figura 30.

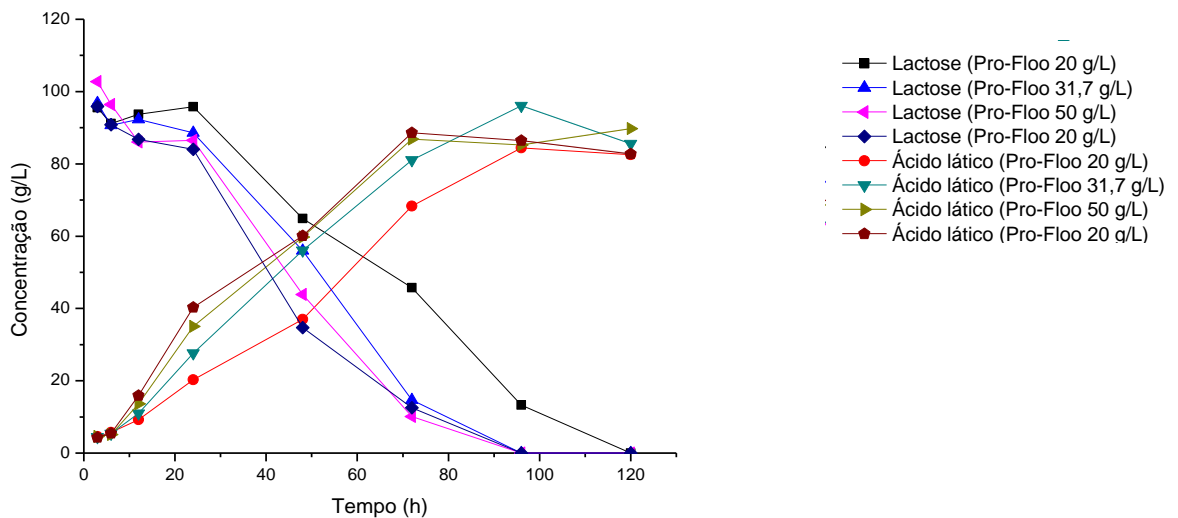


Figura 30. Produção de ácido láctico e consumo de lactose em cultivo com Pro-Floo[®] e modificação do alginato com ácido palmítico.

No cultivo para produção de ácido láctico utilizando a modificação do alginato com ácido palmítico e com Pro-Floo[®] como fonte alternativa de nitrogênio a produção máxima de ácido láctico ocorreu após 72 horas, evidenciando dificuldades de difusão, quando comparado ao cultivo apenas com o alginato comum (Figura 30, Tabela 25).

Tabela 25. Produtividade e taxa de conversão de lactose em ácido láctico no cultivo com Pro-Floo®

	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)			Rendimento (Yp/s)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72h
Pro-Floo 20 g/L	0,85	0,71	0,95	0,51	0,59	0,77
Pro-Floo 31,7 g/L	1,15	1,17	1,13	0,57	0,63	0,79
Pro-Floo 50 g/L	1,46	1,25	1,21	0,51	0,59	0,80
Pro-Floo 70 g/L	1,68	1,25	1,23	0,59	0,67	0,88

Os maiores valores de produção foram 86,85 e 88,6 g/L de ácido láctico, obtidos quando utilizadas as concentrações de 50 e 70 g/L de Pro-Floo® respectivamente, em 72 h. Também em 72 horas de cultivo, os maiores valores de rendimento e produtividade foram obtidos quando utilizada a concentração de 70 g/L de Pro-Floo®, sendo 0,88 e 1,23 g.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente.

Tabela 26. Comparação dos parâmetros de produção de ácido láctico em 48 h

Matriz	Meio de cultivo	Produção (g/L)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (Yp/s)	Conversão (%)
Alginato					
	MRS (24 h)	14,45	0,6	0,72	100
	MRS com soro de queijo (24 h)	21,7	0,9	0,83	100
	MRS com AMM (115 ml/L)	119,04	2,38	0,72	100
	MRS com Pro-Floo® (31,7 g/L)	22,56	0,47	0,57	94,45
Alginato modificado com ácido palmítico					
	MRS com AMM (115 ml/L)	101,45	2,11	0,79	84,76
	MRS com Pro-Floo® (70 g/L)	60,07	1,25	0,67	86,9
Células livres					
	MRS com AMM (75 ml/L)	107,89	2,25	0,73	100

Comparando o rendimento de todos os experimentos realizados pode-se observar que o melhor resultado em rendimento (Yp/s = 0,83) foi obtido no cultivo com lactose como fonte de carbono e as fontes de nitrogênio do MRS, extrato de levedura, peptona e extrato de carne, demonstrando assim a eficácia desses compostos ricos em aminoácidos e vitaminas. Porém, a AMM e o Pro-Floo® se apresentam como excelentes fontes alternativas de nitrogênio, que podem diminuir o custo da produção. Os valores de rendimento obtidos nos cultivos com AMM e Pro-Floo® foram, respectivamente, 0,72 e 0,57. O rendimento obtido em 24 horas com o meio MRS foi de 0,72, evidenciando que a AMM pode substituir as fontes complexas de nitrogênio. O

cultivo com células livres apresentou similaridade com o cultivo com células imobilizadas em todos os parâmetros analisados, como apresentado na Tabela 26 nos cultivos com MRS e AMM. Assim, a imobilização de células apresenta uma alternativa viável ao cultivo com células livres, oferecendo vantagens na etapa de purificação do ácido lático.

Nos cultivos utilizando MSR modificado com lactose, água de maceração de milho e Pro-Floo[®], observa-se, na Tabela 26, uma melhora no rendimento ($Y_{p/s}$) quando se utiliza a modificação do alginato com ácido palmítico. Para esses cultivos, os resultados de $Y_{p/s}$ passaram de 0,72 para 0,79 no cultivo com AMM e de 0,57 para 0,67 no cultivo com Pro-Floo[®]. O efeito do ácido palmítico é aumentar a hidrofobicidade no interior do suporte, para que todo ácido fique no meio externo e não consiga ter contato com as células. Porém, nos cultivos com o alginato modificado com ácido palmítico ocorreu menor conversão do substrato, o que ocasiona perdas consideráveis na etapa de purificação do ácido lático.

Os dados obtidos estão de acordo com experimento feito por Rao et al. (2009a), que utilizaram a espécie *L. delbrueckii*, utilizando 100 g/L de glicose e 68 mL/L de água de maceração de milho como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente. Maiores valores de produção de ácido lático foram obtidos no cultivo com a imobilização em alginato modificado com ácido palmítico, alcançando 80,5 g/L (com alginato sem modificação a produção foi de 63,5 g/L). Com a mesma espécie foi feita a produção de ácido lático com imobilização em alginato modificado com ácido succínico por Rao et al. (2008a), de modo a aumentar a quantidade de grupos carboxilas no interior do suporte, conferindo um efeito tamponante, que resiste à queda do pH no meio. A derivatização do alginato ocasionou um aumento no $Y_{p/s}$ de 0,64, na imobilização apenas com alginato para 0,83, na imobilização com modificação com ácido succínico. Estudo feito por Rao et al. (2008b) demonstra que há maior resistência em bateladas seqüências quando se utiliza o alginato modificado com ácido palmítico. Outro efeito demonstrado pelo autor foi um acréscimo na enantiosseletividade, com a produção de 99 % do enantiômero L-ácido lático a partir da bactéria *L. delbrueckii*.

Na Tabela 27 é possível comparar o melhor resultado do presente experimento com outros dados literais de produção de ácido lático que utilizam tecnologias de imobilização de células. Observam-se valores de rendimento muito similares aos apresentados na literatura, situando o estudo dentro dos principais valores obtidos para produção de ácido lático.

Tabela 27. Produção de ácido láctico por células imobilizadas

Micro-organismo	Imobilização	Substrato	Cultivo	Produção (g/L)	Produtividade (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s}	Referência
Bactérias							
<i>Lactobacillus lactis</i> e <i>L. casei</i>	Aprisionamento em alginato de cálcio	Soro de queijo	Batelada alimentada	46,02	1,91	0,77	ROUKAS E KOTZEKIDOU (1998)
<i>L. delbrueckii</i>	Aprisionamento em alginato de cálcio	Melaço de beterraba	Fermentação contínua	42,71	13,92	0,82	GÖKSUNGUR E GÜVENÇ (1999)
<i>L. helveticus</i>	Adsorção em esferas de alumínio	Soro de queijo	Reator de leito empacotado	75,64	3,92	0,75	TANGO e GHALY (2002)
<i>L. delbrueckii</i>	Aprisionamento em alginato de cálcio modificado com ácido succínico	Glicose	Bateladas consecutivas em erlenmeyer	83,51	0,86	0,83	RAO et al. (2008a)
<i>L. bif fermentans</i>	Aprisionamento em alginato de cálcio	Hidrolisado de farelo de trigo	Batelada	62,77	1,16	0,83	GIVRY, PREVOT e DUCHIRON (2008)
<i>L. salivarius</i>	Adsorção em bucha vegetal	Glicose	Batelada	42,52	1,22	0,85	CHANTAWO NGVUTI et al. (2010)
<i>L. rhamnosus</i>	Aprisionamento em poliacrilamida	Lactose	Batelada	25,22	0,52	0,84	PETROV, PETROV e BESCHKOV (2007)
<i>L. rhamnosus</i>	Aprisionamento em alginato	Soro de queijo	Batelada	21,7	0,9	0,83	Presente trabalho
<i>L. rhamnosus</i>	Aprisionamento em alginato de cálcio modificado com ácido palmítico	Soro de queijo	Batelada	101,45	2,11	0,79	Presente trabalho
Fungos							
<i>Rhizopus oryzae</i>	Adsorção em bucha vegetal	Amido de arroz hidrolisado	Batelada	88,68	1,84	0,74	GANGULY, DWIVEDI e SINGH (2007)
<i>R. oryzae</i>	Aprisionamento em alginato de cálcio	Glicose	Reator de leito fluidizado	82,05	2,55	0,83	LIN et al. (2007)
<i>R. oryzae</i>	Imobilização natural em forma de esferas	Glicose	Reator <i>air lift</i>	77,54	0,99	0,64	MANEEBOON et al. (2010)

5.12 Produção contínua de ácido láctico a partir de cultivo em reator com alginato recoberto com PEI

Para o cultivo em reator de leito empacotado a imobilização foi feita de acordo com o item (4.5.3). O meio de cultivo utilizado foi o MRS modificado, sem fosfato e sem citrato, para evitar a ação quelante desses íons. A temperatura foi mantida a 35 °C utilizando-se circulação de

água proveniente de banho termostático por uma camisa de vidro do reator. Os resultados estão dispostos na Figura 31 e na Tabela 28.

Verifica-se uma considerável conversão de glicose em ácido láctico a partir de 4 h, se estabelecendo em torno de 0,88. O fluxo de meio de cultivo para o reator foi alterado manualmente baseando-se na alteração do pH, por isso observa-se uma taxa de diluição crescente durante o cultivo. Sem o recobrimento dos *pellets* de alginato, houve a diluição do alginato em 12 horas de cultivo e conseqüente lixiviação de células.

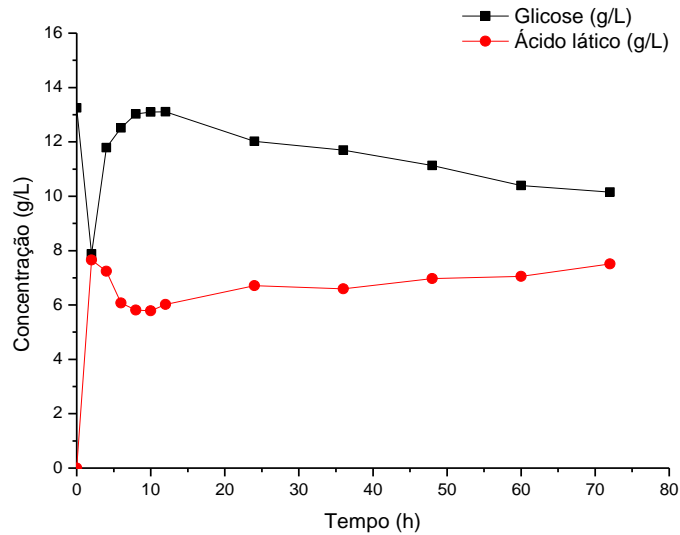


Figura 31. Produção de ácido láctico e consumo de glicose no cultivo contínuo em reator de leito empacotado a 35 °C.

Tabela 28. Dados da fermentação contínua em reator de leito empacotado

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Ácido láctico (g/L)	pH	Fluxo (mL/h)	Taxa de diluição - D (h ⁻¹)	Tempo de residência - σ (h)	Rendimento (Y p/s)
0	13,25	0	6,78	8,4	1,68	0,60	
2	7,88	7,65	5,07	13,8	2,76	0,36	0,63
4	11,79	7,24	4,23	14,4	2,88	0,35	0,88
6	12,51	6,07	4,32	14,4	2,88	0,35	0,81
8	13,03	5,81	4,28	14,4	2,88	0,35	0,83
10	13,1	5,79	4,25	14,4	2,88	0,35	0,84
12	13,11	6,02	4,3	14,4	2,88	0,35	0,87
24	12,02	6,71	4,01	16,8	3,36	0,30	0,84
36	11,7	6,59	4,02	19,2	3,84	0,26	0,79
48	11,13	6,97	3,95	19,2	3,84	0,26	0,79
60	10,39	7,05	4,01	19,2	3,84	0,26	0,73
72	10,15	7,51	3,88	19,2	3,84	0,26	0,76

Com a espécie *L. lactis* em reator de leito empacotado, Sirisansaneeyakul et al. (2007) realizaram a fermentação de ácido láctico com fluxo descendente e reciclo de meio de cultivo para a coluna. A bactéria foi imobilizada pela técnica de encapsulação em membrana de alginato, recoberto com polietilenoglicol. A taxa de diluição foi mantida em $0,5 \text{ h}^{-1}$, e o pH controlado em 6,85, resultando em um rendimento de 0,89.

Para produção de ácido láctico alguns modelos de reatores já foram estudados, como por exemplo, Lamboley et al. (1997) que realizaram o teste com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, imobilizadas em k-carragenato em reator de tanque agitado. Know et al. (2001) utilizaram a espécie *L. rhamnosus* em um reator em membrana acoplado a um reator de tanque agitado, onde a própria bactéria se fixa, resultando em alta densidade de células. A maior produtividade foi alcançada quando se utilizou dois reatores de membrana em série, chegando a $57 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Outro reator em membrana com reciclo de células foi elaborado por Xu et al. (2006) para produção de ácido láctico pela espécie *Lactobacillus paracasei*, onde se obteve produtividade de $31,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Rangaswamy e Ramakrishna (2008) montaram um sistema de imobilização em cubos de espuma de poliuretano, constituindo um reator de leito empacotado com a formação de biofilme no suporte inerte, com um reator de tanque agitado acoplado ao processo. A espécie utilizada foi *Lactobacillus delbrueckii*, em meio de caldo de cana, tendo uma produtividade de $5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e um tempo de efetiva fermentação de 1000 h.

Estudos de fermentação extrativa, onde se utiliza um reator acoplado a um sistema de purificação foram utilizados por Senthuram et al. (2004) com um reator de leito empacotado com a bactéria *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* imobilizada em PEI, acoplado a um sistema de resina de troca iônica para obtenção do ácido láctico. Jung e Lovitt (2010) realizaram a fermentação extrativa com um sistema de produção por imobilização por adsorção, acoplado a um sistema de filtração para a obtenção do ácido láctico, utilizando as espécies *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* e *Bifidobacterium longum*.

Kawaguti et al. (2006) utilizaram o PEI em uma solução de 0,75 % para o recobrimento do alginato para a produção de isomaltulose a partir da bactéria *Erwinia* sp, em um reator de leito empacotado, utilizando como substrato água de maceração de milho e melaço de cana. Também Cheng et al. (2010), utilizaram 0,2 % de PEI em solução para o recobrimento de alginato com a bactéria *Methylibium petroleiphilum* para degradação de metil terc-butil éter (MTBE) em reator de leito fixo. Utilizando um processo de batelada seqüencial para biotransformação de *p p*-metoxi

fenil acetonitrila em *p*-metoxifenilacetico, Chen et al. (2008) utilizaram a estabilização de *Bacillus subtilis* aprisionado em alginato com recobrimento de PEI e tratamento de glutaraldeído. Para produção de etanol, Ghorbani et al. (2011) elaboraram um reator de leito empacotado com células aprisionadas em alginato, com fluxo ascendente de meio de caldo de cana. O sistema apresentou estabilidade por 25 dias de fermentação.

6. Conclusões

Objetivando a redução dos custos de produção de ácido láctico, as fontes alternativas de carbono e nitrogênio utilizadas no experimento foram adequadas e substituíram o meio tradicionalmente utilizado na produção de L-ácido láctico. Considerando a fonte alternativa de carbono utilizada no experimento, o soro de queijo desproteínizado, que tem como principal componente a lactose, além de aminoácidos, representa um ótimo substrato para a produção de L-ácido láctico pela espécie *L. rhamnosus*, atingindo o melhor rendimento dentre todos os ensaios (0,83). Dentre as fontes de nitrogênio estudadas, a água de maceração de milho apresentou melhores resultados de produção (119,04 g/L), produtividade (2,38 g.L.⁻¹h⁻¹) e rendimento (0,72), devido à presença de diversos aminoácidos, vitaminas do complexo B e sais minerais, suprindo as exigências nutricionais da bactéria láctica estudada. O resíduo Pro-Floo[®] pode ser utilizado como fonte alternativa de nitrogênio, apesar de apresentar resultados de produção (22,56 g/L), produtividade (0,47 g.L.⁻¹h⁻¹) e rendimento (0,57) inferiores.

O cultivo com células livres apresentou resultados similares de produção (107,89 g/L), produtividade (2,25 g.L.⁻¹h⁻¹) e rendimento (0,73) ao cultivo com células imobilizadas quando utilizado AMM e soro de queijo. A imobilização de células constitui assim uma importante ferramenta para otimização de processo contínuo de fermentação láctica, e também possibilita o reuso do suporte com alta densidade de células em fermentação de bateladas sequenciais.

A imobilização de células por aprisionamento foi efetiva quando utilizada a concentração de alginato de 2 %, e se manteve estável até o final das fermentações. A utilização do CaCO₃ é necessária para a captação do ácido láctico, que poderia reagir com o alginato, dissolvendo os *pellets*, liberando as células para o meio externo e limitando a atividade das células imobilizadas.

A modificação do alginato com ácido palmítico trouxe melhoras nos rendimentos dos cultivos com AMM e Pro-Floo[®], porém houve sobra de substrato no meio, o que dificulta o processo de purificação do ácido láctico.

O cultivo em reator de leito empacotado, operando em sistema contínuo apresenta a oportunidade de um processo de alta produtividade, além da possibilidade de acoplar um sistema de purificação do ácido láctico. O sistema se manteve estável por 72 horas.

7. Perspectivas futuras

Como perspectiva futura para a produção do ácido láctico faz-se necessária a busca pelos mais diversos resíduos disponibilizados principalmente na agroindústria, levando em consideração a atual possibilidade de utilização desses recursos em processos biotecnológicos. Por exemplo, o uso de bactérias, que sejam capazes de realizar a sacarificação e a fermentação quando se utiliza fontes mais complexas de carbono, como resíduos de amido. Outra fonte alternativa de nitrogênio é a proteína retirada no processo de desproteínização do soro de queijo que é amplamente utilizado como fonte de carbono em meios de cultivos de diversos processos biotecnológicos.

Novos processos contínuos com células imobilizadas podem garantir melhoras significativas na produção e produtividade do ácido láctico. Junto a esses estão os sistemas de fermentação extrativa que associam a produção e purificação simultaneamente. A purificação do ácido láctico representa parte significativa do custo final do produto e são necessários estudos para melhoria dos métodos atuais de purificação do ácido láctico.

8. Referências bibliográficas

AKERBERG, C.; ZACCHI, G. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresour. Technol.** v. 75 p.119-126, 2000.

ALTAF, M.; NAVEENA, B.J.; REDDY, G. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresour. Technol.** v. 98. p.498–503, 2007a.

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. 41. 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. Appl. Microbiol.** v. 103. p.372–380, 2007b.

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 modeling approach. **Comput. Biol. Chem.** v. 33. p.71–83, 2009.

ANDERSSON, U.; MOLENAAR, D.; RADSTRÖM, P.; VOS, W. M. Unity in organisation and regulation of catabolic operons in *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* and *Listeria monocytogenes*. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 28. p.187–195, 2005.

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

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 23/09/2009.

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

AUDET, P.; PAQUIN, C.; LACROIX, C. Sugar utilization and acid production by free and entrapped cells of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, and *L. lactis* in a whey permeate medium. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 55, p.185-189, 1989.

BAI, D. M.; LI, S. Z.; LIU, Z. L.; CUI, Z. F. Enhanced L-(+)-lactic acid production by an adapted strain of *Rhizopus oryzae* using corncob hydrolysate. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 144, n.1. p.79-85, 2008.

BAI, D.; ZHAO, X.; LI, X.; XUB, S. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. **Biochem. Eng. J.** v. 18, p.41–48, 2004.

BECKER, M. R.; PASTER, B. J.; LEYS, E. J.; MOESCHBERGER, M. L.; KENYON, S. G.; GALVIN, J. L.; BOCHES, S. K.; DEWHIRST, F. E.; GRIFFEN, A. L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries **J. Clinical Microb.** v. 40, n. 3, p.1001-1009, 2002.

BERGER, R. E RÜHLEMANN, I. Stable ionotropic gel for cell immobilization using high molecular weight pectic acid. **Acta Biotechnol.** v.8, p. 401 – 405, 2004.

BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C.P.; LACROIX, C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **J. Appl. Microb.** v. 98, p. 272–284, 2005.

BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C.P.; LACROIX, C. Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **J. Appl. Microb.** v. 95, p. 1049–1057, 2003.

BERNFELD, P. E WAN, J. Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. **Science.** v. 142, n. 3593, p. 678–679, 1963.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells. In: BICKERSTAFF, G. F. **Methods in biotechnology**, Vol.1, Humana Press, Scotland, 1996. 367p.

BOROSS, L.; PAPP, P. ; SZAJÁNI. Determination of the growth of gel-entrapped microbial cells at various depths of the alginate gel. In: BONT, J. A. M. **Physiology of immobilized cells**. Vol. 2. Elsevier, Michigan, 1990. 716p.

BRÉANT, D.; JÉZÉQUEL, K.; LEBEAU, T. Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd²⁺: influence of Cd²⁺, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. **Biotechnol. Lett.** v. 24, p. 1237–1241, 2002.

BRIASCO, C. A.; BARBOTIN, J. N.; THOMAS, D. Spatial distribution of viable cell concentration and plasmid stability in gel-immobilized recombinant *E. coli*. In: BONT, J. A. M. **Physiology of immobilized cells**. Vol. 2. Elsevier, Michigan, 1990. 716p.

BRITO, L. C.; VIEIRA, A. M.; LEITÃO, J. G.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J. M.; CABRAL, J. M. S. Effect of the aqueous soluble components of the immobilization matrix on ethanol and microbial exopolysaccharides production. In: BONT, J. A. M. **Physiology of immobilized cells**. Vol. 2. Elsevier, Michigan, 1990. 716p.

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.

BÜYÜKGÜNGÖR, H. Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in K-carrageenan gels. **J. Chem. Technol. & Biotechnol.** v. 53, n.2. p.173 – 175, 1992.

CACHON, R.; ANTÉRIEUX, P.; DIVIÈS, C. The comparative behavior of *Lactococcus lactis* in free and immobilized culture processes. **J. Biotechnol.** v. 63, p.211–218, 1998.

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.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme Microb. Technol.** v. 32, p.553–559, 2003.

CHAMPAGNE, C.P.; BAILLARGEON-CÔTÉ, C.; GOULET, J. Whey fermentation by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii*. **J. Appl. Microbiol.** v.66, n.3, p.175–184, 1989.

CHAMPAGNE, C. P.; GAUDY, G.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. **Appl. Environ. Microbiol.** v.58, n.5. p. 1429-1434, 1992.

CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C.; SODINI-GALLOT, I. Immobilized cell technologies for the dairy industry. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 14, n.2, p.109-134, 1994.

CHAMPOMIER-VERGÈS M. C.; MAGUIN, E.; MISTOU, M. Y.; ANGLADEC, P.; CHICHOD, J. F. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. **J. Chromat.** v. 771. p.329–342, 2002.

CHANG, D.; JUNG, H.; RHEE, J.; PAN, J. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. **Appl. Environ. Microbiol.** v.65, n.4. p.1384–1389, 1999.

CHANTAWONGVUTI, R.; VEERAJETBODITHAT, J.; JATURAPIREE, P.; MUANGNAPOH, C. Immobilization of *Lactobacillus salivarius* atcc 11741 on loofa sponge Coated with chitosan for lactic acid fermentation. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, n 1, p110–116, 2010.

CHENG, Z-W.; CHEN, J-M.; CHEN, D-Z.; ZHANG, L-L. Biodegradation of methyl tert-butyl ether in a bioreactor using immobilized *Methylibium petroleiphilum* PM1 cells. **Water Air Soil Pollut.** v. 214, n. 1, p.59-72, 2010.

CHIBATA, I.; TOSA, T. Use of immobilized cells. **Ann. Rev. Biophys. Bioeng.** v. 10, p.197-216, 1981.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Methods of Cell Immobilization. DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. In **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. American Society for Microbiology. Washington, 1986.

- COVIZZI, L. G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 28, n.2, p. 143-160, 2007.
- DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 81 p.1119–1129, 2006.
- DATTA, R.; TSAI, S.; BONSIGNORE, P.; MOON, S.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiol. Reviews.** v. 16. p.221-231, 1995.
- DAVISON, B. H.; SCOTT, C. D. A proposed biparticle fluidized-bed for lactic acid fermentation and simultaneous adsorption. **Biotechnol. Bioeng.** v. 39, n.3, p.365–368, 1991.
- DENKOVA Z.; KRASTANOV, A.; MURGOV, I. Immobilized lactic acid bacteria for application as dairy starters and probiotic preparations. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v.50, p.107–114, 2004.
- DEMBCZYNSKI, R.; JANKOWSKI, T. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, p.111–115, 2002.
- DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection - Review. **Intern. Dairy J.** v.15, p.973–988, 2005.
- DUTKIEWICZ, S.; GROCHOWSKA-ŁAPIENIS, D.; TOMASZEWSKI, W. Synthesis of Poly(L+) Lactic Acid) by Polycondensation Method in Solution . **Fibres & Textiles.** v. 11, n. 4. p 43, 2003
- ELEZI, O.; KOURKOUTAS, Y.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.; BEZIRTZOGLU, E.; BARNETT, Y. A.; NIGAM, P. Food additive lactic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus brevis* on delignified cellulosic material., **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 5285-5289, 2003.
- FIGUEIREDO, H. M.; PASSOS, F. J. V. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20. **Sitientibus.** n. 28. p.37-50, 2003.
- FRANÇOISE, L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. **Food Microb.** v. 27, p. 698-709, 2010.
- FRASER, J. E.; BICKERSTAFF, G. F. Entrapment in calcium alginate. In: BICKERSTAFF, G. F. **Methods in biotechnology**, Vol.1, Humana Press, Scotland, 1997. 367p.
- FUKUSHIMA, K.; SOGO, K.; MIURA, S.; KIMURA, Y. Production of D-Lactic Acid by Bacterial Fermentation of Rice Starch. **Macromol. Biosci.** v. 4. p.1021–1027, 2004.

GALACTIC (www.latic.com – acesso em 01/09/2010)

GANGULY, R.; DWIVEDI, P.; SINGH, R.P. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. **Bioresour. Technol.** v. 98, p.1246–1251, 2007.

GARBAYO, I.; VÍLCHEZ1, C; VEJA, J.M.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Influence of immobilization parameters on growth and lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* co-immobilized in calcium alginate gel beads. **Biotechnology Letters.** v. 26, p. 1825–1827, 2004.

GARCIA-CRUZ, C. H. FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova.** v.31, n.7, p.1800-1806. 2008.

GARVIE, E. I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiol. Reviews.** v. 44, n. 1, p. 106-139, 1980.

GHALY, E.; TANGO, M. S. A.; ADAMS, M.A. Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. **J. Scient. Resear. Develop.** v.2, n.9. p.1-20, 2003.

GHALY, E.; TANGO, M. S. A.; MAHMOUD, N.S.; AVERY, A.C. Batch propagation of *Lactobacillus helveticus* for production of lactic acid from lactose concentrated cheese whey with microaeration and nutrient supplementation. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20. p.65–75, 2004.

GHORBANIA, F.; YOUNESIA, H.; SARIA, A. E. NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energ.** v. 36, n.2, p.503-509, 2011.

GIVRY, S.; PREVOT, V.; DUCHIRON, F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bif fermentans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 24, p.745–752, 2008.

GÖKSUNGUR, Y.; GÜVENÇ, U. Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** V. 74. p. 131-136, 1999.

GÖKSUNGUR, Y; GÜNDÜZ, M.; HARSA, S. Optimization of lactic acid production from whey by *L casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 80. p.1282–1290, 2005.

GÜNDÜZ, M. Lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized ca-alginate beads. **Tese de mestrado.** 77p. Izmir Institute of Technology, 2005.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Prog. Polym. Sci.** v. 32. p.455–482, 2007.

- GUYOT, J.P.; 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.176–182, 2000.
- HAMER, G. Immobilized microbes: interfaces, gradients and physiology. In: BONT, J. A. M. **Physiology of immobilized cells**. Vol. 2. Elsevier, Michigan, 1990. 716p.
- HAULY, M. C. Influência do NaCl e do NaNO₂ sobre a Fermentação Lática Desenvolvida pelo *Lactobacillus curvatus* em Meio MRS. **Semina: C. Exatas Tecnol.** v. 22. p.37-41, 2001.
- HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, A. S. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melão de cana-de-açúcar. **Semina: C. Agrárias.** v. 24, n. 1. p.133-142, 2003.
- HOFVENDAHL, K. HAHN-HÄGERDAL, B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 20. p.301-307, 1997.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microb. Technol.** v. 26. p.87–107, 2000.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9^aed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994. 787 p.
- HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, n.2. p.254-258, 2007.
- HUANG, L. P.; DONG, T.; CHEN, J. W.; LI, W. Biotechnological production of lactic acid integrated with fishmeal wastewater treatment by *Rhizopus oryzae*. **J. Bioproc Biosystems Eng.** v. 30, n.2. p.135-140, 2008.
- HUANG W-C; TANG, I. C. Bacterial and yeast cultures – process characteristics, products, and applications. In: YANG, S.T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Elsevier. 2007, 185 – 223.
- IDRIS, A.; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Proc. Bioch.** v. 41. p.1117–1123, 2006.
- ISHIDA, N.; SUSUKI, T.; TOKUHIO, K.; NAGAMORI, E.; ONISHI, T.; SAITOH, S.; KITAMOTO, K.; TAKAHASHI, H. D-Lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosc. Bioeng.** v. 101, n.2. p. 172-177, 2006.
- JAHNO, V. D. Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial., **Dissertação de mestrado**. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Minas, Metalúrgica e de Materiais. UFRGS. Porto Alegre, 2005.

JALILI, H.; RAZAVI, H.; SAFARI, M.; AMRANE, A. Kinetic analysis and effect of culture medium and coating materials during free and immobilized cell cultures of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12. **Electron. J. Biotechnol.** v.13, n.3, p.1-10, 2010.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. L(+)-lactic acid recovery from cassava bagasse based fermented medium using anion exchange resins. **Brazilian Archives Biology Technol.** v. 51, n.6. p.1241-1248, 2008.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; PANDEY, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. Genome shuffling: A new trend in improved bacterial production of lactic acid. **Ind. Biotechnol.** v. 6, n. 3, p. 164-169, 2010.

JUNG, I.; LOVITT, R. W. A comparative study of the growth of lactic acid bacteria in a pilot scale membrane bioreactor. **J. Chem. Technol Biotechnol.** v. 85, p.1250–1259, 2010.

JUNTER, G-A. ; COQUET, L.; VILAIN, S.; JOUENNE, T. Immobilized-cell physiology: current data and the potentialities of proteomics. **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, p. 201–212, 2002.

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

KAUFMAN, E. N.; COOPER, S. P. BUDNER, M. K.; RICHARDSON, G. R. Continuous and simultaneous fermentation and recovery of lactic acid in a biparticle fluidized-bed bioreactor. **J. Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 57-58, n.1. p.503-515, 1996.

KATHIRAVAN, M. N.; RANI, R. K.; KARTHICK, R.; MUTHUKUMAR, K. Mass transfer studies on the reduction of Cr(VI) using calcium alginate immobilized *Bacillus* sp. in packed bed reactor. **Bioresour. Technol.** v. 101, p. 853–858, 2010.

KAWAGUTI, H. Y.; BUZZATO, M. F.; ORSI, D. C.; SUZUKI, G. T.; SATO, H. H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. **Process Biochem.** v. 41, p. 2035–2040, 2006.

KIM, H.; WEE, Y.; KIM, J.; YUN, J.; RYU, H. Production of Lactic Acid From Cheese Whey by Batch and Repeated Batch Cultures of *Lactobacillus* sp. RKY2. **Appl. Biochem. and Biotechnol.** v. 132. p.694-704, 2006.

KIM, S.; CHO, S. Y.; KIM, S.H.; SONG, O.; SHIN, I. CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT.** v. 41 p. 493–500, 2008.

KLEEREBEZEM, M. E HUGENHOLTZ, J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. **Current Opinion Biotechnol.** v. 14. p.232–237, 2003.

KLEEREBEZEM, M.; BOELS, I.C.; GROOT, M. N.; MIERAU, I.; SYBESMA, W.; HUGENHOLTZ, J. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modeling. **J. Biotechnol.** v.98. p.199–213, 2002.

KLEIN, J.; VORLOP, K. D. Immobilization techniques – Cells. In: MOO-YOUNG, M.; COONEY, C. L.; HUMPHREY, A. E. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine.** Vol. 2. Pergamon, Michigan, 1985.

KLINKENBERG, G.; LYSTAD, K.Q.; DYRSET, N.; LEVINE, D.W. Cell release of alginate immobilized *L. lactis* ssp. *lactis* immobilized in chitosan and alginate coated beads. **J. Dairy Sci.** v. 89, p. 1118-1127, 2001.

KOLSTAD, J. J.; WITZKE, D. R.; HARTMANN, M. H.; HALL, E. S. NANGERONI, J. Lactic acid residue containing polymer composition and product having improved stability, and method for preparation and use thereof. **US Patent n°6353086**, 2002.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 45, p. 437–447, 2009.

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.

KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS, V.; KALLIS, M.; BEZIRTZOGLU, E.; KANELLAKI, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for Probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Bioch.** v. 40. p.411–416, 2005.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **Int. Dairy J.** v.13, p.3–13, 2003.

KULKARNI, R. K.; MOORE, E. G.; HEGYELI, A. F.; LEONARD, F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. **J. Biomed. Mater. Res.** v. 5, n.3. p.169–181, 1971.

KULKARNI, S. S.; KITTUR, A. A.; ARALAGUPPI, M. I.; KARIDURAGANAVAR, M. Y. Synthesis and characterization of hybrid membranes using poly(vinyl alcohol) and tetraethylorthosilicate for the pervaporation separation of water-isopropanol mixtures. **J. Appl. Polymer Science.** v. 94, n.3. p.1304-1315, 2004.

KULOZIK, U. e WILDE, J. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 24. p.297–302, 1999.

KURILLOVA, L.; GEMEINER, P.; ILAVSKY, M.; STEFUCA, V.; POLAKOVIC, M.; WELWARDOVA, A.; TOTH, D. Calcium pectate gel beads for cell entrapment. IV: Properties of stabilized and hardened calcium pectate gel beads with and without cells. **Biotechnol. Appl. Bioch.** vol. 16, no3, pp. 236-251, 1992.

KWON, S.; YOO, I-K.; LEE, W. G.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K. High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** v.73, n.1, p. 25-34, 2001.

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.

KYLÄ-NIKKILÄ, K.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M.; PALVA, A. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. **Appl. Environm Microbiol.** v. 66, n.9. p. 3835–3841, 2000.

LAMBOLEY, L. ; LACROIX, C. ; ARTIGNAN, J. M. ; CHAMPAGNE, C. P.; VUILLEMARD, J. C Long-term mechanical and biological stability of an immobilized cell reactor for continuous mixed-strain mesophilic lactic starter production in whey permeate. **Biotechnol. Prog.** v. 15, p. 646-654, 1999.

LE-TIEN, C.; MILLETTE, M. ; MATEESCU, M-A. ; LACROIX, m. Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 39, p.347–354, 2004.

LI, Z.; HANA, L.; JI, Y.; WANG, X.; TANA, T. Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. **Biochem. Eng. J.** v. 49, n. 1, p.138-142, 2010

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 sources. **Afr. J. Food Sci.** v. 3, n. 9, p.257-261, 2010.

LIN, J.; ZHOUB, M.; ZHAOB, X.; LUOC, S.; LUC, Y. Extractive fermentation of l-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed. **Chem. Eng. Process.** v. 46, p.369–374, 2007.

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

LIU, X.; CHUNG, Y-K.; YANG, S-T.; YOUSEF, A. E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochem.** v. 40, p.13–24, 2005.

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. **Bioresour. Technol.** v. 100. p.2026–2031, 2009.

LU, Z.; HE, F.; SHI, Y.; LU, M.; YU, L. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. **Bioresour. Technol.** v. 101, n. 10, p.3642-3648, 2010.

- MAAS, R. H. W.; BAKKER, R. R.; JANSEN, M. N. A.; VISSER, D.; JONG, E. ; EGGINK, G.; WEUSTHUIS, R. A. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 78, p.751–758, 2008.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Artmed, Porto Alegre, 2010. 1160 p.
- MAHMOUD D. A. R.; HELMY, W. A. Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production (review article). **J. Appl. Sci. Res.** v.5, n.12, p.2466-2476, 2009.
- MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **J. Appl. Bact.** v. 23. p.130-135, 1960
- MANEEBOON, T.; VANICHSRIRATANA, W.; POMCHAITAWARD, C.; KITPREECHAVANICH, V. Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in 3-1 airlift bioreactor using response surface methodology. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.161, p.137–146, 2010.
- MANSFELD, J.; DAUTZENBERG, H. Immobilization of cells in polyelectrolyte complexes. In: BICKERSTAFF, G. F. **Methods in biotechnology**, Vol.1, Humana Press, Scotland, 1996. 367p.
- 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.
- MILAGRE, C. Estudos visando a síntese enantio e diastereosseletiva de um análogo do resíduo N-terminal de nikkomininas B. **Tese de doutorado**. 203p. Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2007.
- MOBLEY, DP. **Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors**. 1ªed. Hanser Publishers, New York, 2004
- MOLDES, A. B.; ALONSO, J. L.; PARAJO, J. C. Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 76. p.279-284, 2001.
- MORTAZAVIAN, A.; RAZAVI, S. H.; EHSANI, M. R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian J. biotechnol.** v.5, n.1, p.1-18, 2007.
- 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. **Bioch. Eng. J.** v. 40. p.437–444, 2008.

- NAMPOOTHIRI, K. M.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresour. Technology**. 2010.
- NANCIB, A.; NANCIB, N.; MEZIANE-CHERIF, D.; BOUBENDIR, A.; FICK, M.; BOUDRANT, J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Bioresour. Technol.** v. 96. p.63–67, 2005.
- NANCIB, N.; NANCIB.; 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*. **Bioresour. Technol.** v. 78. p.149-153, 2001.
- NAJAFPOUR, G. D. Immobilisation of Microbial Cells for the Production of Organic Acid and Ethanol. In **Bioch. Eng. Biotechnol.** Elsevier. 2007. 421 p.
- NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Elect. J. Biotech.* v.7, n.2, p.167-179, 2004.
- NARITA, J.; NAKAHARA, S.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Efficient Production of L-(+)-Lactic Acid from Raw Starch by *Streptococcus bovis* 148. **J. Biosc. Bioeng.** v. 97, n.6. p.423–425, 2004.
- NAVEENA, B.J.; ALTAF. M.; 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. **Bioresour. Technol.** v. 96. p.485–490, 2005.
- NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J.G. Reduction of yeast extract supplementation in lactic acid fermentation of whey permeate by immobilized cell technology. **J Dairy Sci.** v. 77. p.2494-2508, 1994.
- NUNEZ, M. J. R.; CHAMY, J. M.; LEMA; SANROMAN, A. Enhancement of cell retention for immobilized yeasts in K-carrageenan. p. 283-288. In: BONT, J. A. M; VISSER, J.; MATTIASSON, B.; TRAMPER, J. **Physiology of immobilized cells**. Elsevier, Amsterdam, 1989.
- OGUNBANWO, S. T.; OKANLAWON, B. M. Influence of nutrients utilization and cultivation conditions on the production of lactic acid by homolactic fermenters. **Biotechnol.** v. 8, n.1, p. 107-113, 2009.
- OH, H.; WEE, Y.; YUN, J.; HAN, S. H.; JUNG, S.; RYU, H. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials **Bioresour. Technol.** v. 96. p.1492–1498, 2005.
- OHARA, H. e YAHATA, M. L-lactic acid production by *Bacillus sp.* in anaerobic and aerobic culture. **J. Fermentation Bioeng.** v. 81, n.3. p.272-274, 1996.

- OHKOUCHI, Y.; INOUE, Y. Impact of chemical components of organic wastes on L(+)-lactic acid production. **Bioresour. Technol.** v. 98. p.546–553, 2007.
- OHKOUCHI, Y.; INOUE, Y. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011 **Bioresour. Technol.** v. 97. p.1554–1562, 2006.
- OLIVA-NETO, P.; MENÃO, P. T. P. Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate. **Bioresour. Technol.** v. 100, p.4252–4256, 2009.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Rev. Microbiol.** v. 28, n.1, p.25-31, 1997.
- ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R. M.; GASCÓN, A. R. PEDRAZ, J. L. Encapsulation of cells in alginate gels. In: GUIBAN, J. M.. **Methods in biotechnology**, Vol.2, Humana Press, Scotland, 2004. 439p.
- ORY, I.; CABRERA, G.; RAMIREZ, M.; BLANDINO, A. Immobilization of cells on polyurethane foam. In: GUIBAN, J. M.. **Methods in biotechnology**, Vol.2, Humana Press, Scotland, 2004. 439p.
- 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.
- PAMIES, R.; SCHMIDT, R. R.; MARTÍNEZ, M. C. L.; LA TORRE, J. C. The influence of mono and divalent cations on dilute and non-dilute aqueous solutions of sodium alginates. **Carbohydr. Polymer.** v.80, n.1, p.248-253, 2010.
- PAJIC-LIJAKOVIC, I.; PLAVSIC, M.; BUGARSKI, B.; NEDOVIC, V. Ca-alginate hydrogel mechanical transformations - The influence on yeast cell growth dynamics. **J. Biotechnol.** v. 129, p. 446–452, 2007.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; KOSSEVA, M. R. Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 74. p.35–42, 2007a.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chem.** v. 105, p.1–14, 2007b.
- PATEL, M.; BASSI, A. S.; ZHU, J. J.; GOMA, H. Investigation of a Dual-Particle Liquid–Solid Circulating Fluidized Bed Bioreactor for Extractive Fermentation of Lactic Acid. **Biotechnol. Prog.** v. 24. p.821-831, 2008.
- PENNA, T, C. V. Produção de ácidos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial.** v.3. Gard Blucher Ltda, São Paulo, 2002. 593p.

PESSIONE, A. LAMBERTI, C.; PESSIONE, E. Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria. **Mol. BioSyst.** v. 6, p.1419–1430, 2010.

PETROV, K. K.; YANKOV, D. S.; BESCHKOV, V. N. Lactic acid fermentation by cells of *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in polyacrylamide gel. **W. J. Microb Biotechnol.** v.22, n.4, p. 337-345, 2005.

PETROV, K. K.; PETROV, P. M.; BESCHKOV, V. N. Improved immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in polyacrylamide gel, preventing cell leakage during lactic acid fermentation. **W. J. Microbiol. Biotechnol.** v. 23, p.423–428, 2007.

PILKINGTON, P. H; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A; RUSSELL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **J. Inst. Brewing.** v.104, p.19-31, 1998.

POWELL, L. W. Immobilized biocatalyst technology. In: FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T.. **Microbial enzymes and biotechnology.** 2 ed. Elsevier Applied Science, Michigan, 1990. 472p.

PURAC (www.purac.com – acesso em 02/09/2010)

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 polymer-grade l-lactic acid by a newly isolated *Thermophilic strain bacillus* sp. 2–6. **PloSONE.** v. 4,n.2. p.1-7, 2009.

QIN, X.; WANG, J.; ZHENG, G. Enantioselective resolution of γ -lactam by a whole cell of microbacterium hydrocarbonoxydans (129-9) immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid. **Appl Biochem Biotechnol.** v.162, n.8, p.2345-2354, 2010.

RAMAKRISHNA, S. V.; PRAKASHAM, R. S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Curr. Sci.** v. 77, n.11. p. 87-100, 1999.

RAO, C. S.; PRAKASHAM, R. S.; RAO A. B.; YADAV, J. S. Functionalized alginate as immobilization matrix in enantioselective L(+) lactic acid production by *Lactobacillus delbrucekii*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 149, p.219–228, 2008a.

RAO, C. S.; SHETTY, R.; RAO A. B.; YADAV, J. S. Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus delbrucekii* immobilized in functionalized matrices. **World J. Microbial., Biotechnol.** v. 24, p.1411–1415, 2008b.

RAO, C. S.; PRAKASHAM, R. S.; LAKSMI, C. S.; RAO A. B. Effect of various matrices on *Lactobacillus delbrucekii* cells for optically pure L(+) lactic acid production. **Curr. Trends Biotechnol Pharm.** v. 3, n. 3, p.311–319, 2009a.

RAO, N. N.; LÜTZ, S.; WÜRGES, K.; MINÖR, D. Continuous biocatalytic processes. **Org. Process Res Dev.** v.13, p. 607–616, 2009b.

- RANGASWAMY, V.; RAMAKRISHNA, S. V. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 46, p. 661–666, 2008.
- RICKERT, D. A.; GLATZ, C. E. GLATZ, B. A. Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized propionibacteria. **Enzyme Microb. Technol.** v. 22, p.409–414, 1998.
- RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PARAJÓ, J. C. Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation. **Enzyme Microb. Technol.** v. 34, p.627–634, 2004.
- ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. **Enzyme Microb. Technol.** v. 22. p.199-204, 1998.
- ROUXHET, P. G.; MOZES, N. The microenvironment of immobilized cells: Critical assessment of the influence of surfaces and local concentrations. In: BONT, J. A. M. **Physiology of immobilized cells**. Vol. 2. Elsevier, Michigan, 1990. 716p.
- SAITOH, S.; ISHIDA, N.; ONISHI, T.; TOKUHIRO, K.; NAGAMORI, E.; KITAMOTO, K.; TAKAHASHI, H. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, n.5. .p. 2789–2792, 2005.
- SAKAI, K.; FUJII, N.; CHUKEATIROTE, E. Racemization of L-lactic acid in pH-swing open fermentation of kitchen refuse by selective proliferation of *Lactobacillus plantarum*. **J. Biosc. Bioeng.** v. 102, n. 3. p.227–232, 2006.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3 ed, Marcel Dekker, New York. 2004, 633p.
- SALMON, P. M.; ROBERTSON, C. R. Mass transfer limitations in gel beads containing growing immobilized cells. **J. Theor. Biol.** v. 125, p. 325-332, 1987.
- SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends Biotechnol.** v.26, n.2, p. 100-108. 2008.
- SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **J. Biotechnol.** v. 73. p.61–70, 1999.
- SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; MATTIASSON, B; HATTI-KAUL, R. Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. **Biotechnol. Bioengin.** v.55, n.6, p.841-853, 1997.
- SINGH, S. K.; AHMED, S. U.; PANDEY, A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production – Review. **Process Biochem.** v. 41. p.991–1000, 2006.

- SIRISANSANEYAKUL, S.; LUANGPIPAT, T. ; VANICHSRIRATANA, W.; SRINOPHAKUN, T.; CHEN, H. H-H.; CHISTI, Y. Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 34, p.381–391, 2007.
- SÖDERGARD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Prog. Polym. Sci.** v. 27. p.1123-1163, 2002.
- SOOMRO, A.H., MASUD, T.; ANWAAR, K. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – a review. **Pakistan J. Nutrition.** v. 1, n.1. p.20-24, 2002
- STENBERG, K.; GALBEA, M.; ZACCHI, G. The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of softwood to ethanol. **Enzyme Microb. Technol.** v. 26, n.1. p.71-79, 2000.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy - review article. **Int. J. Food Microb.** v. 36, p. 1-29, 1997.
- SYLDATK, C.; FOOLADI, J.; STOFFREGEN, A.; TACKE, R.; WAGNER, F.; WETTERN, M. Screening for matrices for viable cells. In: BONT, J. A. M. **Physiology of immobilized cells.** Vol. 2. Elsevier, Michigan, 1990. 716p.
- 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. **Biotechnol.** v. 97. p.211–217, 2006.
- TANGO, M. S. A.; GHALY, A. E. A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 58. p.712–720, 2002.
- TANGO, M.S.A.; GHALY, A.E. Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. **Biomass Bioenergy.** v.17 p. 221-238, 1999a.
- 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, 1999b.
- THONGCHUL, N.; NAVANKASATTUSAS, S.; YANG, S-T. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 33, p.407–416, 2010.
- TOMASKA, M.; GEMEINER, P.; MATERLIN, I.; STURDIK, E.; HANDRIKOVA, G. Calcium pectate gel beads for cell entrapment: a study on the stability of *Kluyveromyces marxianus* whole-cell lactase trapped in hardened calcium pectate and calcium alginate gels. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 21, n.3. p.347-356, 1995.
- TRAMPER, J. Conversion by immobilized cells versus traditional fermentations. In: BONT, J. A. M. **Physiology of immobilized cells.** Vol. 2. Elsevier, Michigan, 1990. 716p.

- TROTMAN, R. J.; CAMP, C. E.; BEN-BASSAT, A.; DICOSIMO, R.; HUANG, L.; CRUM, G. A.; SARIASLANI, F. S.; HAYNIE, S. L. Calcium alginate bead immobilization of cells containing tyrosine ammonia lyase activity for use in the production of *p*-hydroxycinnamic acid. **Biotechnol. Prog.** v. 23, p. 638-644, 2007.
- VÁZQUEZ, J. A. E MURADO, M. A. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. **Enzyme Microb. Technol.** v. 43. p.66–72, 2008.
- VOS, W. M. Gene expression systems for lactic acid bacteria. **Ecol. Ind. Microb.** v. 2, p. 289-295, 1999.
- VOS, W. M. e HUGENHOLTZ, J. Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. **Trends Biotechnol.** v.22, n. 2, p. 72-79, 2004.
- WANG, X.; SPENCER, H. G. Calcium alginate gels: formation and stability in the presence of an inert electrolyte. **Polymer.** v. 39, n.13, p.2759-2764,1998.
- 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.
- WEE, Y.; KIM, J.; YUN, J.; RYU, H. Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 35. p.568–573, 2004.
- WILLAERT, R. Cell immobilization and its application in biotechnology: current trends and future prospects. In: EL-MANSI, M.; BRYCE, C. F. A. **Fermentation microbiology and biotechnology.** Vol. 2. CRC/Taylor & Francis, Oxon, 2007. 544p.
- XU, G-Q.; CHU, J.; WANG, Y-H.; ZHUANG, Y-P.; ZHANG, S-L.; PENG, H-Q. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. **Process Biochem.** v. 41, p. 2458–2463, 2006.
- XU, G.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, S. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. **Biochem. Eng. J.** v. 38. p.189–197, 2008.
- YAN, J.; BAJPAI, R.; IANNOTTI, E.; POPOVIC, M.; MUELLER, R. Lactic acid fermentation from enzyme-thinned starch with immobilized *Lactobacillus amylovorus*. **Chem. Biochem. Eng. Q.** v. 15, n.2, p. 59–63, 2001.
- YÁÑEZ, R.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C. D-Lactic acid production from waste cardboard. **J Chem Technol Biotechnol.** v. 80, p.76–84, 2005.
- YANG, C. W.; LU, Z.; TSAO, G.T. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. **J. Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 52, n.1. p. 57-71, 1995.

- YANG, S-T.; HUANG, H.; TAY, A.; QIN, W.; GUZMAN, L.; NICOLASD, E. C. S. Extractive fermentation for the production of carboxylic acids. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**. In YANG, S-T.. Elsevier, 2007. p. 421-446.
- YOO, I.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J.K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. **Enzyme Microb. Technol.** v. 19. p.426-433, 1996.
- YU, L.; LEI, T.; RENA, X.; PEI, X.; FENG, Y. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochem. Engin. J.** v. 39. p.496–502, 2008.
- YUMOTO, I. e IKEDA, K. Direct fermentation of starch to L-(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. **Biotechnol. Letters.** v. 17, n.5. p.543-546, 2004.
- YUN, J.; WEE, Y.; RYU, H. Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enzyme Microb. Technol.** v. 33. p.416–423, 2003.
- ZHANG, Z. Y.; JINA, 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, 2007a.
- ZHANG, Z. Y.; JINA, B.; KELLY, J. M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi - Mini review. **Bioch. Eng. J.** v. 35, p.251–263, 2007b.
- ZHANG, G. Y.; JIN, F. M.; ZENG, X.; CAO, J. L.; WU, B. Research on continuous hydrothermal conversion of glycerin into lactic acid. **J. Hunan University Natural Sciences.** v. 37, n. 7, p. 61-66, 2010.
- ZHOU, Y.; MARTINS, E.; GROBOILLOT, A.; CHAMPAGNE, C. P.; NEUFELD, R. J. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. **J.Appl. Microbiol.** v. 84, p. 342–348, 1998.
- ZHOU, S.; CAUSEY, T. B.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L.O. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. **Appl. Environ. Microbiol.** v.69, n.1. p.399–407, 2003.
- ZHU, Y. Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. In YANG, S-T. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**. Elsevier, 2007. p. 373-396.