



MARÍLIA CRIVELARI DA CUNHA

**PRODUÇÃO DE L(+)-ÁCIDO LÁTICO A
PARTIR DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS POR
Lactobacillus rhamnosus
ATCC 9595**

LAVRAS – MG

2016

MARÍLIA CRIVELARI DA CUNHA

**PRODUÇÃO DE L(+)-ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS POR
Lactobacillus rhamnosus ATCC 9595**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em processos fermentativos rudimentares e industriais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Coorientadora

Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Cunha, Marília Crivelari da.

Produção de l(+)-ácido láctico a partir de subprodutos agroindustriais
por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 / Marília Crivelari da Cunha. –
Lavras : UFLA, 2016.

140 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras,
2016.

Orientador(a): José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

Bibliografia.

1. Farinha de batata. 2. Água de maceração de milho. 3. Ácido láctico.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARÍLIA CRIVELARI DA CUNHA

**PRODUÇÃO DE L(+)-ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS POR
Lactobacillus rhamnosus ATCC 9595**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em processos fermentativos rudimentares e industriais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de fevereiro de 2016.

Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dra. Fabrícia Queiroz Mendes UFV

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Orientador

LAVRAS – MG

2016

Dedico este trabalho aos meus pais,
José Carlos da Cunha e Maria Bernadete Crivelari;
à minha irmã, Mariana Crivelari da Cunha e
ao meu avô, José Crivelari (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela concretização de mais um sonho.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves, pela orientação, paciência, dedicação e amizade. Seus ensinamentos foram de grande relevância para a realização deste trabalho e o meu crescimento profissional.

À professora Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal, pela amizade e ensinamentos, que foram de grande valia para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela colaboração na realização das análises cromatográficas e ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, por se dispor a participar como membro na banca examinadora.

À professora Dra. Fabrícia Queiroz Mendes, da Universidade Federal de Viçosa, pela amizade, conselhos e por me incentivar, desde a graduação, a alcançar os meus sonhos e se dispor a participar na banca examinadora.

Às empresas LNF Latino-Americana e Ingredion Brasil, e à Fundação Oswaldo Cruz, pela doação de materiais para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, em especial Tina, Helô, Aline, Eliane, Creuza e Poliana, pela amizade e ajuda na realização dos experimentos.

Aos funcionários e alunos do Departamento de Biologia, Ivani, Cidinha, Angélica, Gabriela, Karla e Léo, pelo auxílio durante os experimentos e análises.

A todos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Milene, Luana, Carmem, Lorrany, Raí, Mariá, Moisés, Sabrina, Jéssica, Isabella, Deisiany,

Simone e os Andrés, pela amizade, companheirismo e pela enorme ajuda que tive no laboratório. Em especial, a Michelle Thiemi Masotti, pela ajuda durante a condução de todo o experimento e, principalmente, pela amizade e companheirismo dentro e fora da Universidade.

Aos ex-alunos do laboratório, Camily, Mariliana, Aline e Dudu, por sempre estarem disponíveis nos momentos de dúvida e ao pessoal do Núcleo de Estudos de Engenharia de Bioprocessos, Daniel, Marcos, Mariane, Paulo, Nicholas, Taís, Saras, Lohanna, Natália e Alexandre, pela amizade e oportunidades que foram importantes no meu crescimento interpessoal e profissional.

Às minhas amigas desde os tempos de graduação, Camila, Michele, Rhana, Amanda e Renata, pela amizade, conselhos e apoio nos momentos difíceis.

A todos os amigos que tive o privilégio de conhecer durante o período do mestrado, em especial Annayara e Heloísa, amigas e companheiras de estudo, Ronaldo e Francemir, pela amizade e pela ajuda em estatística.

Em especial, agradeço o amor incondicional dos meus pais, José Carlos da Cunha e Maria Bernadete Crivelari e a confiança que depositaram em mim para vencer mais essa etapa da minha vida, e ao companheirismo e amizade de minha irmã, Mariana Crivelari da Cunha.

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O ácido láctico (AL) é empregado nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica, têxtil e de embalagens. Ele pode ser produzido por síntese química e por fermentação. Em processos fermentativos, o custo de meio de cultivo é um dos fatores a ser reduzido. Nesse sentido, o uso de subprodutos agroindustriais, como batata (fonte de carbono) e água de maceração de milho (fonte de nitrogênio), pode ser uma opção economicamente viável. Este trabalho foi realizado com o objetivo de seguir uma estratégia sequencial para a seleção de variáveis da composição do meio de fermentação por meio de um delineamento tipo Plackett-Burman (PB) e a posterior otimização do meio para a produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. Foram substituídas fontes convencionais de carbono e nitrogênio por subprodutos agroindustriais, como excedentes da produção de batata e água de maceração de milho, e foi também realizada a ampliação de escala por meio do uso de biorreator. No PB 12 foram avaliados oito fatores: concentrações de glicose, extrato de levedura, acetato de sódio, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $CaCO_3$ e Tween 80. Apenas $CaCO_3$ foi significativo para a produção de ácido láctico. Na segunda etapa, empregou-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) com fatorial completo 2^3 , a glicose foi substituída pela farinha de batata previamente hidrolisada, o extrato de levedura por água de maceração de milho e foram variadas as concentrações de $CaCO_3$. A maior concentração de AL (183,83 g/L) foi obtida utilizando-se 220 g/L de farinha de batata, 55 g/L de água de maceração de milho e 45 g/L de $CaCO_3$, durante 72 horas, a 37 °C, obtendo-se 2,553 g/L.h de produtividade e 94,2% rendimento. Em biorreator foram produzidos 180,45 g/L de AL, sendo o meio composto por 210 g/L de farinha de batata, 65 g/L de água de maceração de milho e 55 g/L de $CaCO_3$, apresentando produtividade de 2,506 g/L.h e rendimento de 96,7%. Os resultados do presente estudo demonstraram que a utilização de farinha de batata e água de maceração de milho, juntamente com o uso de neutralizantes de acidez, como o $CaCO_3$, para a produção de ácido láctico por fermentação pelo *Lactobacillus rhamnosus*, é viável. O Plackett-Burman, o planejamento composto central e a metodologia de análise de superfície de resposta são métodos eficazes para a melhoria e a otimização de processos fermentativos.

Palavras-chave: Plackett-Burman. DCCR. Farinha de batata. Água de maceração de milho. Ácido láctico.

ABSTRACT

The lactic acid (LA) is used in the food, chemical, pharmaceutical, textile and packaging. The AL can be produced by chemical synthesis, by fermentation. In fermentation processes, the cost of culture medium is one factor to be reduced. In this sense, the use of agro-industrial by-products such as potatoes (carbon source) and corn steep liquor (nitrogen source) can be economically viable options. This study aimed to apply a screening design for selecting composition variables of the fermentation medium through a Plackett-Burman design type (PB) and further optimization of the medium for the production of L (+)-lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 by replacing conventional sources of carbon and nitrogen by agro industrial by-products, excess potato production and corn steep liquor, and a scale-up was also performed using a bioreactor. In PB12 eight factors were evaluated: glucose concentrations, yeast extract, sodium acetate, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $CaCO_3$ and Tween 80. Only $CaCO_3$ was significant for the production of LA. In the second stage, it was used the Central Composite Rotatable Design (CCRD) with full factorial 2^3 , the glucose was replaced by potato flour previously hydrolyzed, the yeast extract was replaced by corn steep liquor and there were several concentrations of $CaCO_3$. The highest concentration of LA (183.83 g/L) was obtained using 220 g/L of potato flour, 55 g/L of corn steep liquor and 45 g/L of $CaCO_3$ during 72 h at 37°C, there was obtained 2.553 g/L.h productivity and 94.2% yield. 180.45 g/L of LA was produced in bioreactor with a medium composed of 210 g/L of potato flour, 65 g/L of corn steep liquor and 55 g/L of $CaCO_3$ presenting productivity of 2,506 g/L.h and yield of 96.7%. The results of this study demonstrated that the use of potato flour and corn steep liquor, with use of acid neutralizing such as $CaCO_3$ for the production of lactic acid by fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* is feasible. The Plackett-Burman, central composite design and response surface analysis methodology are effective methods for the improvement and optimization of fermentation processes.

Keywords: Plackett-Burman. CCRD. Potato flour. Corn steep liquor. Lactic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Estrutura do D(-) e L(+) isômeros do ácido láctico | 20 |
| Figura 2 | As principais vias de fermentação de glicose: (A) de fermentação homolática (glicólise via Embden-Meyerhof-Parnas); (B) de fermentação heterolática (via 6-fosfogluconato/fosfocetolase) | 32 |
| Figura 3 | Fluxograma da produção de milho por via úmida..... | 43 |

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman 12, para a produção de L(+)-ácido láctico por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 | 77 |
| Figura 2 | Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman 12 em relação ao consumo de glicose para a produção de L(+)-ácido láctico por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 | 78 |
| Figura 3 | Cinética de consumo de glicose (%) para cada tratamento do delineamento PB 12 para a produção de L (+)-ácido láctico por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 | 79 |
| Figura 4 | Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman 12 em relação ao fator de crescimento do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 para a produção de L(+)-ácido láctico | 81 |
| Figura 5 | Cinética de crescimento do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595, para cada tratamento do delineamento PB 12, durante o processo fermentativo para a produção de L (+)-ácido láctico | 83 |
| Figura 6 | Evolução do pH, dentre os tratamentos do delineamento PB 12, para produção de L (+)-ácido láctico utilizando <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595..... | 85 |

ARTIGO 2

| | | |
|----------|--|-----|
| Figura 1 | Cinética do crescimento do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 para cada tratamento durante 72 h de fermentação..... | 109 |
| Figura 2 | Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para produção de ácido lático por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595, em função das variáveis AMM e CaCO ₃ | 114 |
| Figura 3 | Consumo de açúcar (%) pelo microrganismo <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 em função da concentração de CaCO ₃ | 117 |
| Figura 4 | Evolução do pH, dentre os tratamentos, para produção de ácido lático por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 durante 72 h..... | 118 |
| Figura 5 | Perfis dos valores preditos e desejabilidade para as respostas de produção de L(+)- ácido lático e consumo de açúcar pelo microrganismo <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595..... | 122 |
| Figura 6 | Cinética do consumo de substrato e produção de L (+)- ácido lático utilizando <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595; (o) glicose e (•) ácido lático..... | 125 |
| Figura 7 | Evolução do pH durante a fermentação em biorreator para produção de L (+)-ácido lático utilizando <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595..... | 125 |
| Figura 8 | Cinética do crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 para produção de L (+)- ácido lático em biorreator | 126 |

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Microrganismos utilizados para produção de ácido láctico..... | 28 |
| Tabela 2 | Pesquisas sobre produção biotecnológica de ácido láctico a partir de matérias-primas de baixo custo | 35 |
| Tabela 3 | Composição centesimal teórica da batata crua e sem casca..... | 39 |
| Tabela 4 | Composição centesimal da água de maceração de milho (AMM) | 45 |
| Tabela 5 | Pesquisas de produção de ácido láctico em fermentação em batelada..... | 47 |

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Variáveis reais analisadas no delineamento Plackett-Burman 12 (PB 12)..... | 72 |
| Tabela 2 | Matriz do Plackett-Burman contendo os valores reais, codificados e as variáveis respostas ácido láctico (g L^{-1}), consumo de glicose (%) e fator de crescimento | 76 |

ARTIGO 2

| | | |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes para produção de ácido láctico por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 | 97 |
| Tabela 2 | Resultados da análise de composição centesimal da batata cv. Ágata e farinha de batata | 105 |
| Tabela 3 | Resultados da análise de composição centesimal da água de maceração de milho..... | 106 |
| Tabela 4 | Matriz do DCCR (valores reais e codificados) e variáveis respostas ácido láctico (g/L), rendimento (%), consumo de glicose (%) e fator de crescimento | 108 |
| Tabela 5 | Coefficientes de regressão para produção de L(+)-ácido láctico e consumo de açúcar por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595..... | 111 |
| Tabela 6 | Coefficientes de regressão, reparametrizados, para produção de L(+)- ácido láctico e consumo de açúcar por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595..... | 112 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Tabela 7 | Análise de variância para produção L(+)- ácido láctico e consumo de açúcar por <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595..... | 113 |
| Tabela 8 | Coefficientes de regressão para rendimento em ácido láctico e fator de crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 | 119 |
| Tabela 9 | Coefficientes de regressão, reparametrizados, para rendimento em ácido láctico e fator de crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 | 120 |
| Tabela 10 | Análise de variância rendimento de ácido láctico em ácido láctico e fator de crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595..... | 121 |
| Tabela 11 | Validação do modelo para produção de L(+)-ácido láctico e consumo de açúcar pelo microrganismo <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 | 123 |

LISTA DE ABREVIATURA

| | |
|----------------|---|
| AMM | água de maceração de milho |
| AR | açúcar(es) redutor(es) |
| AL | ácido láctico |
| BAL | bactéria do ácido láctico ou bactéria láctica |
| CA | consumo de açúcar |
| °C | graus Celsius |
| D (-) | dextrógiro |
| EL | extrato de levedura |
| FB | farinha de batata |
| g/g | grama/grama |
| g/L | grama/litro |
| g/mL | grama/mililitro |
| h | hora (s) |
| ha | hectare |
| <i>L.</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| L (+) | levógiro |
| µm | micrômetros |
| µM | micromolar |
| µL | microlitros |
| min | minuto (s) |
| mM | milimolar |
| mm | milímetros |
| m/v | massa/volume |
| nm | nanômetros |
| PET | politereftalato de etileno |
| rpm | rotação por minuto |
| R ² | coeficiente de determinação |
| t | tonelada |
| UFC/mL | unidades formadoras de colônias/mililitros |
| v/v | volume/volume |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------|---|
| ABBA | Associação Brasileira da Batata |
| ABIMILHO | Associação Brasileira das Indústrias de Milho |
| ANOVA | Análise de variância |
| AOAC | Association of Official Agricultural Chemist |
| DCCR | Delineamento Composto Central Rotacional |
| DBO | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| DNS | Ácido dinitrosalicílico |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| GRAS | Geralmente reconhecido como seguro |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura Aplicada |
| MRS | Mann, Rogosa e Sharpe |
| PB | Plackett Burman |
| PLA | Ácido polilático |
| QV | Química verde |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| | PRIMEIRA PARTE | 17 |
| | INTRODUÇÃO GERAL | 17 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1 | Ácido lático | 20 |
| 2.2 | Aplicações do ácido lático | 21 |
| 2.3 | Química verde | 24 |
| 2.4 | Produção de ácido lático por fermentação | 27 |
| 2.4.1 | Bactérias lácticas | 29 |
| 2.4.2 | Metabolismo de carboidratos | 31 |
| 2.5 | Produção de ácido lático utilizando substratos alternativos | 34 |
| 2.6 | Fontes de carbono | 36 |
| 2.6.1 | Batata | 37 |
| 2.7 | Fontes de nitrogênio | 40 |
| 2.7.1 | Milho | 40 |
| 2.8 | Fermentação em batelada e parâmetros de controle | 46 |
| 2.9 | Planejamento experimental | 48 |
| 2.9.1 | Plackett-burman | 50 |
| 2.9.2 | Delineamento composto central rotacional | 50 |
| | REFERÊNCIAS | 52 |
| | SEGUNDA PARTE- ARTIGOS | 65 |
| | ARTIGO 1 Seleção de componentes do meio de fermentação por delineamento plackett-burman para produção L(+)-ácido lático por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 | 65 |
| | ARTIGO 2 Produção de l(+)-ácido lático por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 utilizando meio com batata, água de maceração de milho e carbonato de cálcio | 89 |

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O ácido láctico (AL) é um ácido orgânico natural que tem atraído muita atenção devido às suas versáteis aplicações, principalmente nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica, têxtil e, ultimamente, na indústria de embalagens. A indústria de alimentos, atualmente, é o principal consumidor deste ácido, que é amplamente utilizado como conservante, acidulante e aromatizante. Contudo, há previsão de aumento da demanda do AL para os próximos anos e esta expansão do mercado se deve, principalmente, à produção de plásticos biodegradáveis, no caso do polímero ácido polilático (PLA), de grande interesse tecnológico, devido às suas aplicações no campo ambiental, como plástico biodegradável e na área biomédica como material biocompatível.

O ácido 2-hidroxiopropanoico, designação química oficial para o AL, é produzido para fins industriais por síntese química ou por fermentação. A síntese química baseia-se na hidrólise de lactonitrila, um derivado petroquímico, por ácidos fortes. Esse processo envolve recursos não renováveis e apresenta custos elevados para a obtenção do AL. A utilização de processos fermentativos é mais vantajosa, devido à utilização de matérias-primas de baixo custo, como subprodutos ou resíduos agroindustriais, além de não requerer a utilização de temperaturas e pressões elevadas e demandar baixo consumo de energia. A via biotecnológica apresenta, também, boa produtividade, além de ser um processo ambientalmente correto, de acordo com os princípios da Química Verde (QV), tendência que norteia o desenvolvimento de processos neste século XXI.

A maior parte de todo o AL produzido no mundo vem do percurso de produção fermentativa por meio da ação de bactérias lácticas e apenas uma pequena porcentagem é produzida a partir da hidrólise da lactonitrila. No entanto, as bactérias lácticas apresentam exigências nutricionais de minerais, vitaminas e peptídeos específicos para garantir o seu crescimento ótimo para a produção do ácido láctico. A utilização de carboidratos refinados é economicamente desfavorável para o processo, por ser uma matéria-prima de alto custo e necessitar de suplementação de nutrientes. Entretanto, a utilização de resíduos da agroindústria como substrato, tais como amido e outros polissacarídeos obtidos a partir do milho, cana-de-açúcar, batata, soro de leite e outras biomassas, representa uma alternativa viável para o processo de obtenção do AL.

A batata é considerada a principal hortaliça produzida no Brasil. Entretanto, é considerável o volume anual de batata descartada como resíduo no Brasil. Essa batata inadequada para comercialização apresenta-se como uma matéria-prima rica em nutrientes, especialmente cálcio, ferro, potássio, fósforo, zinco, vitamina B e fibras e a utilização desta hortaliça em bioprocessos disponibiliza substratos alternativos e resolve os problemas relacionados à disposição inadequada de resíduos sólidos, agregando valor aos mesmos.

A fonte de nitrogênio mais comum para a produção de ácido láctico é extrato de levedura, sendo este adequado para garantir o crescimento das bactérias lácticas. Porém, este nutriente contribui de forma significativa para um aumento dos custos de produção, limitando sua aplicação em processos industriais. Como uma alternativa para extrato de levedura, a água de maceração de milho, um produto secundário obtido a partir do processo de maceração de milho, pode ser uma opção de grande eficácia e economicamente viável, sendo um subproduto rico em proteínas, vitaminas e minerais.

Neste contexto, tem aumentado o interesse pela utilização de subprodutos agroindustriais em bioprocessos, a fim de agregar valor às cadeias produtivas e reduzir os impactos ambientais, tendo em vista tratar-se de uma matéria-prima de baixo custo e altamente renovável que possibilita a redução dos custos de produção de ácido láctico, podendo ampliar a difusão do polímero biodegradável ácido polilático (PLA) no mercado.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a composição do meio de fermentação, seguindo uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais por meio da substituição de fontes convencionais de carbono e nitrogênio por subprodutos agroindustriais para a produção de L (+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. Os resultados deste trabalho foram divididos em dois artigos. No primeiro artigo realizou-se a seleção de nutrientes no meio de fermentação utilizando delineamento Plackett-Burman e, no segundo artigo, objetivou-se a otimização do meio de fermentação por meio do uso da metodologia de análise de superfície de resposta, utilizando batata, água de maceração de milho e carbonato de cálcio e o posterior teste em escala ampliada usando biorreator.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido láctico

O ácido láctico foi descoberto em leite azedo, em 1780, pelo químico sueco Carl Wilhem Scheele que, inicialmente, o considerou um componente do leite (WEE; KIM; RYU, 2006). Em 1789, Lavoisier denominou este componente do leite de *acide lactique*, tornando a possível origem da terminologia atual para ácido láctico. Em 1857, contudo, Pasteur descobriu que não era um componente do leite, mas, sim, um metabólito da fermentação gerado por certos microrganismos (BENNINGA, 1990). Foi o primeiro ácido orgânico a ser produzido comercialmente por fermentação, em 1881 (DATTA; TSAI; BONSIGNORE, 1995).

Ácido láctico, ou ácido 2-hidroxi-propanóico, tem um átomo de carbono quiral e existe em duas formas enantioméricas (Figura 1) (MARTINEZ et al., 2013). A determinação de isomeria é feita de acordo com a sua capacidade de rotação óptica na luz; se a rotação é para a direita, é denominado dextrorrotatório (D) e, se para a esquerda, é levorrotatório (L). Se houver uma mistura de ambos (D e L), então é denominado mistura racêmica (DL) (LIMA et al., 2001).

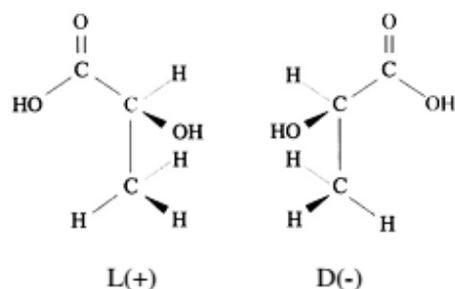


Figura 1 Estrutura do D(-) e L(+) isômeros do ácido láctico
Fonte: Adaptado de Martinez et al. (2013)

O isômero L(+)-ácido láctico é preferido para aplicações farmacêuticas e de alimentos porque é um intermediário do metabolismo normal dos mamíferos sendo, portanto, seguro para a saúde humana (XU et al., 2008). Já o D(-)- ácido láctico é prejudicial para o metabolismo humano e pode resultar em acidose e descalcificação (DATTA; TSAI; BONSIGNORE, 1995), porém, pode ter outras aplicações, como, por exemplo, na indústria química para a produção de plásticos biodegradáveis (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

O ácido láctico pode ser obtido por síntese química ou fermentação de carboidratos. O método de síntese química produz uma mistura racêmica de ácido láctico. Outras rotas possíveis de obtenção do AL são degradação catalisada de açúcares; oxidação de propilenoglicol; reação do acetaldeído, monóxido de carbono e água a temperaturas e pressões elevadas; hidrólise do ácido cloropropiônico e oxidação do ácido nítrico pelo propileno. No entanto, nenhuma destas rotas se mostrou eficiente tecnicamente e viável economicamente para processos industriais (DATTA; TSAI; BONSIGNORE, 1995; NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

2.2 Aplicações do ácido láctico

O ácido láctico (AL) é considerado uma matéria-prima em potencial para muitas aplicações químicas. Atualmente, há quatro grandes categorias para os usos e aplicações de ácido láctico: alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e aplicações químicas (WEE; KIM; RYU, 2006).

Uma vez que o AL é classificado como “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) para utilização como um aditivo alimentar, pela *Food and Drug Administration* (FDA) (DATTA; TSAI; BONSIGNORE, 1995; NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004), é amplamente

utilizado em quase todos os segmentos da indústria alimentícia, na qual é empregado como aditivo, acidulante, flavorizante e aromatizante, além de inibir a esporulação de bactérias em alimentos processados (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004; NAVEENA et al., 2005).

O AL também é muito utilizado em aplicações cosméticas, sendo empregado, principalmente, em hidratantes; auxilia também no clareamento e no rejuvenescimento da pele. É utilizado na indústria farmacêutica em soluções parentais e de diálise que se destinam a repor os fluidos corporais ou eletrólitos. Além disso, este ácido é utilizado numa ampla variedade de preparações de minerais, os quais incluem comprimidos, próteses, suturas cirúrgicas e sistemas de entrega controlada de fármaco (WEE; KIM; RYU, 2006).

O AL e os seus sais são utilizados em vários tipos de produtos e processos químicos. Nesta categoria de aplicações, este ácido orgânico tem as funções de agente de descalcificação, regulador de pH, neutralizador, solvente, agente de limpeza, agente de liberação lenta de ácido, agente complexante de metais, agente antimicrobiano e umectante. Quando se encontra disponível com uma pureza isomérica superior a 98%, é adequada sua aplicação como matéria-prima para a produção de herbicidas e produtos farmacêuticos (WEE; KIM; RYU, 2006). Outra aplicação do ácido láctico e seus derivados, particularmente ésteres de lactato, é na fabricação de solventes verdes, que são chamados dessa forma por não serem tóxicos, não deixarem resíduos no meio ambiente, sendo considerados ambientalmente corretos (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Como o AL apresenta em sua molécula dois grupos funcionais reativos, um carboxílico e outro hidroxílico, pode ser submetido a uma variedade de conversões químicas, o que resulta em produtos químicos potencialmente úteis, tais como óxido de propileno obtido via hidrogenação, acetaldeído obtido via

descarboxilação, ácido acrílico por reação de desidratação, ácido propanoico por reação de redução e 2,3-pentanodiona por reação de condensação e éster de lactato por reação de autoesterificação (LITCHFIELD, 1996; RICHTER; BERTHOLD, 1998; VARADARAJAN; MILLER, 1999).

Desde uma década atrás, o AL tem recebido grande atenção como matéria-prima para a produção do ácido polilático (PLA) (DATTA; HENRY, 2006; REDDY et al., 2008), um polímero sustentável e biodegradável (RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010). A demanda mundial por este ácido é estimada em cerca de 130.000 a 150.000 toneladas (métricas) por ano (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Segundo previsões, a produção deve aumentar significativamente nos próximos anos, principalmente para a produção do ácido polilático e espera-se chegar a 368 mil toneladas em 2017 (ABDELRAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; MARTINEZ et al., 2013).

O polímero PLA apresenta ampla gama de aplicações, tais como roupas de proteção, embalagens de alimentos, filmes encolhíveis, sacos de lixo, recipientes rígidos e bandejas (DRUMRIGHT; GRUBER; HENTON, 2000; VINK et al., 2003). Além disso, os polímeros de ácido lático também podem ser utilizados na medicina, pois apresentam a importante característica de serem biorreabsorvíveis, podendo ser empregados na regeneração de tecidos, suturas, fixações de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, fixação de ligamentos e implantes (SAKATA; RINCON; DUEK, 2004).

Devido à quiralidade do carbono α do ácido lático, é possível a síntese química de compostos enantioméricos, L(+) e D(-) ácido polilático (PLLA e PDLA). Entretanto, o polímero racêmico não apresenta cristalinidade, sendo um material amorfo e com propriedades mecânicas inferiores, quando comparado aos polímeros semicristalinos PLLA ou PDLA, os quais apresentam cristalinidade e propriedades físicas e químicas similares, diferindo apenas pelo seu efeito na luz polarizada (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Logo, a

pureza enantiomérica do ácido lático é fator crucial nas propriedades físicas do PLA (SÖDERGÅRD; STOLT, 2002). Entretanto, o PLLA tem atraído grande atenção devido à sua utilização para inúmeras aplicações na área médica, como biomateriais, devido à sua característica de biocompatibilidade e biorreabsorção (MOTTA; DUEK, 2006).

2.3 Química verde

Desde há muito tempo convivemos com produtos e procedimentos desenvolvidos nas práticas do dia-a-dia que contribuíram para o que hoje conhecemos como Química Moderna, sendo inegável a contribuição dessa ciência nas inúmeras conquistas da Humanidade. Contudo, com o aumento significativo do consumo de bens e matérias-primas e o crescimento acelerado e desordenado das cidades, particularmente após a Segunda Guerra Mundial, rapidamente gerou-se um quadro de degradação ambiental nunca visto. Tal fato se deu devido ao grande incentivo ao desenvolvimento econômico, aliado à falta de consciência com relação à necessidade de investimentos no controle da poluição e da inexistência de uma legislação ambiental pertinente com relação ao descarte de resíduos tóxicos no meio ambiente (FARIAS; FÁVARO, 2011).

A preocupação com os problemas ambientais decorrentes dos processos de crescimento e desenvolvimento pode ser claramente observada, pois, nos últimos anos, cresce continuamente a pressão sobre as indústrias, tanto por meio da sociedade civil como das autoridades governamentais, no sentido de aprimorar o desenvolvimento de processos que sejam cada vez menos prejudiciais ao ambiente (PRADO, 2003).

Introduzido no início da década de 1990, o conceito de química verde vem ganhando cada vez mais notoriedade. Definida, pela IUPAC, como a química que visa à redução ou à eliminação de substâncias tóxicas nas reações

(TUNDO et al., 2000), a química verde tem a preocupação de desenvolver tecnologias e processos incapazes de causar poluição (ANATAS; KIRCHHOFF, 2002). Assim, a adoção deste pensamento científico é umas das iniciativas para a prevenção da poluição desenfreada (PRADO, 2003). Esta filosofia científica incentiva a implantação da química verde no ensino, na prática científica, como também em escala comercial e industrial (TUNDO et al., 2000).

Os princípios da química verde são:

- a) *prevenção*: é melhor prevenir a formação de subprodutos do que tratá-los posteriormente;
- b) *economia de átomos*: os métodos sintéticos devem ser desenvolvidos para maximizar a incorporação dos átomos dos reagentes nos produtos finais desejados;
- c) *sínteses com compostos de menor toxicidade*: sempre que possível, deve-se substituir compostos de alta toxicidade por compostos de menor toxicidade nas reações químicas;
- d) *desenvolvimento de compostos seguros*: os produtos químicos devem ser desenvolvidos para terem a função desejada, apresentando a menor toxicidade possível;
- e) *diminuição de solventes e auxiliares*: a utilização de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, etc.) deve ser evitada quando possível, ou utilizadas inócuas no processo;
- f) *eficiência energética*: os métodos sintéticos devem ser conduzidos sempre que possível à pressão e à temperatura ambiente, para diminuir a energia gasta durante um processo químico que representa um impacto econômico e ambiental;
- g) *uso de substâncias recicladas*: os produtos e os subprodutos de processos químicos devem ser reutilizados sempre que possível;

- h) *uso de redução de derivativos*: a derivação (uso de reagente bloqueadores, de proteção ou desproteção, modificadores temporários) deve ser minimizada ou evitada quando possível, pois estes passos reacionais requerem reagentes adicionais e, conseqüentemente, podem produzir subprodutos indesejáveis;
- i) *catálise*: a aplicação de catalisadores para aumentar a velocidade e o rendimento dos processos químicos;
- j) *desenvolvimento de compostos para degradação*: produtos químicos devem ser desenvolvidos para a degradação inócua de produtos tóxicos, para não persistirem no ambiente;
- k) *análise em tempo real para a prevenção da poluição*: as metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas para permitirem o monitoramento do processo em tempo real, para controlar a formação de compostos tóxicos;
- l) *química segura para a prevenção de acidentes*: as substâncias utilizadas nos processos químicos devem ser escolhidas para minimizar acidentes em potencial, tais como explosões e incêndios (ANANTAS; KIRCHHOFF, 2002; HJERESSEN; SCHUTT; BOESE, 2000; WINTERTON, 2001).

As iniciativas da química verde abrangem todas as áreas da ciência, sempre considerando os princípios fundamentais de sustentabilidade. O desenvolvimento desta química implica:

- a) no uso de reagentes alternativos e renováveis, com o objetivo central de diminuir os reagentes tóxicos e não biodegradáveis no ambiente;
- b) no uso de reagentes inócuos durante o processo de síntese, para evitar perdas indesejáveis, aumentando o rendimento da produção;
- c) na mudança de solventes tóxicos por solventes alternativos;

- d) no melhoramento dos processos naturais, tais como biossínteses e biocatálises;
- e) no desenvolvimento de compostos seguros, isto é, de baixa toxicidade;
- f) no desenvolvimento de condições reacionais para se obter maior rendimento e menor geração de subprodutos e, por final, na minimização do consumo de energia (CLARK, 1999; POLIAKOFF et al., 2002).

2.4 Produção de ácido láctico por fermentação

A produção de AL via processo fermentativo tem como principal objetivo permitir um processo mais efetivo e econômico. A via biotecnológica oferece diversas vantagens, se comparada à síntese química, como, por exemplo, uso de recursos renováveis como substrato, produto com alta especificidade, produção do isômero desejado opticamente puro (D ou L- ácido láctico) (CHAUHAN; TRIVEDI; PATEL, 2007), uma vez que a pureza óptica do AL é importante para a síntese do PLA altamente cristalino (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; KARP et al., 2011; SÖDERGÄRD; STOLT, 2002). Outro benefício desta técnica é o fato de a fermentação requerer baixo consumo energético, sendo conduzida a temperaturas mais brandas (ILMÉM et al., 2007).

Os microrganismos que podem produzir este ácido podem ser divididos em dois grupos: as bactérias e os fungos (WEE; KIM; RYU, 2006). Alguns microrganismos selecionados para investigações da produção biotecnológica de ácido láctico estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 Microrganismos utilizados para produção de ácido láctico

| Microrganismo | Ácido láctico g/L | Rendimento g/g | Produtividade g/L.h | Referência |
|---|------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 | 104,6 | 0,87 | 1,8 | Park, Kosaki e Okabe (1998) |
| <i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 52311 | 83,0 | 0,88 | 2,6 | Zhou et al. (1999) |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 21028 | 41,0 | 0,97 | 1,0 | Fu e Mathews (1999) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> RKY1 | 144,0 | 0,96 | 5,1 | Yun, Wee e Ryu (2003) |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> mutante Uc-3 | 67,0 | 0,83 | 0,93 | Adsul, Varma e Gokhale (2007) |
| <i>Lactobacillus lactis</i> 10-1 | 10,9 | 0,36 | 0,17 | Laopaiboon et al. (2010) |
| <i>Bacillus coagulans</i> 36D1 | 80,0 | 0,8 | 0,3 | Ou, Ingram e Shanmugan (2011) |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ATCC8001, PTCC1332 | 24,6 | 0,81 | - | Fakhravar et al. (2012) |
| <i>Escherichia coli</i> | 50 | 0,90 | 0,60 | Mazumdar et al. (2013) |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 | 24,9 | 0,95 | 0,35 | Alves (2014) |

A maioria das pesquisas de produção de AL utiliza bactérias do ácido láctico, porém, fungos filamentosos, tais como *Rhizopus*, podem usar glicose aerobicamente para produzir este ácido orgânico (KOSAKAI; PARK; OKABE, 1997; TAY; YANG, 2002; ZHOU et al., 1999). Entretanto, existem algumas limitações que devem ser controlados na produção de AL por estripes de *Rhizopus*, tais como a produção de subprodutos indesejáveis, em particular o ácido fumárico e etanol (TAY; YANG, 2002). No entanto, algumas cepas de bactérias lácticas são capazes de produzir ácido láctico como metabólito principal, além de apresentarem alto rendimento e alta produtividade (REDDY et al., 2008).

2.4.1 Bactérias lácticas

As bactérias do ácido láctico (BAL) abrangem um diverso grupo de bactérias gram-positivas não formadoras de esporos. Essas bactérias existem nas formas de cocos ou bacilos, são quimiorganotróficas e crescem em meios complexos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995), devido à sua limitação em sintetizar aminoácidos e vitaminas (REDDY et al., 2008).

As BAL são incapazes de sintetizar o ATP por respiração e têm como principal produto final o ácido láctico proveniente da fermentação de açúcares. A maioria das bactérias lácticas é anaeróbica ou microaerófila, utiliza o ácido pirúvico, o produto final da via de Emdben Meyerhof, para conversão em lactato, é catalase negativa e não apresenta motilidade. Têm alta tolerância a ambientes ácidos e sobrevivem a pH 5 ou menos. Sua tolerância à acidez as torna competitivas em relação às outras bactérias (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

A temperatura ótima de crescimento das BAL varia de acordo com o gênero e está entre 20 a 45 °C (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000;

JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007) e o crescimento ótimo ocorre na faixa de pH entre 5-7 (HOLFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

As BAL pertencem ao filo *Firmicutes*, que é composto por cerca de 20 gêneros. Os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* são os mais estudados entre as bactérias láticas (DAVIDSON et al., 1995; ERCOLINI et al., 2001; HOLZAPFEL et al., 2001; JAY, 2000; STILES; HOLZAPFEL, 1997).

O gênero *Lactobacillus* é o maior dentre os gêneros que compreendem as bactérias láticas, abrangendo cerca de 80 espécies reconhecidas (AXELSSON, 2004). É descrito como um grupo heterogêneo de bastonetes gram-positivos, não formadores de esporos, mesófilos ou termófilos, catalase negativos, anaeróbios ou aerotolerantes (SNEATH; HOLT, 2001; STILES; HOLZAPFEL, 1997). Além disso, apresentam complexas exigências nutricionais, como vitaminas e aminoácidos para o crescimento (STILES; HOLZAPFEL, 1997).

Os *Lactobacillus* são encontrados em alimentos (bebidas, laticínios, carne e vegetais fermentados), em plantas, silagem, esgotos e também nos tratos genital, intestinal e respiratório de homens e animais (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). O gênero *Lactobacillus* é considerado seguro para a produção de ácido láctico industrial, por não apresentar efeitos adversos à saúde de seres humanos (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Lactobacillus rhamnosus

Lactobacillus rhamnosus é uma espécie do grupo das bactérias acidoláticas que se caracteriza como bastonetes curtos gram-positivos e de alta capacidade de acidificação do meio por ação de seu metabolismo por

fermentação de carboidratos e produção de ácido lático. É incapaz de formar esporos e é anaeróbico facultativo, podendo ser mais sensível ao oxigênio e exigindo menor tensão deste para melhorar seu crescimento, e têm uma taxa de temperatura ótima entre 30 e 40 °C (GARRITY, 2005). Este microrganismo foi selecionado previamente no trabalho de Alves (2014), por apresentar boa produtividade de L(+)-ácido lático.

2.4.2 Metabolismo de carboidratos

O metabolismo dos carboidratos pelas bactérias do ácido lático pode ser classificado como homolático ou heterolático. A fermentação homolática, ou glicólise, fornece exclusivamente lactato como produto final. Já a fermentação heterolática segue a rota do fosfogluconato, fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e CO₂ em quantidades equimolares (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002). Grande parte das bactérias do ácido lático homofermentativas consegue converter somente glicose em ácido lático. Em contraste, algumas BAL heterofermentativas são capazes de fermentar tanto hexoses quanto pentoses (GIVRY; PREVOT; DUCHIRON, 2008; ZHU; LEE; ELANDER, 2007).

Fermentação homolática

Este processo realiza-se em duas etapas. No primeiro passo, chamado de glicólise ou via Embden-Meyerhof-Parnas, a glicose é transformada em ácido pirúvico, enquanto, no passo seguinte, este é reduzido para ácido lático pela enzima lactato desidrogenase (MARTINEZ et al., 2013) (Figura 2).

Neste tipo de metabolismo, as BAL fermentam 1 mol de glicose a 2 moles de ácido lático, gerando um rendimento líquido de 2 moles de ATP por molécula de glicose, sendo o ácido lático o produto principal desta fermentação

com rendimento de mais de 0,90 g/g (REDDY et al., 2008; WEE; KIM; RYU, 2006).

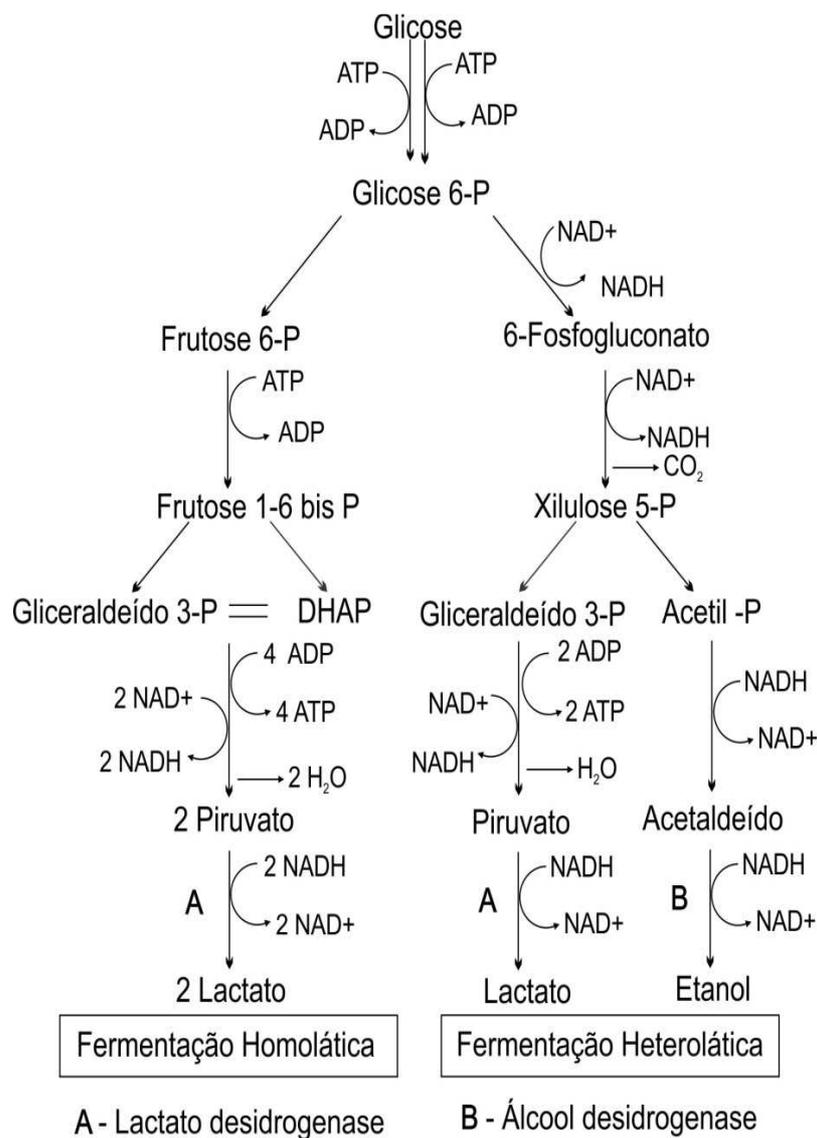


Figura 2 As principais vias de fermentação de glicose: (A) de fermentação homolática (glicólise via Embden-Meyerhof-Parnas); (B) de fermentação heterolática (via 6-fosfogluconato/fosfocetolase)

Fonte: Adaptado Wee, Kim e Ryu (2006)

Microrganismos que utilizam apenas esse caminho para o consumo de carboidratos são chamados de bactérias homofermentativas obrigatórias, as quais incluem, entre outros, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. salivarius* (NIGATU, 2000; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001) e *L. rhamnosus* (KOZHAKHMETOV et al., 2013). Apenas as BAL homofermentativas são utilizadas para a produção comercial de ácido láctico (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; YUN; WEE; RYU, 2003).

Fermentação heterolática

Este processo caracteriza-se pela formação de coprodutos, tais como CO₂, etanol e/ou ácido acético, além de ácido láctico, como produto final da fermentação (MARTINEZ et al., 2013). A relação entre as quantidades de ácido acético e etanol reduz o rendimento teórico do ácido láctico a partir da glicose para 0,50 g/g ou 1,0 mol/mol (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011; MARTINEZ et al., 2013; REDDY et al., 2008).

Neste processo, o primeiro passo da degradação da glicose é chamado de via das pentoses fosfato, produzindo gliceraldeído 3- fosfato, acetil-fosfato e CO₂. O gliceraldeído 3-fosfato entra na glicólise por meio da qual é transformado em ácido láctico, enquanto o acetil-fosfato é convertido em ácido acético e/ou etanol (MARTINEZ et al., 2013). Microrganismos que utilizam esta via metabólica para o consumo de hidratados de carbono são chamados de bactérias heterofermentativas obrigatórias, entre os quais estão *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. parabuchneri* e *L. reuteri* (NIGATU, 2000; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

2.5 Produção de ácido láctico utilizando substratos alternativos

Para que a produção biotecnológica de ácido láctico seja viável, torna-se necessária a utilização de matérias-primas de baixo custo, visando à diminuição nos custos de obtenção (WEE; KIM; RYU, 2006). Há inúmeras pesquisas sobre o desenvolvimento para processos biotecnológicos para a produção de ácido láctico com a utilização de resíduos ou subprodutos de processamento de alimentos. Aproximadamente 3,5 bilhões de toneladas de resíduos agrícolas são produzidos por ano no mundo. Eles provêm de fontes renováveis ricos em nutrientes e a utilização em bioprocessos abre uma gama de possibilidades, agregando valor a estes subprodutos, além de criar uma tecnologia ecológica (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

Para conseguir uma boa produção de ácido láctico as BAL devem ser cultivadas sob condições que garantam o crescimento e a viabilidade celular, pelo qual os nutrientes necessários (carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas) estejam prontamente disponíveis (ROBERTO et al., 2007).

É importante ressaltar que, conforme a matéria-prima e os microrganismos empregados no processo, alguns tratamentos prévios são indispensáveis. A celulose e a hemicelulose necessitam de pré-tratamento físico, seguido de hidrólise química ou enzimática, enquanto em outras matérias-primas (batata, amido de milho, a mandioca e a cevada) apenas um tratamento moderado para solubilização e hidrólise pode ser empregado (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

Vários estudos têm sido realizados (Tabela 2) utilizando diversas matérias-primas para a produção econômica de ácido láctico (BÜYÜKKILECI; HARSA, 2004; KOTZAMANIDIS; ROUKAS; SKARACIS, 2002; YUN et al., 2004).

Tabela 2 Pesquisas sobre produção biotecnológica de ácido láctico a partir de matérias-primas de baixo custo

| Matéria-prima | Microrganismo | Ácido láctico g/L | Produtividade g/L.h | Referência |
|--------------------------|---|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Palha de trigo | <i>Lactobacillus brevis</i> CHCC 2097 e <i>Lactobacillus pentosus</i> CHCC 2355 | 7,1 | - | Nakasaki e Adachi (2003) |
| Batata | <i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33620 | 4,2 | 0,1 | Yun et al. (2004) |
| Soro lácteo | <i>Lactobacillus helveticus</i> R211 | 66,0 | 1,4 | Büyükkileci e Harsa (2004) |
| Farelo de arroz | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> IFO 3202 | 28 | 0,78 | Tanaka et al. (2006) |
| Bagaço de maçã | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 (CECT288) | 32,5 | 5,41 | Gullón et al. (2008) |
| Bagaço de cana-de-açúcar | <i>Lactobacillus lactics</i> 10-1 | 10,9 | 0,17 | Laopaiboon et al. (2010) |
| Manipueira | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> B 103 | 41,6 | 0,86 | Coelho et al. (2010) |
| Melaço | <i>Lactobacillus plantarum</i> LMISM6 | 94,8 | 2,89 | Coelho et al. (2011) |

Grande atenção deve ser dada à adição de resíduos e/ou subprodutos de baixo custo ou outros nutrientes para o meio, pois a remoção de impurezas pode aumentar significativamente os custos das etapas de purificação (BÜYÜKKILECI; HARSA, 2004). Logo, as matérias-primas para a produção de ácido lático devem apresentar as seguintes características: níveis baixos de contaminantes, taxa de produção rápida, alto rendimento, pouca ou nenhuma formação de subproduto, capacidade de ser fermentado com pouco ou nenhum pré-tratamento e disponibilidade durante todo o ano (RYU; YUN; WEE, 2003).

2.6 Fontes de carbono

A maioria dos estudos sobre a produção de L(+)-ácido lático tem se centrado na utilização de substratos puros ou facilmente fermentáveis, tais como glicose, sacarose, maltose ou xilose (ILMÉN et al., 2007; PATEL et al., 2006). Uma das vantagens da utilização de carboidratos refinados é a formação de produtos de maior pureza, o que reduz os custos das etapas posteriores de purificação, porém, são matérias-primas de valor elevado (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Assim, a busca por matérias-primas de baixo custo a serem utilizadas na produção de ácido lático por fermentação visa promover o desenvolvimento de processos mais competitivos (MARTINEZ et al., 2013).

As fontes de carbono mais utilizadas para este fim podem ser classificadas em dois grupos: os monossacarídeos e dissacarídeos e os polissacarídeos. A primeira categoria de fonte de carbono inclui subprodutos da indústria de alimentos, tais como soro lácteo e melaço (KOTZAMANIDIS; ROUKAS; SKARACIS, 2002).

Os substratos que contêm polissacarídeos, na maioria casos, não podem ser diretamente assimilados pelos microrganismos, exigindo um estágio anterior de hidrólise (MARTINEZ et al., 2013), como o uso de materiais

lignocelulósicos que são compostos, principalmente, de celulose, hemicelulose e lignina e representam uma abundante fonte de biomassa (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Nesta última categoria, há também os substratos que abrangem matérias-primas amiláceas, como o sorgo sacarino (RICHTER; BERTHOLD, 1998), o trigo (ÅKERBERG; ZACCH, 2000; HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 1997; OH et al., 2005), o milho (OH et al., 2005; XIAODONG; XUAN; RAKSHIT, 1997), a mandioca (XIAODONG; XUAN, RAKSHIT, 1997), o arroz (OH et al., 2005; YUN et al., 2004), o centeio (RICHTER; BERTHOLD, 1998), a cevada (LINKO; JAVANAINEN, 1996; OH et al., 2005; VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2000) e o amido de batata (CHATTERJEE et al., 1997; XIAODONG; XUAN; RAKSHIT, 1997). Atualmente, as matérias-primas amiláceas são as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de L (+)-ácido láctico (LU et al., 2009).

2.6.1 Batata

A batata (*Solanum tuberosum* L.), conhecida como batatinha ou batata-inglesa, pertence ao gênero *Solanum*, da família *Solanaceae*, e tem mais de 2.000 espécies, embora somente cerca de 150 produzam tubérculos (LOPES; BUSO, 1997). Os tubérculos que podem apresentar coloração variada com película externa clara ou rosada, lisa ou áspera; a polpa pode ser ligeiramente amarelada ou de amarelo intenso. Também podem apresentar coloração creme ou branca, e o formato varia entre alongado ou arredondado. Essas características se referem às cultivares comumente plantadas no Brasil, todas elas pertencentes à subespécie *tuberosum* (FILGUEIRA, 2003).

Aspectos econômicos da batata

A batata é originária dos Andes peruanos e bolivianos, onde é cultivada há mais de 7.000 anos. Atualmente, é o quarto alimento mais consumido no mundo, depois de arroz, trigo e milho (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA - ABBA, 2008). Cultivada em mais de 125 países, em 2014, a produção mundial de batata foi de 240 milhões de toneladas, enquanto no Brasil foram produzidos 3,69 milhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2015). A cultivar Ágata, de origem europeia, é a mais cultivada no Brasil e destaca-se pelo elevado rendimento, precocidade e boa aparência de tubérculos (FERNANDES et al., 2011; PINTO et al., 2010).

A produção vem crescendo, nos últimos anos, em função do aumento do consumo de batata *in natura* e processada. O estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro (33,4%), seguido de Paraná (23,8%) e São Paulo (14,6%). Minas Gerais é, também, o estado de maior produção da região sudeste, com produção de 1.172 mil toneladas, cultivadas em 37 mil ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2015).

Segundo a Associação Brasileira da Batata, o volume anual de batata descartada como resíduo, em todo Brasil, pode chegar a 300 mil toneladas (ABBA, 2007). Além do desperdício durante a industrialização, outra parte dos tubérculos de batata é descartada, por não alcançarem os padrões de comercialização, tanto em tamanho quanto em qualidade (REZENDE et al., 2007), somando também o armazenamento e o transporte inadequados e a demora na venda do produto no varejo (FERREIRA et al., 2007). Assim, nos últimos anos, têm-se despendido de grandes esforços para o aproveitamento dos excedentes das produções agrícolas, dos seus coprodutos e resíduos de

processos, a fim de agregar valores às cadeias produtivas e reduzir impactos ambientais (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Composição química da batata

A composição centesimal da batata crua e sem casca está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 Composição centesimal teórica da batata crua e sem casca

| Constituintes | Batata crua e sem casca |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Água (%) | 82,9 |
| Fibra (%) | 1,2 |
| Calorias (kcal) | 64 |
| Proteína (%) | 1,8 |
| Cinzas (%) | 0,6 |
| Lipídeos (%) | Traços |
| Carboidratos (%) | 14,7 |
| Tiamina (mg) | 0,10 |
| Pirodoxina (mg) | 0,15 |
| Niacina (mg) | Traços |
| Vitamina C (ácido ascórbico) (mg) | 31,1 |
| Cobre (mg) | 0,09 |
| Magnésio (mg) | 15 |
| Manganês (mg) | 0,10 |
| Zinco (mg) | 0,20 |
| Potássio (mg) | 302 |
| Cálcio (mg) | 4 |
| Ferro (mg) | 0,4 |
| Fósforo (mg) | 39 |

Fonte: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentos - NEPA (2011)

A vantagem da utilização de resíduos de batata, em comparação com outros resíduos agroindustriais (por exemplo, cascas de frutos cítricos, beterraba

ou de farelo de trigo), é que esta matéria-prima contém todos os nutrientes necessários para diferentes fermentações (GONZÁLEZ-VARA et al., 1996).

2.7 Fontes de nitrogênio

Os meios de cultivo são usualmente suplementados com extrato de levedura ou peptona, sendo o custo desses nutrientes uma das principais desvantagens para a produção biotecnológica competitiva do ácido láctico (TEJAYADI; CHERYAN, 1995). Em muitos estudos sobre a produção de AL tem sido relatado que a adição de vários nutrientes nos meios e a suplementação com fontes alternativas de proteína levam a uma maior produção deste ácido orgânico. Além disso, a seleção de um nutriente de baixo custo e eficaz tem sido considerado um aspecto importante para a melhoria na produção do ácido láctico (TINOI; RAKARIYATHAM; DEMING, 2005). Pesquisas têm sido realizadas visando à otimização dos nutrientes (FITZPATRICK; O'KEEFFE, 2001; NANCIB et al., 2001), bem como a utilização de água de maceração de milho (MARTINEZ et al., 2013).

2.7.1 Milho

O milho (*Zea mays* L.) pertence ao gênero *Zea* e à família *Poaceae* e é uma planta anual. Sua importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de utilização, desde alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Seu uso na alimentação animal representa a maior parte do consumo e, para a alimentação humana, é caracterizado, principalmente, por derivados (DEMÉTRIO et al., 2008).

A partir do milho, obtêm-se centenas de derivados empregados em várias indústrias, como alimentícia e química (amido, dextrina, glicose, óleo,

margarina, fermento, entre outros), de bebidas (licores, refrigerantes, entre outros), de fermentação (enzimas, acetonas e outros), química e mecânica (fundição de metais, plásticos entre outros) e de rações (CARDOSO et al., 2011).

Aspectos econômicos e processamento industrial do milho

A produção mundial de milho na safra de 2014/15 foi de 991 mil toneladas, com área colhida de 177 mil hectares e produtividade média 5,6 kg/ha, enquanto no Brasil foram produzidas 80 mil toneladas em uma área colhida de 15 mil hectares, alcançando a produtividade média de 5,3 kg/ha (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO - ABIMILHO, 2015).

A industrialização do milho, para a produção de alimentos e outros produtos, é dividida em dois processos: um menos tecnológico, obtendo-se produtos com menor valor agregado, processo de moagem a seco, e outro com ampla aplicação tecnológica, processo de moagem úmida, realizado por grandes empresas, gerando produtos de maior valor agregado (CARDOSO et al., 2011).

Na produção do milho por via úmida (Figura 3), após a limpeza e a secagem, o milho é macerado e separado em germe, fibras e endosperma. A finalidade da etapa de maceração durante o processamento é aumentar a eficiência da separação dos grânulos de amido e proteínas do endosperma por meio da incorporação de água no grão, resultando em maior número de produtos (CARDOSO et al., 2011), com qualidade para uso industrial em geral (têxtil, papel e celulose, adesivos) e na indústria de alimentos, normalmente usado como amido modificado, para melhorar propriedades de vários produtos (GERALDI et al., 2012). Na moagem a seco, o endosperma seco é apenas

fragmentado, sem que ocorra a separação de amido e proteínas (CARDOSO et al., 2011).

Devido à sua importância, a maceração é considerada o coração do processo da moagem úmida. Se não for adequada, as etapas seguintes serão dificultadas e o processo resultará em um aumento da porcentagem de proteína no amido e perda da parte do amido nos demais produtos (CABRALES et al., 2006). Durante esta etapa, os grãos de milho são mantidos em tanques de aço inoxidável com fluxo de água contracorrente a, aproximadamente, 50 °C, durante 24 a 48 horas (CARDOSO et al., 2011).

No processo por via úmida há a adição de sulfito gasoso (0,1~0,2 %) na água de maceração, a fim de ajudar a liberação de compostos solúveis da semente do milho. Ocorre também a produção de ácido lático por meio da fermentação de açúcares por bactérias *Lactobacillus* sp., reduzindo o pH do meio e promovendo condições favoráveis para a separação dos componentes do grão. Ao término do processo, a água de maceração de milho é recuperada por evaporação a vácuo e reutilizada em nova etapa (CARDOSO et al., 2011).

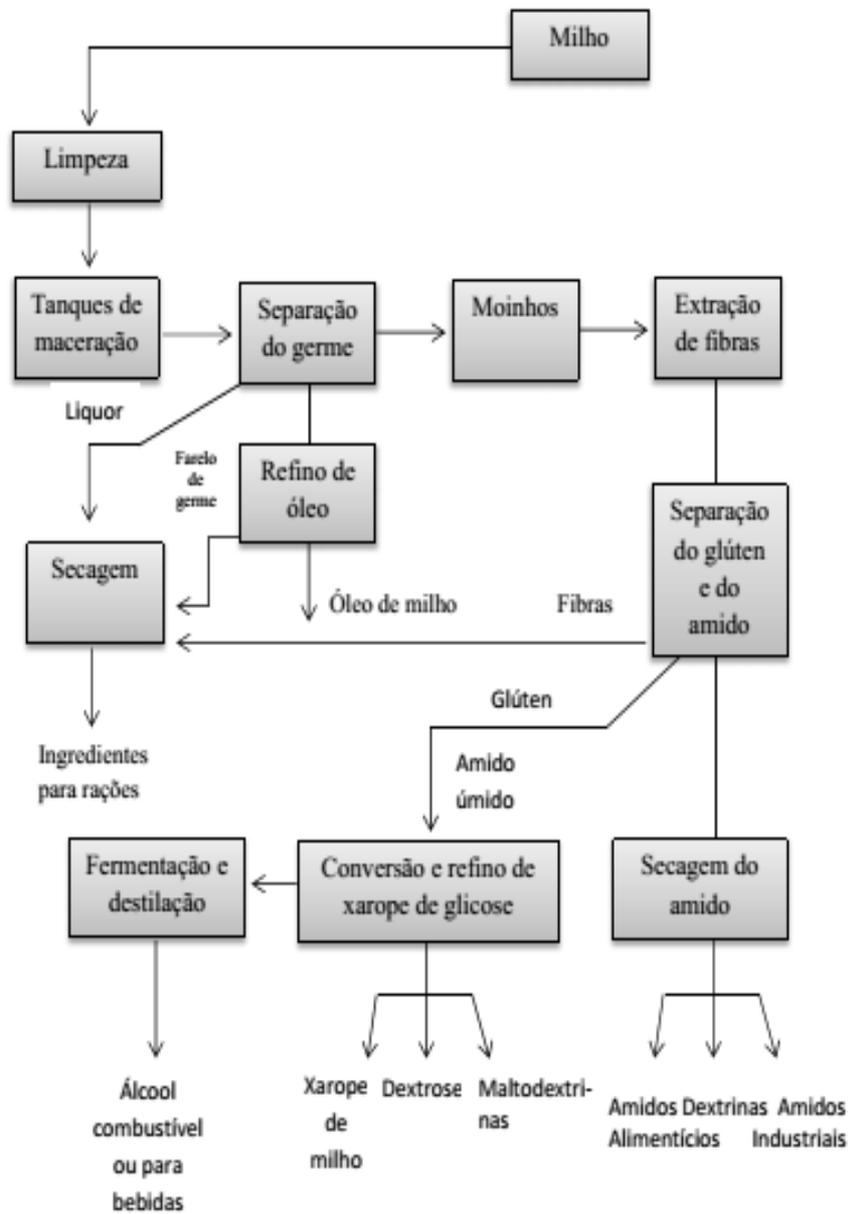


Figura 3 Fluxograma da produção de milho por via úmida
 Fonte: Adaptado de Gerage et al. (1999)

Água de maceração de milho

A água de maceração de milho (AMM), também chamada de milhocina, é um resíduo que apresenta elevada quantidade de matéria orgânica, valores médios de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de cerca de 11.000 mg/L, tornando-se um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias de alimentos (LOSS et al., 2009).

Normalmente, os resíduos agroindustriais são ricos em carboidratos e sua utilização em bioprocessos é limitada, devido à baixa concentração de proteína e à pobre digestibilidade, decorrente da presença de resíduos celulósicos (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Entretanto, a AMM é composta por proteínas, aminoácidos, vitaminas, açúcares redutores, ácidos orgânicos e minerais (CHIANI et al., 2010), como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 Composição centesimal da água de maceração de milho (AMM)

| Propriedades gerais | Valores | Propriedades gerais | Valores |
|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| Proteína | 20,5% | Umidade | 47,5% |
| Carboidratos | 13,22% | Fibras | 1% |
| Lipídeos | 1% | Cinzas | 8,8% |
| Massa seca | 52,5% | pH | 4-5 |
| Brix | 54,5 | | |
| Aminoácidos | Valores | Aminoácidos | Valores |
| Arginina | 3,3% | Glicina | 5,1% |
| Isoleucina | 3,6% | Metionina | 1,9% |
| Treonina | 4% | Leucina | 11,3% |
| Triptofano | 0,2% | Lisina | 2,5% |
| Tirosina | 5,8% | Histidina | 2,8% |
| Cisteína | 1,9% | Valina | 3,4% |
| Fenilalanina | 4,4% | | |
| Minerais | Valores | Minerais | Valores |
| Cálcio | 1% | Potássio | 4,5% |
| Magnésio | 1,5% | Sódio | 0,2% |
| Fósforo | 3,3% | Cloro | 0,18% |
| Enxofre | 0,58% | Ferro | 0,10% |
| Vitaminas | Valores | Vitaminas | Valores |
| Tiamina | 1 mg/kg | Ácido pantotênico | 8 mg/kg |
| Riboflavina | 5 mg/kg | Pirodoxina | 2 mg/kg |
| Niacina | 30 mg/kg | | |

Fonte: Chiani et al. (2010)

A AMM é utilizada como ingrediente para a alimentação animal. Rica em proteínas e minerais (FILIPOVIC; RISTIC; SAKAC, 2002), também é amplamente utilizada, na indústria farmacêutica, como fonte de nitrogênio orgânico para vários metabólitos (GAO; YUAN, 2011).

Pesquisas têm sugerido o uso da AMM para a produção de ácidos orgânicos por via fermentativa (MADDIPATI et al., 2011; PAREKH; FORMANEK; BLASCHEK, 1999), por ser considerada uma fonte econômica de nutrientes para microrganismos (CHIANI et al., 2010).

2.8 Fermentação em batelada e parâmetros de controle

A seleção de processos de fermentação pode variar de acordo com o tipo e a natureza do substrato, o crescimento microbiano e a viscosidade do caldo de fermentação (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013). O ácido láctico é, geralmente, produzido em batelada, porém, vários outros processos são utilizados, como batelada alimentada e processos contínuos (WEE; KIM; RYU, 2006).

A fermentação em batelada é o processo mais simples e muito utilizado, devido à facilidade de operação em que todos os substratos de carbono e outros componentes são adicionados no início da fermentação, exceto os agentes de neutralização para o controle de pH. Este sistema fechado apresenta vantagens, como obtenção de elevada concentração de ácido láctico e redução do risco de contaminação, em comparação com outros métodos de fermentação (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Na Tabela 5 estão listadas pesquisas realizada sobre a produção de ácido láctico em processo de fermentação em batelada.

Tabela 5 Pesquisas de produção de ácido lático em fermentação em batelada

| Substrato | Microrganismo | AL (g/L) | Prod. (g/L.h) | Referência |
|---|--|-------------|------------------|------------------------------|
| Amido de milho | <i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826 | 73,2 | 3,86 | Okano et al. (2009) |
| Palha de milho | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus brevis</i> | 21 | 0,58 | Cui, Li e Wan (2011) |
| Extrato de tubérculo de alcachofra-de-jerusalém | <i>Lactobacillus paracasei</i> KCTC13169 | 92 | 1,2 | Choi et al. (2012) |
| Arroz | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 79,0 | 3,58 | Nakano, Ugwu e Tokiwa (2012) |
| Arroz hidrolisado | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA-04-1 | 82 | 3,73 | Li et al. (2012) |

Vários fatores foram relatados para melhorar a produção de ácido lático obtido pelo processo de fermentação em batelada, como controle de pH por agentes neutralizantes (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

O aumento da concentração de ácido lático no meio de fermentação, por meio da diminuição do pH, é considerada uma forma de inibição para as BAL durante a produção deste ácido. Neutralizar o ácido lático durante a fermentação, por meio da formação de sal de lactato com a adição de agentes neutralizantes, tais como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio ou uma solução de amônio, é uma forma de superar parcialmente a inibição e melhorar a eficácia do processo fermentativo (ABDEL-RAHMAN et al., 2011a, 2011b; ADSUL; VARMA; GOKHALE, 2007; QIN et al., 2010; TASHIRO et al., 2011).

Em alguns estudos foi relatado que agentes de neutralização podem aumentar o rendimento de ácido lático e produtividade em fermentação em batelada (NAKANO; UGWU; TOKIWA, 2012; QIN et al., 2010; TASHIRO et

al., 2011). Hetényi, Németh e Sevela (2011) testaram cinco compostos diferentes para controlar o pH, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, dimetilamina, trimetilamina e carbonato de cálcio. Trimetilamina provou ser o melhor agente de neutralização, embora a utilização de hidróxido de amônio também seria aconselhável, a partir do ponto de vista tecnológico.

Em pH de 6,5, por meio da adição controlada de hidróxido de sódio, *L. paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121 produziu concentrações elevadas de L(+) ácido láctico 192 g/L, com produtividade de 3,99 g/L.h e rendimento de 0,96 g/g, a partir de 200 g/L glicose (MOON; WEE; CHOI, 2012). Em outro estudo, obteve-se produtividade de D(-) ácido láctico de 1,67 g/ L.h, utilizando-se NH₄OH e 1,3 g/L.h, e NaOH pela cepa de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41 (TASHIRO et al., 2011). Nakano, Ugwu e Tokiwa (2012) relataram que cations bivalentes (Ca²⁺) são melhores do que cátions monovalentes (Na⁺ e NH³⁺), como agentes de neutralização para a produção de ácido láctico de *L. delbrueckii* JCM1106 de arroz.

2.9 Planejamento experimental

O desenvolvimento de um meio econômico para a produção de metabólitos microbianos requer a seleção de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, metais e os nutrientes requeridos, assim como a otimização da concentração de cada ingrediente do meio (CHAUHAN; TRIVEDI; PATEL, 2007). Métodos estatísticos podem e devem ser utilizados para a otimização de meio de cultura (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

O planejamento experimental é uma das técnicas que atualmente vêm sendo utilizada em grande escala. Por meio desse método, podem-se determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultado redução da variação do processo, melhor

concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos, redução do tempo do processo, redução do custo operacional e melhoria do rendimento do processo (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

A escolha do planejamento adequado é função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo, da disponibilidade de matéria-prima, da viabilidade do número de ensaios que podem ser realizados e do custo do processo em estudo (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Quando o número de fatores é muito grande, é conveniente escolher, primeiramente, um fatorial fracionado que reduz o número de ensaios. Dessa forma, todo o tempo e recurso para o desenvolvimento da pesquisa não são gastos diretamente num primeiro planejamento porque, muitas vezes, o processo está longe das condições ótimas. Assim, a utilização sequencial de fatoriais fracionados, por meio da análise dos efeitos e a posterior utilização de um delineamento fatorial completo, pode direcionar as condições otimizadas (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

De acordo com Rodrigues e Iemma (2014), a estratégia sequencial é dividida em três etapas. Na primeira etapa, os autores sugerem a seleção de variáveis por meio de fatorial fracionado ou de Plackett Burman (PB), sendo aplicado quando se têm muitos fatores e pouco conhecimento do processo. Na segunda etapa é realizada a otimização por meio de um fatorial completo ou delineamento composto central rotacional (DCCR), quando se deseja construir modelos preditivos a partir de poucos fatores, dentro de uma região ótima. Na terceira etapa, é realizada a validação das condições otimizadas, quando se

deseja confirmar experimentalmente os resultados obtidos pela análise de superfície de resposta. Neste caso, as condições já estão otimizadas e definidas.

2.9.1 Plackett-Burman

A triagem de componentes utilizando-se o delineamento Plackett-Burman é extremamente útil em estudos preliminares, a fim de identificar os fatores mais importantes que podem influenciar o processo. A principal vantagem desse delineamento experimental é o de oferecer a possibilidade de um número elevado de parâmetros, utilizando-se um número relativamente pequeno de experiências (PLACKETT; BURMAN, 1946). Por exemplo, um experimento utilizando o delineamento PB 12 permite estudar o efeito de até 11 fatores. Em comparação, com dois níveis fatoriais completos, exigem-se 32 tratamentos para 5 fatores e 64 para 6 fatores, etc. (OLIVIERI; MAGALLANES, 2012). O modelo não descreve a interação entre os parâmetros porque se baseia em um modelo polinomial de primeira ordem (PLACKETT; BURMAN, 1946).

2.9.2 Delineamento composto central rotacional

A metodologia de análise de superfície de resposta é uma técnica estatística que é aplicada para a modelagem e a análise de vários processos em que a resposta de interesse é influenciada por diversos fatores, sendo a mesma otimizada (JABEEN et al., 2015; LAKSHMIKANDAN et al., 2014). O DCCR utilizado juntamente com a metodologia de análise de superfície de resposta é mais vantajoso se comparado com o DCCR clássico, pois se obtém uma boa precisão do experimento realizado (AHMADI et al., 2006). O modelo de regressão obtido proporciona a análise para o efeito de cada fator individual e

para todas as possíveis relações que existem entre as variáveis dependentes e independentes (PRIYADHARSHINI; BAKTHAVATSALAM, 2016).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, M. A. et al. Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium *Enterococcus mundtii* QU 25. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 5, p. 1892-1895, 2011a.
- ABDEL-RAHMAN, M. A. et al. Isolation and characterization of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo L-(+)-lactic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 1039-1049, Nov. 2011b.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 156, n. 4, p. 286-301, 2011.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, New York, v. 31, n. 6, p. 877-902, 2013.
- ADSUL, M. G.; VARMA, A. J.; GOKHALE, D. V. Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 58-62, Oct. 2007.
- AHMADI, M. et al. Empirical modeling of olive oil mill wastewater treatment using loofa-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 5, p. 1148-1154, 2006.
- ÅKERBERG, C.; ZACCHI, G. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresource Technology**, Essex, v. 75, n. 2, p. 119-126, 2000.
- ALVES, M. L. F. **Produção de L(+) ácido láctico por bactérias lácticas utilizando meios com batata. 2014.** 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Processos Fermentativos Rudimentares e Industriais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 35, n. 9, p. 689-694, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. **Descartes de Batata**. 2007.
Disponível em: <http://www.abbatatabrasileira.com.br/revista19_012.htm>.
Acesso em: 6 ago. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. **História da Batata**. 2008.
Disponível em:
<http://www.abbatatabrasileira.com.br/2008/abatata.asp?id_BAT=2>. Acesso
em: 12 ago. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO. **Milho**. 2015.
Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 21 jul. 2015.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In:
SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von; OUWEHAND, A. (Ed.). **Lactic acid
bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: M. Dekker,
2004. p. 1-72.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros
bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**,
São Carlos, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BENNINGA, H. **A history of lactic acid making**. Dordrecht: Kluwer
Academic, 1990. 61 p.

BÜYÜKKILECI, A. O.; HARSA, S. Batch production of L(+)lactic acid from
whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). **Journal of Chemical Technology
and Biotechnology**, London, v. 79, n. 9, p. 1036-1040, Sept. 2004.

CABRALES, L. et al. Effect of laboratory batch steeping pH on starch yield and
pasting properties of selected corn hybrids. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 83,
n. 1, p. 22-24, 2006.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos
usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2003. 260 p.

CARDOSO, W. S. et al. Indústria do milho. In: BORÉM, A.; RIOS, S. A. (Ed.).
Milho biofortificado. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2011. p. 175-
195.

CHATTERJEE, M. et al. Production of lactic acid by direct fermentation of
starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. **Biotechnology Letters**,
Dordrecht, v. 19, n. 9, p. 873-874, 1997.

CHAUHAN, K.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. C. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 1, p. 98-103, 2007.

CHIANI, M. et al. Production of desferrioxamine B (desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 13, n. 23, p. 1151-1155, 2010.

CHOI, H. Y. et al. Direct lactic acid fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using *Lactobacillus paracasei* without acidic or enzymatic inulin hydrolysis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 114, p. 745-747, 2012.

CLARK, J. H. Green chemistry: challenges and opportunities. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 1-8, 1999.

COELHO, L. F. et al. Improvement of L (+)-lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 1944-1950, 2010.

COELHO, L. F. et al. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 27-36, 2011.

CUI, F.; LI, Y.; WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 2, p. 1831-1836, 2011.

DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 81, n. 7, p. 1119-1129, 2006.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 2/3, p. 221-231, 1995.

DAVIDSON, B. E. et al. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, n. 8, p. 763-784, 1995.

DEMÉTRIO, C. S. et al. Desempenho de híbridos de milho submetidos a diferentes espaçamentos e densidades populacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1691-1697, 2008.

DRUMRIGHT, R. E.; GRUBER, P. R.; HENTON, D. E. Polylactic acid technology. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 12, n. 23, p. 1841-1846, 2000.

ERCOLINI, D. et al. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 3, p. 199-202, 2001.

FAKHRAVAR, S. et al. Fermentative lactic acid from deproteinized whey using *Lactobacillus bulgaricus* in batch culture. **World Applied Sciences Journal**, Dubai, v. 17, n. 9, p. 1083-1086, 2012.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1089-1093, 2011.

FERNANDES, A. M. et al. Produtividade e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata produzidos na safra de inverno. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 502-508, 2011.

FERREIRA, L. S. et al. Atividade da invertase ácida solúvel e da insolúvel em tubérculos de batata reconicionados após o armazenamento sob diferentes temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1610-1615, nov./dez. 2007.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Lavras: UFLA, 2003. 331 p.

FILIPOVIC, S. S.; RISTIC, M. D.; SAKAC, M. B. Technology of corn steep application in animal mashes and their quality. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 7, n. 3, p. 705-710, 2002.

FITZPATRICK, J. J.; O'KEEFFE, U. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. **Process Biochemistry**, London, v. 37, n. 2, p. 183-186, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics Division**. Rome, 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/search/potatoes>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

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

GAO, Y.; YUAN, Y. J. Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor un 2-keto-L-gulonic acid fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 18, p. 9845-9853, July 2011.

GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. 2816 p.

GERAGE, A. C. et al. **Cadeia produtiva do milho: diagnóstico e demandas atuais no Paraná**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 1999. 56 p.

GERALDI, C. A. Q. et al. Análise econômico-financeira de um novo processo de produção de derivados de milho. **Engevista**, Niterói, v. 14, n. 2, p. 185-195, 2012.

GIVRY, S.; PREVOT, V.; DUCHIRON, F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bifementans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 745-752, 2008.

GONZÁLEZ-VARA, A. Y. R. et al. Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004 in continuous fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 81, n. 6, p. 548-552, 1996.

GULLÓN, B. et al. L-lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 2, p. 308-319, 2008.

HETÉNYI, K.; NÉMETH, A.; SEVELLA, B. Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: second steps in a process improvement. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Lausanne, v. 50, n. 3, p. 293-299, 2011.

HJERESSEN, D. L.; SCHUTT, D. L.; BOESE, J. M. Green chemistry and education. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 77, n. 12, p. 1543-1547, 2000.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 2/4, p. 87-107, 2000.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 20, n. 4, p. 301-307, 1997.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, n. 2, p. 365S-373S, 2001.

ILMÉN, M. et al. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 1, p. 117-123, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, 2015. 76 p.

JABEEN, H. et al. Optimization of profenofos degradation by a novel bacterial consortium PBAC using response surface methodology. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 100, n. 1, p. 89-97, Mar. 2015.

JAY, J. M. Fermentation and fermented dairy products. **Modern food microbiology**. 6th ed. Gaithersburg: Aspen, 2000. 635 p.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 3, p. 524-534, 2007.

KARP, S. G. et al. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 2, p. 1765-1772, 2011.

KOSAKAI, Y.; PARK, Y. S.; OKABE, M. Enhancement of L(+)-lactic acid production using mycelial flocs of *Rhizopus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 55, n. 3, p. 461-470, 1997.

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

KOZHAKHMETOV, S. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus*. **Central Asian Journal of Global Health**, Astana, v. 2, 2013. Supplemental issue.

LAKSHMIKANDAN, M. et al. Biodegradation of acrylamide by acrylamidase from *Stenotrophomonas acidaminiphila* MSU12 and analysis of degradation products by MALDI-TOF and HPLC. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 94, p. 214-221, Oct. 2014.

LAOPAIBOON, P. et al. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 3, p. 1035-1043, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Sarvier, 2002. 1009 p.

LI, Z. et al. Utilization of white rice bran for production of L-lactic acid. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 39, p. 53-58, Apr. 2012.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 3, 593 p.

LINKO, Y. Y.; JAVANAINEN, P. Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, n. 2, p. 118-123, 1996.

LITCHFIELD, J. H. Microbial production of lactic acid. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 42, p. 45-95, 1996.

LOPES, C. A.; BUSO, J. A. **Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.)**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 1997. 36 p. (Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças).

LOSS, E. et al. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* ssp. mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 166, n. 2/3, p. 1522-1525, 2009.

LU, Z. et al. An economical approach for D-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 6, p. 2026-2031, 2009.

MADDIPATI, P. et al. Ethanol production from syngas by *Clostridium strain* P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 11, p. 6494-6501, 2011.

MARTINEZ, F. A. C. et al. Lactic acid properties, applications and production: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 30, n. 1, p. 70-83, 2013.

MAZUMDAR, S. et al. Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 12, n. 7, p. 1-11, 2013.

MOON, S. K.; WEE, Y. J.; CHOI, G. W. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 114, n. 2, p. 155-159, 2012.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do Poli(L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

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

NAKASAKI, K.; ADACHI, T. Effects of intermittent addition of cellulase for production of L-lactic acid from wastewater sludge by simultaneous saccharification and fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 82, n. 3, p. 263-270, 2003.

NANCIB, N. et al. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 78, n. 2, p. 149-153, 2001.

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

NAVEENA, B. J. et al. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 4, p. 485-490, 2005.

NIGATU, A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella* minor and related taxa isolated from kocho and tef. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 6, p. 969-978, 2000.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTOS. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. Campinas, 2011.

OH, H. et al. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 13, p. 1492-1498, 2005.

OKANO, K. et al. Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and α -amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 2, p. 462-467, 2009.

OLIVIERI, A. C.; MAGALLANES, J. F. Uncovering interactions in Plackett-Burman screening designs applied to analytical systems: a Monte Carlo ant colony optimization approach. **Talanta**, London, v. 97, p. 242-248, Aug. 2012.

OU, M. S.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. L(+)-lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 38, n. 5, p. 599-605, 2011.

PAREKH, M.; FORMANEK, J.; BLASCHEK, H. P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, n. 2, p. 152-157, 1999.

PARK, E. Y.; KOSAKAI, Y.; OKABE, M. Efficient production of L(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. **Biotechnology Progress**, New York, v. 14, n. 5, p. 699-704, 1998.

PATEL, M. A. et al. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3228-3235, 2006.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

PINTO, C. A. B. P. et al. Potencial de clones elite de batata como novas cultivares para Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 399-405, 2010.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The desing or optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, London, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

POLIAKOFF, M. et al. Green chemistry: Science and politics of change. **Science**, New York, v. 297, n. 5582, p. 807-810, 2002.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

PRIYADHARSHINI, S. D.; BAKTHAVATSALAM, A. K. Optimization of phenol degradation by microalga *Chlorella pyrenoidosa* using Plackett- Burman design and response surface methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 207, p. 150-156, May 2016.

QIN, J. et al. Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 19, p. 7570-7576, 2010.

RASAL, R. H.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, Emlsford, v. 35, n. 3, p. 338-356, 2010.

REDDY, G. et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 22-34, 2008.

REZENDE, V. M. et al. Degradabilidade ruminal das silagens de capim-napier produzidas com diferentes níveis de farelo de "batata diversa". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 485-491, mar./abr. 2007.

RICHTER, K.; BERTHOLD, C. Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. **Journal of Agricultural Engineering Research**, London, v. 71, n. 2, p. 181-191, 1998.

ROBERTO, I. C. et al. The effects of pH and nutrient supplementation of brewer's spent graincellulosic hydrolysate for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 131S, p. S181-S182, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. Campinas: CRC, 2014. 336 p.

RYU, H. W.; YUN, J. S.; WEE, Y. J. Lactic acid. In: PANDEY, A. (Ed.). **Concise encyclopedia of bioresource technology**. New York: The Haworth, 2003. p. 635- 644.

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

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 319-331, 2001.

SNEATH, P. H. A.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Waverly, 2001. v. 1.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 205-218, 2003.

SÖDERGÅRD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, Emlsford, v. 27, n. 6, p. 1123-1163, 2002.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TANAKA, T. et al. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 2, p. 211-217, 2006.

TASHIRO, Y. et al. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 1741-1750, 2011.

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

TEJAYADI, S.; CHERYAN, M. Lactic acid production from cheese whey permeate: productivity and economics of continuous membrane bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 242-248, 1995.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 7, p. 2551-2557, 2005.

TUNDO, P. et al. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 72, n. 7, p. 1207-1228, 2000.

VARADARAJAN, S.; MILLER, D. J. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. **Biotechnology Progress**, New York, v. 15, n. 5, p. 845-854, 1999.

VINK, E. T. H. et al. Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 80, n. 3, p. 403-419, 2003.

VISHNU, C.; SEENAYYA, G.; REDDY, G. Direct conversion of starch to L(+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 23, n. 2, p. 155-158, 2000.

WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 163-172, 2006.

WINTERTON, N. Twelve more green chemistry principles. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. G73-G81, 2001.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. 398 p.

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

XU, G. Q. et al. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCEB 0401. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 189-197, 2008.

YUN, J. S. et al. Fermentative production of DL-lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolyzate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus sp.* **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 20, p. 1613-1616, 2004.

YUN, J. S.; WEE, Y. J.; RYU, H. W. Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 4, p. 416-423, 2003.

ZHOU, Y. et al. Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 77/79, p. 401-407, 1999.

ZHU, Y.; LEE, Y. Y.; ELANDER, R. T. Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 136/140, p. 721-738, 2007.

SEGUNDA PARTE- ARTIGOS

ARTIGO 1

**SELEÇÃO DE COMPONENTES DO MEIO DE FERMENTAÇÃO POR
DELINEAMENTO Plackett-Burman PARA A PRODUÇÃO L(+)-ÁCIDO
LÁTICO POR *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595**

**Artigo a ser submetido para publicação na Revista *Journal of the Science of
Food and Agriculture***

**Marília Crivelari da Cunha, Michelle Thiemi Masotti, Olga Lucía
Mondragón Bernal, José Guilherme Lembi Ferreira Alves**

Resumo

ANTECEDENTES: O ácido láctico (AL) é um ácido orgânico amplamente empregado em diversos setores da indústria e cerca de 90% da sua produção de AL é por via fermentativa. Neste trabalho objetivou-se a seleção de variáveis da composição do meio de fermentação por meio de um delineamento Plackett-Burman (PB) para a produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. Foram realizados 12 tratamentos, sendo avaliados 8 fatores: concentrações de glicose, extrato de levedura, acetato de sódio, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $CaCO_3$ e Tween 80. Para cada tratamento, foi realizado estudo cinético e foram determinadas as concentrações de açúcares redutores (AR), pH, contagem de células viáveis e produção de ácido láctico e foram calculados o consumo de glicose e o fator de crescimento.

RESULTADOS: O $CaCO_3$ exerceu efeito significativo positivo para a produção de AL e consumo de glicose. Em relação ao fator de crescimento do *Lactobacillus rhamnosus*, os componentes estudados que apresentaram efeito positivo significativo foram glicose, K_2HPO_4 , $CaCO_3$ e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. A maior concentração de AL alcançada foi de $46,8 \text{ g L}^{-1}$ e observou-se aumento de 4 ciclos logarítmicos.

CONCLUSÃO: O uso do delineamento PB provou ser útil na seleção de nutrientes significativos do meio de fermentação para a produção de L (+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Palavras-chave: Ácido láctico; Plackett-Burman; *Lactobacillus rhamnosus*; CLAE; Nutrientes.

Abstract

BACKGROUND: Lactic acid (LA) is a widely used organic acid in various sectors of industry and about 90% of the AL production is by fermentation. This study aimed to check the composition of the fermentation medium through a variable Plackett- Burman experimental design for the production of L(+)-Lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. Twelve treatments were performed, being evaluated eight factors: glucose, yeast extract, sodium acetate, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $CaCO_3$ and Tween 80. For each treatment was performed kinetic study and were determined the concentrations of reducing sugars, pH, viable cell count and lactic acid. The lactic acid glucose consumption and factor growth were calculated.

RESULTS: The $CaCO_3$ had a positive significant effect on the production of LA and glucose consumption. Compared with the growth of *Lactobacillus rhamnosus* factor, the study components that had significant positive effect were: glucose, K_2HPO_4 , $CaCO_3$ and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. The highest concentration of AL achieved was 46.8 g L^{-1} and observed an increase of 4 log cycles.

CONCLUSION: The use of PB design proved to be useful in the selection of significant nutrients of the fermentation medium for the production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Keywords: Lactic acid; Plackett-Burman; *Lactobacillus rhamnosus*; HPLC; nutrients

Introdução

O ácido láctico (AL) é um ácido orgânico natural que tem atraído muita atenção devido às suas versáteis aplicações, principalmente nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica e têxtil. Em 2012, a produção mundial se aproximou de 259 mil toneladas e a previsão, para 2017, é de 368 mil toneladas. Esta expansão do mercado se deve, principalmente, à produção de plásticos biodegradáveis, polilactato (PLA), um polímero de grande interesse tecnológico devido às suas aplicações no campo ambiental, como plástico biodegradável e na área biomédica, como material biocompatível.¹

Cerca de 90% de todo o ácido produzido no mundo vêm do percurso de produção fermentativa por meio da ação de bactérias lácticas (BAL).² As bactérias do ácido láctico compreendem cerca de 20 gêneros. O gênero *Lactobacillus* é o maior dentre os gêneros que compreendem as BAL³, que são microrganismos exigentes e requerem nutrientes complexos, devido à sua capacidade limitada para sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos.⁴

Segundo De Man, Rogosa e Sharpe⁵, o extrato de carne, extrato de levedura, peptona que são usados como fontes de nitrogênio e vitaminas para satisfazer às necessidades dos *Lactobacillus* ssp. A glicose consiste na fonte de carbono, sendo o carboidrato a ser fermentado. O acetato de sódio atua como agente inibidor e seletivo e também pode ser utilizado como fonte de energia. O sulfato de magnésio e o sulfato de manganês são fornecedores de cátions utilizados no metabolismo. O fosfato de potássio monobásico é o agente tamponante responsável por equilibrar o pH e o Tween 80 é um agente surfactante que facilita a captura de nutrientes pelos *Lactobacillus* ssp.

Por meio da manipulação das exigências nutricionais e de parâmetros físicos, a produtividade de metabólitos microbianos pode ser aumentada.⁶ Entretanto, em processos industriais, o custo das matérias-primas é um dos

principais fatores para a produção econômica de AL.^{7,8} Desse modo, para o desenvolvimento de um processo econômico, a seleção de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e outros elementos no meio de fermentação se faz necessária.⁶

Quando o número de fatores a serem avaliados é muito grande, é conveniente escolher, primeiramente, um delineamento experimental utilizando um fatorial fracionado, que reduz o número de ensaios.⁹ A triagem inicial dos ingredientes do meio de cultivo, por meio do delineamento Plackett-Burman, é feita para avaliar o efeito de cada nutriente na formação do produto e, em seguida, as variáveis respostas significativas são selecionadas para se chegar às condições otimizadas do processo.¹⁰ No presente estudo, realizou-se a seleção de nutrientes do meio de fermentação, utilizando-se um delineamento experimental Plackett-Burman para a produção de L (+)-ácido lático por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, no Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Microrganismo

Bactéria do ácido lático

O microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, espécie não amilolítica e homofermentativa que foi utilizada neste estudo, foi cedido pela Fundação Oswaldo Cruz – FioCruz, Rio de Janeiro, RJ. Este microrganismo foi

selecionado previamente em trabalho de Alves¹¹, por apresentar boa produtividade de L(+)-ácido láctico.

Manutenção, padronização e estoque da cultura

O microrganismo foi adquirido na forma liofilizada e, assim, uma etapa de ativação foi necessária. A ativação da cultura de *Lactobacillus rhamnosus* iniciou-se pela transferência do microrganismo liofilizado para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo man, rogosa e sharpe (MRS) da marca Himédia[®], composto por 10 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de extrato de carne, 20 g L⁻¹ de glicose, 1 mL L⁻¹ de mono-oleato de sorbitan, 2 g L⁻¹ de fosfato de dipotássio, 2 g L⁻¹ de acetato de sódio, 2 g L⁻¹ de citrato triamônico, 0,20 g L⁻¹ de sulfato de magnésio, 0,05 g L⁻¹ de sulfato de manganês e 1 g L⁻¹ de Tween 80 previamente esterilizado em autoclave (121 °C/15 min). Em seguida, foram mantidos em estufa BOD, a 37 °C/48 h. A temperatura utilizada é considerada ótima para as bactérias lácticas (BAL).³

A etapa subsequente à ativação das bactérias foi a propagação. Após a verificação do aumento da turbidez do inóculo, ele foi, então, transferido para erlenmeyer 125 mL, contendo 50 mL de caldo MRS estéril e mantido em estufa BOD, a 37 °C/24 h.

Em seguida, a fim de preparar as culturas estoque, uma alíquota de 1 mL do novo inóculo que se encontrava em crescimento no caldo MRS foi transferida para eppendorfs, previamente esterilizado (121 °C/15 min) e centrifugado (Spinlab modelo SL-5AM) a 7.126 g/ 5 min, a fim de separar o microrganismo do caldo MRS. O sobrenadante foi descartado e o microrganismo centrifugado mantido no eppendorf. Posteriormente, 1 mL de meio congelante estéril foi acrescido ao microrganismo e cada eppendorf foi identificado e armazenado em condições de congelamento para uso futuro como cultura estoque.

O preparo do meio congelante se deu pela adição de 15 mL de glicerol, 0,5 g de peptona bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl em 100 mL de água destilada. Após a homogeneização, o pH foi ajustado (7,2-7,4) utilizando-se NaOH 0,1 mol/L e a solução esterilizada (121 °C/15 min).¹²

Preparo do inóculo

O inóculo foi feito a partir da cultura estoque de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. Em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS estéril foi adicionado 1 mL da cultura estoque e mantido em estufa BOD, a 37 °C/24 h. Posteriormente, em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo MRS estéril, foram adicionados 10% (v/v) do inóculo anterior (5 mL) e mantidos a 37 °C. Após 12 horas, foi conferido o valor de absorbância por meio da leitura em espectrofotômetro (600 nm) e 1% (v/v) do inóculo foi transferido para erlenmeyer contendo 300 mL de meio de fermentação de acordo com Alves¹¹ (APÊNDICE A), com base na correlação entre absorbância e o número de células viáveis através das curvas de crescimento, correspondente a uma contagem de 10^8 a 10^9 UFC/mL.

Plackett-Burman – PB 12

Foi utilizado o delineamento experimental Plackett-Burman 12, com o objetivo de verificar a influência de alguns componentes adicionados no meio, para selecionar as variáveis mais importantes que afetam a produção de L(+)-ácido láctico. Foram analisados oito fatores, adaptados conforme a composição descrita por De Man, Rogosa e Sharpe⁵, sendo avaliadas as concentrações de glicose (marca Vetec[®]), extrato de levedura (marca Himédia[®]), acetato de sódio (marca Vetec[®]), fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4) da marca Proquímica[®], sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) da marca

Vetec[®], sulfato de manganês tetra-hidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) da marca Vetec[®], carbonato de cálcio (CaCO_3) da marca Êxodo Científica e Tween 80 (marca Dinâmica[®]), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 Variáveis reais analisadas no delineamento Plackett-Burman 12 (PB 12)

| Variáveis | -1 | 0 | 1 |
|--|----|-------|------|
| $X_1 = \text{Glicose (g L}^{-1}\text{)}$ | 40 | 60 | 80 |
| $X_2 = \text{Extrato de levedura (g L}^{-1}\text{)}$ | 5 | 10 | 15 |
| $X_3 = \text{Acetato de sódio (g L}^{-1}\text{)}$ | 0 | 1,0 | 2,0 |
| $X_4 = \text{K}_2\text{HPO}_4\text{(g L}^{-1}\text{)}$ | 0 | 1,0 | 2,0 |
| $X_5 = \text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O (g L}^{-1}\text{)}$ | 0 | 0,10 | 0,20 |
| $X_6 = \text{Mn SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O (g L}^{-1}\text{)}$ | 0 | 0,025 | 0,05 |
| $X_7 = \text{CaCO}_3\text{(g L}^{-1}\text{)}$ | 0 | 15 | 30 |
| $X_8 = \text{Tween 80 (mL L}^{-1}\text{)}$ | 0 | 0,75 | 1,5 |

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Os erlenmeyers foram vedados com algodão e incubados em estufa BOD, a 37 °C. A temperatura utilizada é considerada ótima para as bactérias lácticas (BAL).³ Para cada tratamento, foi realizado estudo cinético, no qual foram retiradas amostras de 15 mL, assepticamente, em intervalos de tempo de 0, 12, 24, 48 e 72 horas. Foi retirado 1 mL para contagem de células por plaqueamento nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. As amostras retiradas foram centrifugadas (FANEM modelo Excelsa II 206 BL) a 2.260 g/30 min e o sobrenadante armazenado em condições de congelamento (-5 °C) para, então, ser submetido a análises de açúcares redutores (AR), pH e de ácido láctico. Foram calculados o consumo de AR e o fator de crescimento. Depois de concluído o planejamento experimental (PB 12), as análises estatísticas foram feitas com auxílio do *software Statistica 8.0*¹³, a 10% de significância.

Metodologia analítica

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os seus resultados expressos pela média e o desvio padrão desses valores.

Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados diretamente no sobrenadante da amostra, com auxílio de potenciômetro digital de bancada (Tecnocon, modelo mPA-210) calibrado previamente com solução-tampão de pH 4,0 e 7,0.

Determinação de açúcar redutor (AR)

A concentração de AR foi determinada nas amostras oriundas da fermentação, seguindo a metodologia descrita por Miller¹⁴, utilizando-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Na determinação de AR, a reação foi direta com o DNS e os valores de absorbância medidos no espectrofotômetro (FEMTO 700 S Soft., Brasil) a 540 nm e expressos em g/L, pela curva analítica de glicose (APÊNDICE B).

Determinação do consumo de açúcar redutor (AR)

A determinação do consumo de glicose foi calculado por meio da equação 1, sendo considerada a concentração de AR_{inicial} no tempo de 0 hora e de AR_{final} no tempo de 72 horas.

$$\text{Consumo de AR (\%)} = \frac{AR_{inicial} - AR_{final}}{AR_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Determinação do ácido láctico

O AL formado no final do processo fermentativo foi analisado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo (Shimadzu) utilizado foi equipado com detector de condutividade (CDD-6A), polaridade +, uma pré-coluna SHIM-PACK SPR-H(G) (50 mm × 7,8 mm) e duas colunas em série SHIM-PACK SPR-H (250 mm × 7,8 mm). A fase móvel foi uma mistura de 16 mM de Bis-Tris, 4 mM de ácido p-tolueno sulfônico e 100 µM de EDTA, com fluxo de 0,8 mL/min. O volume injetado da amostra foi de 20 µL e a temperatura de injeção de 45 °C. As amostras previamente centrifugadas foram filtradas através de filtros de seringa (0,22 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro) e diluídas com água miliq, antes da injeção no cromatógrafo. A quantificação do AL foi determinada pela comparação dos tempos de retenção dos picos e curva analítica de ácido láctico, da marca Sigma® (APÊNDICE C e APÊNDICE E).

Contagem de bactérias lácticas por plaqueamento

A contagem de BAL foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, ou "pour plate". As amostras foram diluídas decimalmente em água peptonada 0,1 % (m/v) até as diluições de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Posteriormente, uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi distribuída em placas de Petri e cerca de 15 mL de ágar MRS foram vertidos sobre as mesmas. A amostra foi homogeneizada no meio de cultura, realizando-se movimentos aleatórios até a secagem do meio e incubada em estufa BOD, a 37 °C, por 72 horas. As placas consideradas para contagem continham entre 25 e 250 colônias.¹⁵

Determinação do fator de crescimento

O fator de crescimento da bactéria láctica foi calculado por meio da equação 2, utilizando-se o tempo em que se obteve a contagem significativa, dentre as diluições utilizadas, do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

$$\text{Fator de crescimento} = \frac{\text{Contagem de células}_{\text{final}}}{\text{Contagem de células}_{\text{inicial}}} \quad (2)$$

Resultados e Discussão

Plackett-Burman 12

A influência das variáveis concentrações de glicose, extrato de levedura, acetato de sódio, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 e Tween 80 sobre a produção de L(+)-ácido láctico por *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi estudada segundo o delineamento Plackett-Burman 12, com três repetições no ponto central, perfazendo um total de 15 tratamentos.

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas a 90% de confiança, produção de ácido láctico, consumo de glicose e fator de crescimento, após 72 horas de fermentação, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Matriz do Plackett-Burman contendo os valores reais, codificados e as variáveis resposta ácido láctico (g L⁻¹), consumo de glicose (%) e fator de crescimento

X₁=glicose, X₂= extrato de levedura, X₃= acetato de sódio, X₄= K₂HPO₄, X₅= MgSO₄ · 7 H₂O, X₆= MnSO₄ · 4H₂O, X₇= CaCO₃ e

| Trat. | X ₁ (g L ⁻¹) | X ₂ (g L ⁻¹) | X ₃ (g L ⁻¹) | X ₄ (g L ⁻¹) | X ₅ (g L ⁻¹) | X ₆ (g L ⁻¹) | X ₇ (g L ⁻¹) | X ₈ (mL L ⁻¹) | Ácido láctico (g L ⁻¹) | Consumo de glicose (%) | Fator de crescimento |
|-------|--|--|--|--|--|--|--|---|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1 | 1(80) | -1(5) | 1(2) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | 1(30) | 1(1,5) | 30,6±2,3 | 26,4±7,7 | 225±13 |
| 2 | 1(80) | 1(15) | -1(0) | 1(2) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | 1(1,5) | 3,3±1,0 | 8,7±1,5 | 537±75 |
| 3 | -1(40) | 1(15) | 1(2) | -1(0) | 1(0,2) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | 6,8±0,2 | 9,8±4,6 | 2,0±0,5 |
| 4 | 1(80) | -1(5) | 1(2) | 1(2) | -1(0) | 1(0,05) | -1(0) | -1(0) | 9,9±5,5 | 9,04±3,4 | 15±3 |
| 5 | 1(80) | 1(15) | -1(0) | 1(2) | 1(0,2) | -1(0) | 1(30) | -1(0) | 46,8±2,6 | 85,0±3,0 | 1668±453 |
| 6 | 1(80) | 1(15) | 1(2) | -1(0) | 1(0,2) | 1(0,05) | -1(0) | 1(1,5) | 15,8±0,8 | 39,3±8,4 | 49±27 |
| 7 | -1(40) | 1(15) | 1(2) | 1(2) | -1(0) | 1(0,05) | 1(30) | -1(0) | 26,5±3,0 | 95,1±1,0 | 7±3 |
| 8 | -1(40) | -1(5) | 1(2) | 1(2) | 1(0,2) | -1(0) | 1(30) | 1(1,5) | 27,5±2,6 | 97,7±0,5 | 596±108 |
| 9 | -1(40) | -1(5) | -1(0) | 1(2) | 1(0,2) | 1(0,05) | -1(0) | 1(1,5) | 10,3±0,9 | 34,9±11,8 | 14±3 |
| 10 | 1(80) | -1(5) | -1(0) | -1(0) | 1(0,2) | 1(0,05) | 1(30) | -1(0) | 15,8±0,6 | 71,4±7,5 | 265±9 |
| 11 | -1(40) | 1(15) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | 1(0,05) | 1(30) | 1(1,5) | 16,8±3,0 | 97,5±0,2 | 10±5 |
| 12 | -1(40) | -1(5) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | -1(0) | 1,2±0,7 | 20,6±9,9 | 1±0 |
| 13 | 0(60) | 0(10) | 0(1) | 0(1) | 0(0,1) | 0(0,025) | 0(15) | 0(0,75) | 40,4±3,0 | 83,7±5,0 | 322±79 |
| 14 | 0(60) | 0(10) | 0(1) | 0(1) | 0(0,1) | 0(0,025) | 0(15) | 0(0,75) | 34,6±3,0 | 77,5±5,0 | 164±79 |
| 15 | 0(60) | 0(10) | 0(1) | 0(1) | 0(0,1) | 0(0,025) | 0(15) | 0(0,75) | 38,0±3,0 | 87,5±5,0 | 250±79 |

X₈=Tween 80

Como se observa na Tabela 2, o tratamento 5 ($46,8 \text{ g L}^{-1}$) e os tratamentos 13, 14 e 15 (pontos centrais) apresentaram as maiores produções de ácido láctico, $40,4 \text{ g L}^{-1}$, $34,6 \text{ g L}^{-1}$ e $38,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Na Figura 1 é mostrado o gráfico de Pareto das variáveis estudadas no delineamento PB para a produção de AL por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

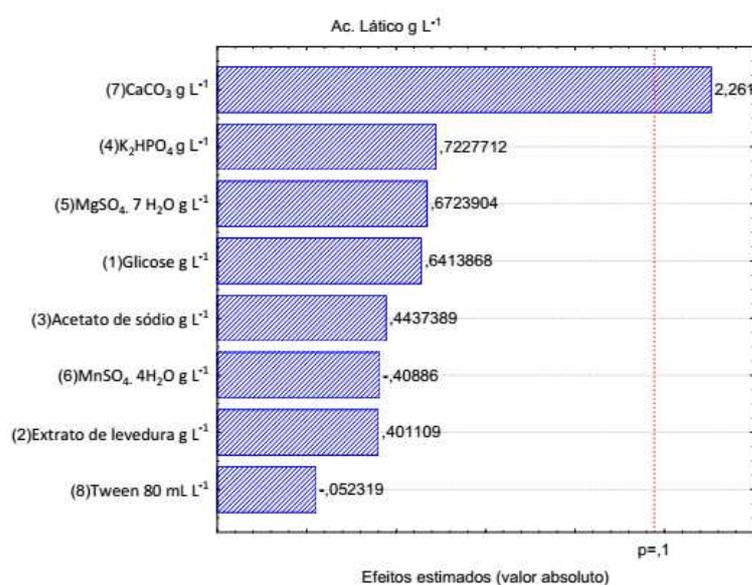


Figura 1 Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman 12, para a produção de L(+)-ácido láctico por *L. rhamnosus* ATCC 9595

Neste estudo, observou-se que a variável de maior influência para a produção de ácido láctico foi o CaCO_3 , apresentando efeito positivo significativo a 90% de confiança, o que significa que, quando a concentração desta variável aumenta do nível -1 para o +1, ocorre um aumento na produção de AL. Mesmo resultado foi observado para a resposta consumo de açúcar (%), como demonstrado na Figura 2.

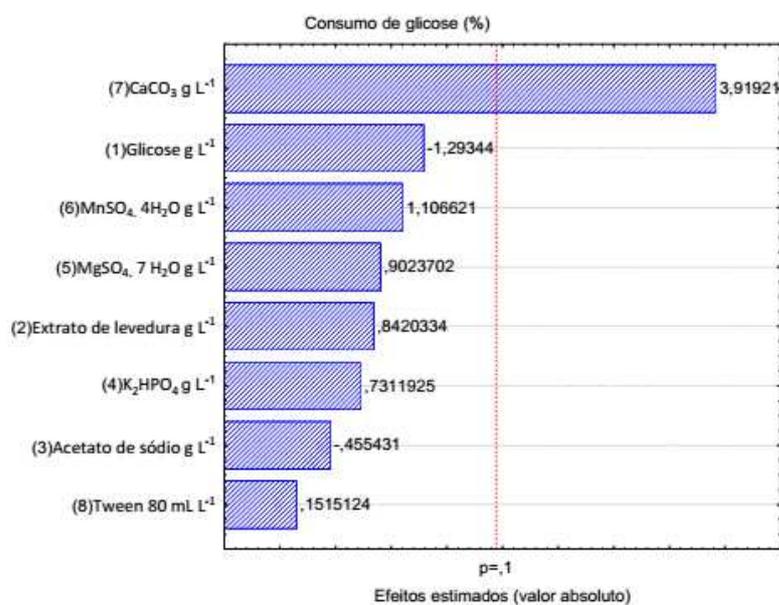


Figura 2 Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman 12 em relação ao consumo de glicose para a produção de L(+)-ácido lático por *L. rhamnosus* ATCC 9595

Observou-se que os tratamentos que os tratamentos 5, 7 e 8, que continham em sua formulação 30 g L⁻¹ de CaCO₃ e os tratamentos 13, 14 e 15, que continham 15 g L⁻¹ de CaCO₃, estimularam o consumo de glicose pelo *L. rhamnosus* ATCC 9595 e foi concomitante com a maior produção de L(+)-ácido lático observada dentre os tratamentos do delineamento PB 12.

Na Figura 3 mostra-se a cinética do consumo de açúcar (%) para cada tratamento do delineamento PB 12, durante a produção de AL por *L. rhamnosus* ATCC 9595.

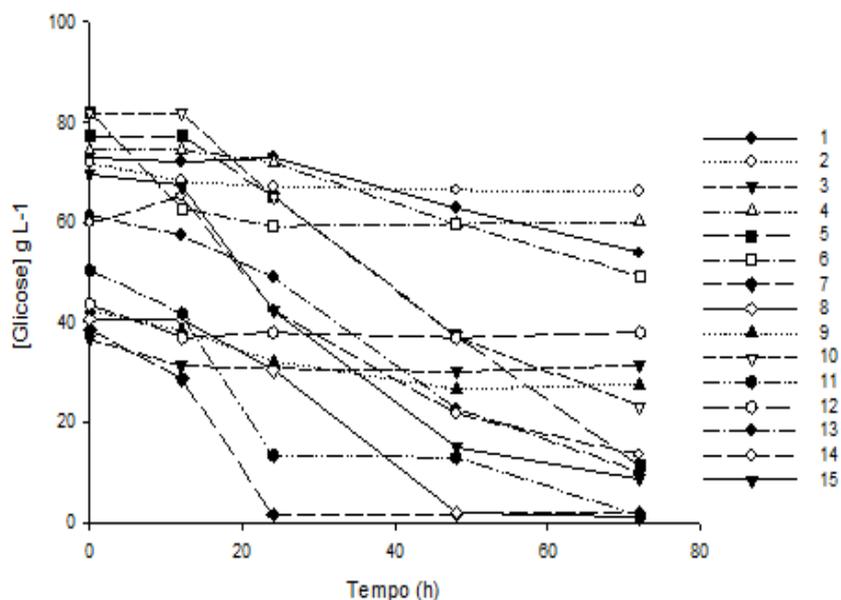


Figura 3 Cinética de consumo de glicose (%) para cada tratamento do delineamento PB 12 para a produção de L (+)-ácido láctico por *L. rhamnosus* ATCC 9595

Nakano, Ugwu e Tokiwa¹⁶ estudaram os efeitos de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH e NaOH como agentes neutralizantes para a produção de ácido láctico, por *Lactobacillus delbrueckii*, a partir de arroz quebrado, em processo simultâneo de sacarificação e fermentação (SSF). Segundo os autores, a molaridade do lactato no meio de fermentação é menor quando se adicionam cátions bivalentes (Ca^{2+}) como agentes neutralizantes. Isso resulta em alta eficiência na produção de AL, em comparação com a adição de cátions monovalentes, como Na^+ e NH_3^+ , como agentes de neutralização.

No estudo realizado por Chauhan, Trivedi e Patel⁶ foram selecionados, dentre 15 componentes do meio de fermentação (peptona, extrato de carne,

extrato de levedura, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Tween 80, NaCl, acetato de sódio, $NaSO_4$, citrato de tri-amônio, succinato de sódio e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e suco de tâmara), por delineamento Plackett-Burman, os mais significativos para produção de AL por *Lactobacillus* sp. KCP01. As variáveis significativas foram peptona, extrato de carne, extrato de levedura, K_2HPO_4 , acetato de sódio, $NaSO_4$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ e suco de tâmara. Os autores observaram que o controle de pH com a adição de $CaCO_3$ para neutralizar o ácido láctico produzido durante a fermentação aumentou significativamente a produção de ácido láctico ($45,59 \text{ g L}^{-1}$) em relação ao tratamento sem a adição de $CaCO_3$ ($16,5 \text{ g L}^{-1}$).

Resultado diferente foi encontrado por Navenna et al.,¹⁰ ao utilizarem o delineamento Plackett-Burman para selecionar, dentre 15 parâmetros, os mais significativos para a produção de L(+)-ácido láctico a partir de farelo de trigo como substrato para fermentação em estado sólido, por *Lactobacillus amylophilus* GV6. Onze nutrientes pertencentes a duas categorias, fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, citrato de tri-amônio, extrato de carne, água de maceração de milho e caseína hidrolisada) e fontes de sais minerais ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, acetato de sódio e Tween 80), juntamente com três parâmetros físicos (pH, quantidade de inóculo e período de incubação) e um tampão ($CaCO_3$), foram avaliados. De acordo os autores, o extrato de levedura, a peptona, o citrato de tri-amônio, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ e Tween 80 foram as variáveis significativas que podem melhorar a produção de ácido láctico. A concentração máxima alcançada pelos autores foi de 2,3041 g de AL por 10 g de farelo de trigo. O tampão $CaCO_3$ não foi significativo na produção de AL.

Para o fator de crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, as variáveis independentes significativas foram concentração de glicose, K_2HPO_4 ,

MgSO₄ · 7 H₂O, MnSO₄ · 4H₂O, CaCO₃ e acetato de sódio, como pode ser observado na Figura 4.

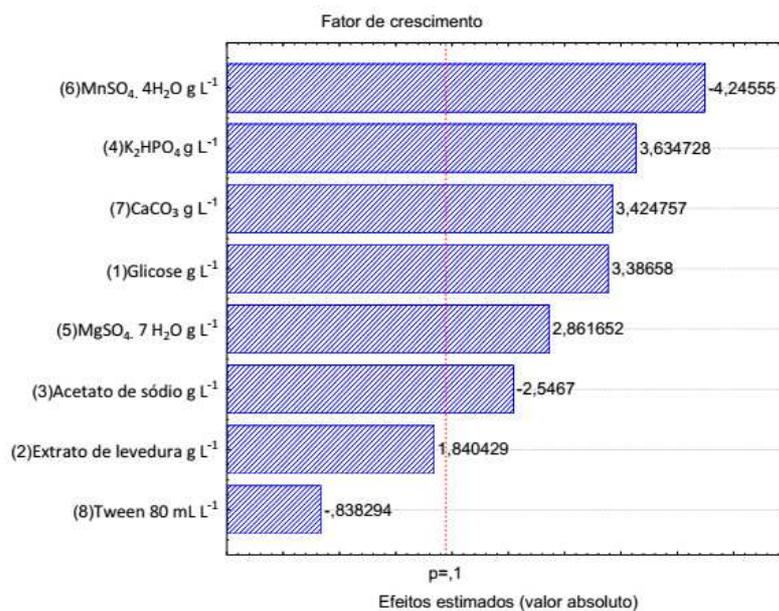


Figura 4 Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no delineamento experimental do tipo Plackett-Burman 12 em relação ao fator de crescimento do *L. rhamnosus* ATCC 9595, para a produção de L(+)-ácido láctico

Entretanto, os componentes estudados que apresentaram efeito positivo significativo foram glicose, K₂HPO₄, CaCO₃ e MgSO₄·7H₂O, a 90% de significância, o que significa que, quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumentam dentro dos níveis deste estudo, ocorre um aumento na população do microrganismo.

Büyükkileci e Harsa¹⁷ afirmam que o MnSO₄ é essencial para o *L. casei*, pois o íon Mn²⁺ estimula a atividade metabólica. Segundo Peters e Snell¹⁸, o acetato de sódio estimula o crescimento celular e, assim, a produção de AL é

influenciada indiretamente. Entretanto, o $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e o acetato de sódio não foram significativos no presente estudo.

As bactérias do ácido lático são microrganismos que têm exigências nutricionais complexas que requerem vitaminas e aminoácidos para o crescimento.^{4,19} Fontes de nitrogênio são necessárias para a síntese de aminoácidos, lipídeos, enzimas, alguns carboidratos e outras substâncias²⁰, e, segundo Wood e Holzapfel²¹, a fonte de nitrogênio é o fator de maior influência para o crescimento de *Lactobacillus*. Porém, neste estudo, o extrato de levedura não apresentou efeito significativo a 90% de confiança sobre o fator de crescimento.

Alguns autores reportam que o Tween 80 é responsável por aumentar o crescimento de *Lactobacillus* e a produção de AL, por apresentar em sua composição ácidos graxos insaturados, sendo essenciais ao metabolismo microbiano deste gênero.²² Contudo, também não foi observado efeito significativo do Tween 80 sobre a resposta fator de crescimento do microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, pelo delineamento PB 12.

Na Figura 5 é demonstrada a cinética de crescimento do *L. rhamnosus* ATCC 9595 para cada tratamento, durante 72 horas de processo fermentativo.

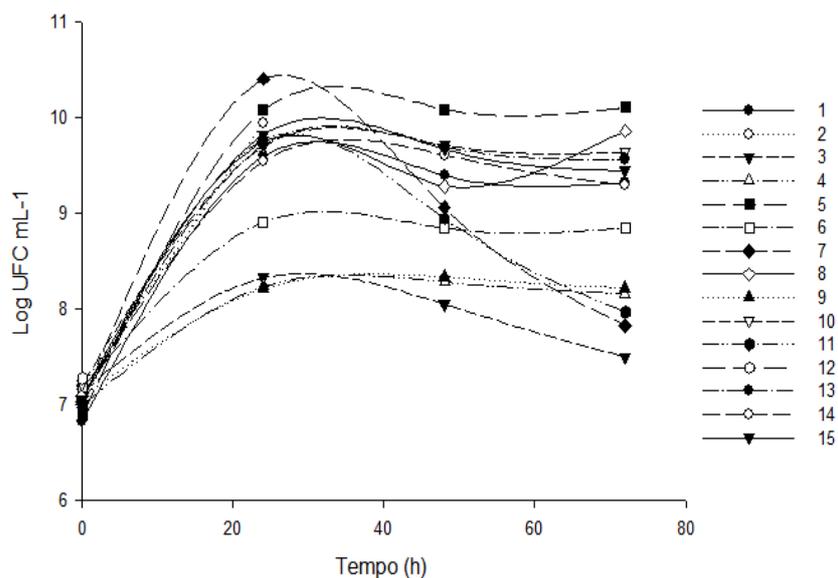


Figura 5 Cinética de crescimento do *L. rhamnosus* ATCC 9595, para cada tratamento do delineamento PB 12, durante o processo fermentativo para a produção de L (+)-ácido láctico

O tratamento 5 apresentou o maior valor para o fator de crescimento (1668) e maior produção de ácido láctico ($46,8 \text{ g L}^{-1}$), sendo que o meio de fermentação consistia de 80 g L^{-1} de glicose, 15 g L^{-1} de extrato de levedura, 2 g L^{-1} de K_2HPO_4 e $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30 g L^{-1} de CaCO_3 e foi observado um aumento de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos ($7,7 \times 10^6$ a $1,3 \times 10^{10} \text{ UFC mL}^{-1}$), durante a fermentação.

Contudo, o tratamento 2 (80 g L^{-1} de glicose, 15 g L^{-1} de extrato de levedura, 2 g L^{-1} de K_2HPO_4 e $1,5 \text{ mL}$ de Tween 80) apresentou contagem de células viáveis por até 24 horas ($1,6 \times 10^7$ a $8,9 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$) e a produção de ácido láctico foi de $3,3 \text{ g L}^{-1}$, e o tratamento 12 (40 g L^{-1} de glicose e 5 g L^{-1} de extrato de levedura) não apresentou contagem de células após a adição do inóculo e a produção de ácido láctico obtida foi de $1,2 \text{ g L}^{-1}$. Observou-se que,

tanto no tratamento 2 como no 12, não houve adição de CaCO_3 na formulação dos meios de fermentação.

No caso de fermentações para a produção de ácido lático, a regulação do pH é fundamental, pois o ácido lático produzido inibe o crescimento celular e a formação de produto. Por meio do controle de pH pela adição de agentes neutralizantes, o efeito por inibição é minimizado.²³ As fermentações iniciaram com pH entre 5 e 7, conforme Figura 6.

De acordo com Hofvendahl- Hahn-Hägerdal², a faixa de pH ótimo para a produção de ácido lático pelos *Lactobacillus* se situa entre 5 e 7 e os tratamentos 5, 7 e 8, que continham em sua formulação a maior concentração de CaCO_3 e K_2HPO_4 , definida pelo delineamento, apresentaram pH final de 4,5 a 5,5, enquanto, para os demais tratamentos, o pH final variou de 3 a 3,5. Segundo Honorato et al.,²⁴ a adição de fosfato ao meio de cultura aumenta o crescimento do microrganismo, uma vez que mantém o pH próximo ao valor ideal de crescimento, permitindo, assim, a realização da fermentação por um longo tempo.

Chauhan, Trivedi e Patel⁶ observaram que o crescimento do *Lactobacillus* sp. KCP01 foi afetado pelo pH do meio de fermentação durante a produção de ácido lático, em comparação ao meio de fermentação que continha 2% de CaCO_3 .

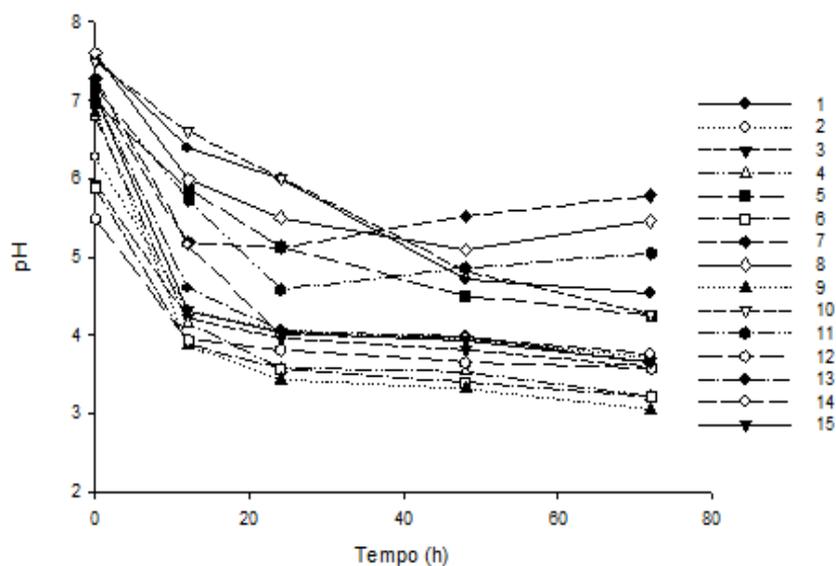


Figura 6 Evolução do pH, dentre os tratamentos do delineamento PB 12, para produção de L (+)-ácido láctico utilizando *L. rhamnosus* ATCC 9595

A adição de agentes neutralizantes, como o carbonato de cálcio, é uma forma de superar parcialmente a inibição do AL pelas BAL e melhorar a eficácia do processo fermentativo.^{25,26,27}

Conclusão

No presente estudo, o uso do delineamento Plackett-Burman provou ser útil na seleção de componentes significativos do meio de fermentação. Para produção de ácido láctico e consumo de açúcar, o único nutriente que exerceu efeito estatisticamente significativo, dentro do intervalo estudado, foi o carbonato de cálcio, que contribuiu para diminuir o efeito inibitório do ácido láctico pelo microrganismo *L. rhamnosus* ATCC 9595, além de promover a maior

produção de AL (46,8 g L⁻¹), enquanto, para fator de crescimento, todos os nutrientes, com exceção do extrato de levedura e do Tween 80, exerceram efeitos significativos.

Referências

- 1 Abdel-Rahman MA, Tashiro Y and Sonomoto K, Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv* 31: 877–902 (2013).
- 2 Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Tech* 26:87-107 (2000).
- 3 Axelsson L, Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1-72 (2004).
- 4 Fitzpatrick JJ, O’Keeffe U, Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentation for producing lactic acid. *Process Biochem* 37: 183–186 (2001).
- 5 De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME, A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology* 23:130–135 (1960).
- 6 Chauhan K, Trivedi U, Patel KC, Statistical screening of medium components by Plackett–Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresource Technol* 98: 98–103 (2007).
- 7 Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL, Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochem* 40:2551-2557 (2005).
- 8 John RP, Nampoothiri KM, Pandey A, Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiol Biot* 74:524-534 (2007).
- 9 Rodrigues MI, Iemma AF, *Experimental Design and Process Optimization*. Campinas: CRC Press (2014).
- 10 Naveena BJ, Altaf MD, Bhadriah K, Reddy G, Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource Technol* 96: 485-490 (2005).

- 11 Alves MLF, Produção de L(+) ácido láctico por bactérias lácticas utilizando meios com batata. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras (2014).
- 12 Souza ERN, Tebaldi, VMR, Piccoli, RH, Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. *Rev Bras PI Med* 17:528-533 (2015).
- 13 Statistica, 2008. Data Analysis Software System. Disponível em:www.stasoft.com.
- 14 Miller GL, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426 (1959).
- 15 Silva N, Junqueira V, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RA R, Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4 edição. São Paulo: Livraria Varela (2010).
- 16 Nakano S, Ugwu CU, Tokiwa Y, Efficient production of D-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)₂ as a neutralizing agent. *Bioresource Technol* 104: 791- 794 (2012).
- 17 Büyükkileci AO and Harsa S, Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J Chem Technol Biotechnol* 79:1036–1040 (2004).
- 18 Peters VJ and Snell EE, Peptides and bacterial growth. *J. Bacteriol.* 67: 69–76 (1954).
- 19 Oh H, Wee YJ, Yun JS, Ryu HW, Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 105–108:603–13 (2003).
- 20 Coelho LF, Lima, CJB, Bernardo MP, Alvarez, GM, Contiero J, Improvement of L(+)-latic acid production from cassava wasterwater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. *J.Sci Food Agric* 90:1944-1950 (2010).
- 21 Wood BJB and Holzapfel WH, *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (1st edn). Blackie Academic and Professional, London (1995).
- 22 Oh S, Rheem S, Sim J, Kim S and Baek Y, Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extractglucose medium by using response surface methodology. *Appl Environ Microbiol* 61:3809–3814 (1995).
- 23 Hetényi K, Németh A, Sevela B, Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement. *Chem Eng Process* 50:293- 299 (2011).
- 24 Honorato TL, Rabelo MC, Pinto GAS, Rodrigues S, Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. *Cienc Tecnol Aliment* 27:254-258 (2007).
- 25 Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendo T, Hanada K, Shibata K, Sonomoto K, Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a

- novel lactic acid bacterium *Enterococcus mundtii* QU 25. *Appl Environ Microb* 77: 1892– 1895 (2011)a.
- 26 Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendo T, Shibata K, Sonomoto K, Isolation and characterization of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo L-(+)-lactic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1039–1049 (2011)b.
- 27 Tashiro Y, Kaneko W, Sun Y, Shibata K, Inokuma, K, Zendo T, Sonomoto K, Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1741–1750 (2011).

ARTIGO 2

**Produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595
utilizando meio com batata, água de maceração de milho e carbonato de
cálcio**

**Artigo a ser submetido para publicação na Revista *Applied Biochemistry
and Biotechnology***

**Marília Crivelari da Cunha, Michelle Thiemi Masotti, Olga Lucía
Mondragón Bernal, Rosane Freitas Schwan, José Guilherme Lembi
Ferreira Alves**

Resumo

A maior parte do ácido láctico (AL) produzido no mundo é obtida por fermentação e o custo do meio de cultivo é um dos fatores a ser reduzido. Nesse sentido, o uso de subprodutos agroindustriais, como batata e água de maceração de milho (AMM), pode ser uma opção economicamente viável. Objetivou-se otimizar a composição do meio de fermentação por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, utilizando excedente de produção de batata e AMM. No DCCR foram realizados 17 tratamentos, sendo três variáveis independentes analisadas: concentração de farinha de batata (FB), AMM e de CaCO_3 . Realizou-se um estudo cinético, no qual foram retiradas amostras em intervalos de tempo de 0 a 72 horas. Foram realizadas análises de contagem de células, açúcares redutores (AR), pH e de ácido láctico. Foram calculados rendimento e produtividade de ácido láctico, consumo de AR e fator de crescimento. A maior concentração de AL (183,83 g/L) foi obtida utilizando-se 220 g/L de FB, 55 g/L de AMM e 45 g/L de CaCO_3 , durante 72 horas, a 37 °C, obtendo-se 2,553 g/L.h de produtividade, 94,2% rendimento, 96,1% de consumo de AR e aumento de dois ciclos logarítmicos.

Palavras-chaves: Ácido láctico. *Lactobacillus rhamnosus*. Farinha de batata. Água de maceração de milho. DCCR

Abstract

Most of lactic acid (LA) produced in the world is obtained by fermentation and the cost of the medium is one factor to be reduced. Accordingly, the use of agro-industrial by-products such as potato and corn steep liquor (CSL) can be economically viable options. The objective was to optimize the composition of the fermentation medium through a Central Composite Rotatable Design (CCRD) for the production of L(+)-lactic acid using *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 and excess potato production and CSL. The CCRD were performed seventeen treatments were performed with three independent variables analyzed: potato flour concentration (PF), corn steep liquor (CSL) and CaCO₃. Kinetic study were carried out and samples were taken at time intervals of 0 to 72 h. Cell count analyzes were performed, reducing sugars (AR), pH and lactic acid. Yield and lactic acid productivity, AR consumption and growth factor were calculated. The highest concentration of AL (183.83 g/L) was obtained using 220 g/L of PF, 55 g/L of CSL and 45 g/L of CaCO₃ during 72 h at 37 °C, there was obtained 2.553 g/L.h productivity, 94.2% yield, 96,1% of AR consumption and increase of two logarithmic cycles.

Keywords: Lactic acid. *Lactobacillus rhamnosus*. Potato flour. Corn steep liquor. CCRD

Introdução

O ácido láctico (AL) tem atraído grande atenção devido às suas aplicações generalizadas, principalmente na indústria alimentícia, química, cosmética e farmacêutica. Além disso, esse ácido orgânico tem um grande potencial para a produção do ácido polilático (PLA), um polímero biodegradável e biocompatível que impulsiona a expansão do mercado do AL. Entretanto, em comparação com o plástico petroquímico, a produção de PLA é considerada uma tecnologia relativamente nova em escala industrial, o que é atribuído, principalmente, ao alto custo de produção deste ácido [1].

A maior parte de todo o AL produzido no mundo vem do percurso de produção fermentativa por meio da ação das bactérias lácticas [2]. No entanto, essas bactérias têm grande requerimento nutricional de minerais, vitaminas e peptídeos específicos para garantir o seu crescimento [3,4 5]. Pesquisas estão centradas na procura de substratos alternativos e renováveis, como subprodutos de agroindustriais, tais como amido, celulose, soro de leite e melão [6].

Açúcares puros têm sido a fonte de carbono tradicional para a produção de AL [7,8], assim como o extrato de levedura (EL) é a fonte nitrogenada mais comumente utilizada [9,10,11]. Uma das vantagens da utilização de produtos refinados é a obtenção de AL puro, reduzindo os custos de pré-tratamento e recuperação [4]. Contudo, em processos de industriais, o custo da matéria-prima é um dos principais fatores para a produção econômica de AL [12,13] e a busca por matérias-primas de baixo custo a serem usadas na produção de AL, por fermentação, visa promover o desenvolvimento de processos mais competitivos [14], além de ser um processo ambientalmente correto, de acordo com os princípios da química verde [15].

O elevado índice de perdas e desperdícios gerados pelas indústrias de alimentos tem levado pesquisadores a buscar alternativas viáveis de

aproveitamento desses resíduos ou subprodutos agroindustriais. Na última década, houve um aumento significativo na produção de resíduo de batata pela indústria de alimentos, devido ao crescente número de redes *fast food* [16]. Aproximadamente 40% das batatas são desperdiçadas no mundo, o que representa cerca de 10 toneladas/dia de resíduo [17,18].

A batata (*Solanum tuberosum* L.) contém cerca de 60% a 80% de amido em base seca [19]. Pelo alto teor de amido, pode ser utilizada em processos fermentativos. Contudo, o amido não é diretamente fermentescível, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias. Essa hidrólise pode ocorrer de duas maneiras, usando-se tratamento ácido e tratamento enzimático, que apresenta vantagens sobre o ácido por ser mais seletivo, gastar pouca energia e gerar glicose que pode ser diretamente fermentada [20].

Há relatos, na literatura, de fontes de nitrogênio de baixo custo e subprodutos agrícolas como uma alternativa para alcançar uma substituição total ou parcial para o extrato de levedura [21]. A água de maceração de milho (AMM), um produto secundário do processo de industrialização do milho [22,23], é uma fonte potencialmente útil de substituição de EL [24]. A AMM é um subproduto de baixo custo que tem nutrientes e minerais eficazes para a fermentação [14].

Neste trabalho objetivou-se a otimização, por meio do uso da metodologia de análise de superfície de resposta, da produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, utilizando batata, água de maceração de milho e carbonato de cálcio.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no laboratório de Engenharia de Bioprocessos, no Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) e nos laboratórios de

Fisiologia e Genética de Microrganismos e Microbiologia das Fermentações, no Departamento de Biologia (DBI), todos situados na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Obtenção das matérias-primas

Foram utilizadas batatas da espécie *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, cultivar Ágata, adquiridas comercialmente em ponto de venda na cidade de Lavras, MG. A água de maceração de milho foi doada pela empresa Ingredion Brasil - Ingredientes Industriais Ltda., localizada na cidade de Mogi Mirim, SP.

Microorganismo

Bactéria do ácido láctico

O microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, espécie não amilolítica e homofermentativa, que foi utilizado neste estudo, foi cedido pela Fundação Oswaldo Cruz – FioCruz, Rio de Janeiro, RJ. Este microrganismo foi selecionado previamente em trabalho de Alves [25], por apresentar boa produtividade de L(+)-ácido láctico.

Manutenção, padronização e estoque da cultura

O microrganismo foi adquirido na forma liofilizada e, assim, uma etapa de ativação foi necessária. A ativação da cultura de *Lactobacillus rhamnosus* iniciou-se pela transferência do microrganismo liofilizado para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS), marca Himédia[®], composto por 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de carne, 20 g/L de glicose, 2 g/L de fosfato de dipotássio, 5 g/L de acetato de sódio, 2 g/L de citrato triamônico, 0,20 g/L de sulfato de magnésio e

0,05 g/L de sulfato de manganês e 1 g/L de Tween 80 previamente esterilizado em autoclave (121 °C/15 min). Em seguida, eles foram mantidos em estufa BOD, a 37 °C/48 h. A temperatura utilizada é considerada ótima para as bactérias lácticas (BAL) [26].

A etapa subsequente à ativação das bactérias foi a propagação. Após a verificação do aumento da turbidez do inóculo, ele foi, então, transferido para erlenmeyer 125 mL, contendo 50 mL de caldo MRS estéril e mantido em estufa BOD, a 37 °C/24 h.

Em seguida, a fim de preparar as culturas estoque, uma alíquota de 1 mL do novo inóculo que se encontrava em crescimento no caldo MRS foi transferida para eppendorfs, previamente esterilizado (121 °C/15 min) e centrifugada (Spinlab modelo SL-5AM) a 7.126 g/5 min, a fim de separar o microrganismo do caldo MRS. O sobrenadante foi descartado e o microrganismo centrifugado mantido no eppendorf. Posteriormente, 1 mL de meio congelante estéril foi acrescido ao microrganismo e cada eppendorf foi identificado e armazenado em condições de congelamento para uso futuro como cultura estoque.

O preparo do meio congelante se deu pela adição de 15 mL de glicerol, 0,5 g de peptona bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl, em 100 mL de água destilada. Após a homogeneização, o pH foi ajustado (7,2-7,4) utilizando-se NaOH 0,1 mol/L e a solução esterilizada (121 °C/15 min) [27].

Preparo do inóculo

O inóculo foi feito a partir da cultura estoque de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. Em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS estéril foi adicionado 1 mL da cultura estoque e mantido em estufa BOD, a 37 °C/24 h. Posteriormente, em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo MRS estéril, foram adicionados 10% (v/v) do inóculo anterior (5 mL) e

mantidos a 37 °C. Após 12 horas, foi conferido o valor de absorvância por meio da leitura em espectrofotômetro (600 nm) e 1% (v/v) do inóculo foi transferido para erlenmeyer contendo 300 mL de meio de fermentação de acordo com Alves [25] (APÊNDICE A), com base na correlação entre absorvância e o número de células viáveis por meio das curvas de crescimento, correspondente a uma contagem de 10^8 a 10^9 UFC/mL.

Delineamento composto central rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta

Foi realizado um DCCR de 2^3 com três pontos centrais, totalizando 17 experimentos. Os níveis dos pontos axiais foram calculados pela equação 1, segundo Rodrigues e Iemma [28], em que α é a distância dos pontos axiais e o n é o número de variáveis independentes, sendo igual a $\pm 1,68$

$$\alpha = (2n)^{1/4} \quad (1)$$

Neste estudo, três variáveis independentes foram estudadas: concentração de fonte de carbono (farinha de batata), concentração da fonte de nitrogênio (água de maceração de milho) e de CaCO_3 (marca Êxodo Científica®).

As variáveis independentes foram codificadas segundo a equação 2.

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

em que

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

X é o valor real da variável a ser calculada;

X_0 é o valor real da variável no ponto central;
 X_{+1} é o valor real da variável no nível superior;
 X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

A relação entre os valores codificados e reais das variáveis independentes para o DCCR encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595

| Variáveis | -1,68 | -1 | 0 | 1 | 1,68 |
|---|-------|-----|-----|-----|------|
| X_1 = Farinha de batata (g/L) | 113 | 140 | 180 | 220 | 247 |
| X_2 =Água de maceração de milho (g/L) | 15 | 25 | 40 | 55 | 65 |
| X_3 =CaCO ₃ (g/L) | 5 | 15 | 30 | 45 | 55 |

Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. Os erlenmeyers foram vedados com algodão e incubados em estufa BOD, a 37 °C. A temperatura utilizada é considerada ótima para as bactérias lácticas (BAL) [26]. Para cada tratamento, foi realizado estudo cinético no qual foram retiradas amostras de 15 mL, assepticamente, em intervalos de tempo de 0, 12, 24, 48 e 72 horas. Foi retirado 1 mL de cada tratamento de modo asséptico para contagem de células por plaqueamento nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. As amostras retiradas foram centrifugadas a 2.260 g/30 min e o sobrenadante armazenado em condições de congelamento (-5 °C) para, então, serem submetidos a análises de açúcares redutores (AR), pH e de ácido láctico. Foram calculados a produtividade e o rendimento de AL, o consumo de AR e o fator de crescimento. As análises estatísticas foram feitas com auxílio do *software Statistica* 8.0 [29], com 5% de significância. Após a conclusão do DCCR, foram ajustados modelos (equação 3)

e geradas superfícies de resposta, curvas de contorno e perfil de desejabilidade, segundo metodologia preconizada por Rodrigues e Iemma [28].

$$y = \beta'_0 + \beta_{1x_1} + \beta_{2x_2} + \beta_{3x_3} + \beta_{12x_1x_2} + \beta_{13x_1x_3} + \beta_{23x_2x_3} + \beta_{11x_1^2} + \beta_{22x_2^2} + \beta_{33x_3^2} \quad (3)$$

em que β'_0 é o termo de interceptação; β_1, β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; β_{12}, β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação; β_{11}, β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos e x_1, x_2 e x_3 são as variáveis codificadas.

A validação do modelo foi realizada por meio da repetição de um ensaio em triplicata nas condições de maior produção de L(+)-ácido lático. A concentração de ácido lático predita foi, então, comparada com dados resultantes dos experimentos.

Preparo do meio de fermentação a partir de batata

Foram adquiridos 45 kg de batatas, as quais foram lavadas em água corrente, secas, descascadas, picadas e deixadas em estufa com circulação de ar (Fanem/ Brasil), a 65 °C/72 horas. O material foi revolvido a cada 24 horas. Após a secagem, as batatas foram moídas num moinho de faca tipo Willey, modelo Star FT 80/1 e a farinha foi peneirada em tela de vazamento de 14 mesh (1,41 mm). Após a moagem, o lote de material foi homogeneizado por agitação e armazenado em recipientes plásticos tipo PET. Para a obtenção do hidrolisado, a farinha de batata foi pesada utilizando-se a proporção de farinha definida pelo delineamento experimental. As enzimas utilizadas neste trabalho foram cedidas pela empresa LNF Latino-Americana.

O processo de hidrólise enzimática do amido foi baseado no trabalho de Menezes [30], sendo realizado em três etapas: na primeira etapa da hidrólise, a

mistura teve o pH corrigido para faixa ótima de atuação da enzima (6,0-6,5), utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 2 mol/L (Próquímicos[®]). Os valores foram conferidos utilizando-se pHmetro Tecnopon, modelo mPA-210. A mistura foi aquecida em banho-maria (Quimis[®]), à temperatura de 90 °C/1 h, para geleificação do amido. Quando alcançada a temperatura, iniciou-se a segunda etapa, com a adição da enzima α -amilase (Termamyl 2X[®]) na concentração de 7,5 mL por kg de farinha de batata. A mistura foi mantida nessa temperatura por 2 horas, para hidrólise da cadeia linear do amido. Na terceira etapa, o pH foi ajustado para condições ótimas da enzima amiloglicosidase (AMG 300L[®]), entre 4,0 e 4,5, adicionando-se ácido clorídrico (HCl) 2 mol/L (Êxodo Científica[®]). A temperatura foi reduzida para 60 °C e, em seguida, foi adicionada a enzima, na concentração de 6,5 mL/kg de farinha de batata. A mesma temperatura foi mantida por 11 horas, a fim de que as dextrinas produzidas pela primeira enzima fossem hidrolisadas em monômeros de glicose [31]. Concluída a etapa de hidrólise, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e o pH ajustado para a faixa ótima de atuação das BAL, na faixa de pH entre 5–7 [4].

Rendimento do processo de hidrólise

O rendimento do processo de hidrólise foi obtido pela concentração de amido hidrolisado e a concentração de amido inicial ou em relação entre a glicose gerada e a concentração de glicose teórica, como segue a equação 4 [32].

$$\%R_{hidrólise} = \left(\frac{C_{amido\ hidrolisado}}{C_{amido}} \right) \times 100 = \left(\frac{C_{glicose}}{C_{glicose\ teórica}} \right) \times 100 \quad (4)$$

sendo $C_{glicose\ teórica} = 1,111 \times C_{amido\ inicial}$

Depois de concluída a etapa de hidrólise, o mosto foi filtrado em filtro de pano e suplementado conforme o delineamento e, após a homogeneização, foi esterilizado em autoclave (121 °C/15 min). O mosto foi resfriado e o inóculo adicionado. As fermentações foram conduzidas em estufa BOD, sem agitação, a 37 °C/72 h, dentro de erlenmeyers vedados com algodão. Os tratamentos do DCCR foram realizados em duplicata.

Verificação do modelo em escala ampliada

Posteriormente à verificação da melhor condição do DCCR, foi realizada uma ampliação de escala, por meio da utilização de um biorreator. Realizaram-se os mesmos procedimentos para o preparo do inóculo e para o preparo do meio de fermentação a partir de batata.

Foi utilizado o biorreator Sartorius Stedim Biotech modelo Biostat A plus, com capacidade de 5 L. Prepararam-se 3 L de meio de fermentação, que foi autoclavado por 121°C/ 20 min. O volume de inóculo adicionado foi de 1% (v/v). Os parâmetros para a condução do processo foram 37 °C sem agitação e sem aeração.

Foi realizado estudo cinético em que amostras de 30 mL foram retiradas, assepticamente, em intervalos de tempo de 0, 12, 24, 48 e 72 horas. Foi retirado 1 mL para a contagem de células por plaqueamento, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. As amostras retiradas foram centrifugadas a 2.260 g/30 min e o sobrenadante armazenado em condições de congelamento (-5 °C) para, então, serem submetidos a análises, em triplicata, de açúcares redutores (AR), pH, acidez e de ácido lático. Foram calculados a produtividade de AL, o consumo de AR, o rendimento em AL e o fator de crescimento.

Metodologia analítica

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os seus resultados expressos pela média e desvio padrão desses valores.

Caracterização das matérias-primas

A batata, a farinha da batata e a água de maceração de milho foram caracterizadas por meio das análises de teor de umidade, extrato etéreo, proteínas, cinzas, fibra bruta e densidade pela metodologia da AOAC [33]. Os resultados foram expressos em base úmida em g/100 g. O teor de amido foi avaliado pelo método de Somogyi modificado por Nelson [34].

Determinação de açúcar redutor (AR)

A concentração de AR foi determinada nos processos de hidrólise enzimática e nas amostras oriundas da fermentação, seguindo a metodologia descrita por Miller [35], utilizando-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) da marca Panreac[®]. Na determinação de AR, a reação foi direta com o DNS e os valores de absorbância medidos no espectrofotômetro (FEMTO 700 S Soft., Brasil) a 540 nm e expressos em g/L pela curva analítica de glicose (APÊNDICE B).

Determinação do consumo de açúcar redutor (AR)

A determinação do consumo de glicose foi calculado por meio da equação 5.

$$\text{Consumo de AR (\%)} = \frac{AR_{inicial} - AR_{final}}{AR_{inicial}} \times 100 \quad (5)$$

sendo

AR: açúcar redutor.

Determinação do pH e acidez titulável

Os valores de pH foram determinados diretamente no sobrenadante da amostra, com auxílio de potenciômetro digital de bancada (Tecnopon, modelo mPA-210) calibrado previamente com solução-tampão de pH 4,0 e 7,0.

Para a determinação da acidez titulável, foi diluído 1 mL de amostra em 50 mL de água destilada e titulado com solução de NaOH 0,01 mol/L, utilizando fenolftaleína 1% como indicador. A acidez titulável foi expressa em (g/L), conforme a equação 6 [33].

$$\text{AT em ácido láctico (g/L)} = \frac{V \times f \times 90 \times M}{A} \quad (6)$$

sendo

AT: acidez titulável;

V: volume da solução de NaOH gasto na titulação, em mL;

A: volume da amostra, em mL;

f: fator de correção da solução de hidróxido de sódio (NaOH);

90: fator de conversão do ácido láctico;

M: molaridade da solução de NaOH utilizada (0,01 mol/L ou 0,1 mol/L).

Determinação do ácido láctico

O AL formado no final do processo fermentativo, de cada tratamento, foi analisado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras foram descongeladas e centrifugadas (Sigma[®] 2K15), a 4 °C, com

15.052 g/10 min. O sobrenadante foi separado e filtrado através de membrana PVDF (0,22 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro). As amostras foram diluídas com água deionizada antes da injeção no cromatógrafo e mantidas sob congelamento para posterior análise.

O cromatógrafo utilizado é um equipamento Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada é de troca-iônica, modelo Shimpack SCR-101H, com 7,9 mm X 30 cm (Shimadzu).

O AL foi analisado utilizando-se metodologia modificada a partir de Schwan et al. [36], em duplicata analítica. Foi utilizado o detector de ultravioleta, com comprimento de onda selecionado em 210 nm e a coluna foi operada à temperatura de 50 °C. A fase móvel utilizada foi o ácido perclórico, na concentração 100 mM, a um fluxo de 0,6 mL/min. A quantificação foi realizada a partir da comparação com a curva analítica de ácido láctico, determinada utilizando-se padrões certificados da marca Sigma® (APÊNDICE D).

Determinação do isômero L(+)-ácido láctico

A presença do L(+)-ácido láctico foi determinada pelo kit enzimático (Megazyme®, Wicklow, Irlanda), com 98% de confiança.

Contagem de bactérias lácticas por plaqueamento

A contagem de BAL foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade ou "pour plate". As amostras foram diluídas decimalmente em água peptonada 0,1 % (m/v) até as diluições de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Posteriormente, uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi distribuída em placas de Petri e cerca de 15 mL de ágar MRS foram vertidos sobre as mesmas. As amostras foram homogeneizadas no meio de cultura, realizando-se movimentos aleatórios até a

secagem do meio e incubadas em estufa BOD, a 37 °C/72 h. As placas consideradas para contagem continham entre 25 e 250 colônias [37].

Determinação do fator de crescimento

O fator de crescimento da bactéria láctica foi calculado por meio da equação 7, para o tempo de 72 horas de fermentação.

$$\text{Fator de crescimento} = \frac{\text{Contagem de células}_{final}}{\text{Contagem de células}_{inicial}} \quad (7)$$

Determinação do rendimento e produtividade do ácido láctico

O rendimento e a produtividade em ácido foram calculados por meio das equações 8 e 9, para o tempo de 72 horas de fermentação.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{AL_{final}(\text{g/L})}{AR_{inicial} - AR_{final}(\text{g/L})} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{Produtividade (g/ L . h)} = \frac{AL_{final}(\text{g/L})}{t(\text{h})} \quad (9)$$

sendo

AR: açúcar redutor;

AL: ácido láctico;

t: tempo.

Resultados e Discussão

Caracterização das matérias-primas

Os resultados da análise química da batata cultivar Ágata utilizada para a elaboração da farinha e a composição centesimal da farinha de batata usada na formulação dos meios de fermentação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados da análise de composição centesimal da batata cv. Ágata e farinha de batata

| Parâmetros (%) | Batata sem casca | Farinha de batata 1º lote | Farinha de batata 2º lote |
|-----------------|------------------|---------------------------|---------------------------|
| Umidade | 85,7±0,2 | 7,0±0,4a | 4,12±0,01b |
| Lipídeos | 0,02±0,00 | 0,37±0,05a | 0,33±0,01a |
| Proteína | 1,87±0,14 | 8,35±0,44a | 9,0±0,8a |
| Cinzas | 0,78±0,27 | 4,01±0,08a | 4,4±0,4a |
| Fibra | 0,43±0,02 | 2,42±0,72a | 2,2±0,8a |
| Amido | 7,8±0,8 | 77±6a | 79±4a |

A farinha de batata (1º lote) foi utilizada no DCCR e o 2º lote de farinha de batata foi utilizado na validação do modelo em escala ampliada.

Médias seguidas por uma mesma letra, entre linhas, não diferem entre si significativamente, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, (TACO)[38], 82,9% de umidade, 1,8% de proteína, 0,6% de cinzas, 1,2% de fibra e traços de lipídeos foram encontrados para batata crua sem casca. Evangelista [39] encontrou 14,46 g/100 g de matéria seca, 10% de amido, 0,86% de cinzas, 1,42% de proteínas e 0,34% de fibras em porcentagem de matéria fresca de batata cultivar Ágata. Os valores encontrados da composição química da batata aproximam-se dos encontrados na literatura. Entretanto, diversos fatores podem interferir na composição centesimal do tubérculo de batata, como

o clima, o tipo de solo, a temperatura, a maturidade dos tubérculos, as condições ambientais de cada safra, etc. [39, 19].

A Resolução nº 263, de 17 de outubro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [40], estipula o máximo de umidade em farinhas de 15%. Em farinhas com umidade acima de 15%, há a possibilidade de desenvolvimento de microrganismos e diminuição da estabilidade, em função de reações químicas e enzimáticas que ocorrem com a presença de alto conteúdo de água, reduzindo a vida útil do produto. Os valores obtidos de umidade para cada lote de farinha de batata encontram-se dentro do estipulado pela legislação brasileira. Freitas et al. [41] encontraram teores de 7,90% de umidade para a farinha de batata da cultivar Monalisa. Não houve diferença significativa entre os lotes de farinha de batata, com exceção da umidade.

Os resultados da análise de composição centesimal da água de maceração de milho são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Resultados da análise de composição centesimal da água de maceração de milho

| Parâmetros | Água de maceração de milho |
|--|-----------------------------------|
| Umidade (%) | 57,8±0,4 |
| Lipídeos (%) | 0,07±0,02 |
| Proteína (%) | 19,68±0,25 |
| Cinzas (%) | 6,05±0,09 |
| Fibra (%) | 0,00±0,02 |
| Densidade (g/mL) | 1,202±0,005 |
| AR (g/L de glicose) | 1,112±0,005 |
| pH | 3,98±0,05 |
| Acidez titulável em ácido láctico (g/L) | 14,0±0,7 |

Os resultados da composição centesimal ficaram próximos aos encontrados por Chiani et al. [42], que obtiveram 47,5% de umidade, 1% de

lipídeos, 20,5% de proteína, 8,8% de cinzas, 1% de fibra e valor de pH entre 4 e 5, para água de maceração de milho. Entretanto, Choi et al. [43] encontraram pH de 3,8; 72,5 g/L de ácido láctico, 26 g/L de glicose, 22,4 g/L de frutose e 41,5 g/L de nitrogênio. Os resultados encontrados por Filipovic, Ristic e Sakac [44] foram pH 3,94, além de 5,27% de matéria seca, 50,84% de proteína bruta, 0% de lipídeos e fibras, 18,24% de cinzas e 3,50% de açúcares redutores, todos os valores expressos em base seca. Ligget e Koffler [45], ao analisarem a composição química da água de maceração, obtiveram densidade de 1,25 g/mL, 11% de açúcar redutor (em glicose), 5,1% de ácido láctico e valor de pH entre 3,7 e 4,1.

A AMM apresenta muita variabilidade em relação à sua composição química [45]. Essa variabilidade é devido a diferentes origens geográficas, épocas de colheita e processos de fabricação do milho [23].

Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR

Para todos os ensaios do DCCR, após o processo de hidrólise do amido da farinha de batata, foram obtidos teores de glicose acima de 95% de rendimento, tendo, para os tratamentos com concentração de 113 g/L, 140 g/L, 180 g/L, 220 g/L e 247 g/L de farinha de batata, a concentração de glicose obtida sido de 104 g/L, 129 g/L, 166 g/L, 203 g/L e 228 g/L, respectivamente.

Na Tabela 4 apresentam-se os valores reais (entre parênteses) e codificados do DCCR das variáveis estudadas: concentração de farinha de batata (FB), água de maceração de milho (AMM) e CaCO_3 , bem como as respostas obtidas para produção de ácido láctico, rendimento, consumo de glicose e fator de crescimento.

Tabela 4 Matriz do DCCR (valores reais e codificados) e variáveis respostas ácido láctico (g/L), rendimento (%), consumo de glicose (%) e fator de crescimento

| Trat. | Farinha de batata (g/L) | Água de maceração de milho (g/L) | CaCO ₃ (g/L) | Ácido láctico (g/L) | Rendimento (%) | Consumo de açúcar (%) | Fator de crescimento |
|-------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | -1 (140) | -1 (25) | -1 (15) | 72,0±0,0 | 90,0±3,5 | 62,0±2,3 | 233±64 |
| 2 | -1 (140) | -1 (25) | 1 (45) | 134,7±0,0 | 100±0,0 | 92,2±1,2 | 178±15 |
| 3 | -1 (140) | 1 (55) | -1 (15) | 78,5±0,0 | 90,3±2,6 | 67,2±1,9 | 93±17 |
| 4 | -1 (140) | 1 (55) | 1 (45) | 136,5±0,0 | 100±0,0 | 98,6±0,0 | 86±4 |
| 5 | 1 (220) | -1 (25) | -1 (15) | 83,9±0,0 | 79,6±2,9 | 52,0±2,0 | 122±3 |
| 6 | 1 (220) | -1 (25) | 1 (45) | 93,7±1,1 | 50,4±0,6 | 91,5±1,0 | 230±27 |
| 7 | 1 (220) | 1 (55) | -1 (15) | 82,0±1,9 | 62,2±2,7 | 65,0±4,0 | 74±8 |
| 8 | 1 (220) | 1 (55) | 1 (45) | 183,8±0,2 | 94,2±1,3 | 96,1±0,8 | 45±1 |
| 9 | -1,68(113) | 0 (40) | 0 (30) | 104,9±0,0 | 100±0,0 | 90,7±0,9 | 130±28 |
| 10 | 1,68 (247) | 0 (40) | 0 (30) | 98,3±0,0 | 75,6 ±0,1 | 57,0±1,0 | 132±3 |
| 11 | 0 (180) | -1,68 (15) | 0 (30) | 97,0±6,4 | 100±0,1 | 51,7±6,5 | 97±25 |
| 12 | 0 (180) | 1,68 (65) | 0 (30) | 137,4±1,0 | 100±0,4 | 74,2±0,3 | 139±53 |
| 13 | 0 (180) | 0 (40) | -1,68 (5) | 57,0±5,5 | 86,9±1,8 | 39,4±0,8 | 302±117 |
| 14 | 0 (180) | 0 (40) | 1,68 (55) | 157,0±1,9 | 97,4±0,2 | 96,9±0,2 | 496±161 |
| 15 | 0 (180) | 0 (40) | 0 (30) | 118,2±1,7 | 97,0±3,2 | 67,0±5,0 | 100±14 |
| 16 | 0 (180) | 0 (40) | 0 (30) | 113,74±1,2 | 97,0±3,2 | 64±5,0 | 74±14 |
| 17 | 0 (180) | 0 (40) | 0 (30) | 109,86±2,3 | 94,4±3,2 | 70±5,0 | 78±14 |

A maior concentração de AL (183,83 g/L), em 72 horas de fermentação, foi obtida no tratamento 8, com a utilização de 220 g/L de FB, 55 g/L de AMM e 45 g/L de CaCO₃, que também apresentou o valor mais alto de produtividade durante o processo fermentativo (2,553 g/L.h), com consumo de AR de 96,1% e rendimento de 94,2%. Foi observado que as bactérias lácticas aumentaram 2 ciclos logarítmicos ($4,4 \times 10^7$ a $2,3 \times 10^9$ UFC/mL), conforme Figura 1.

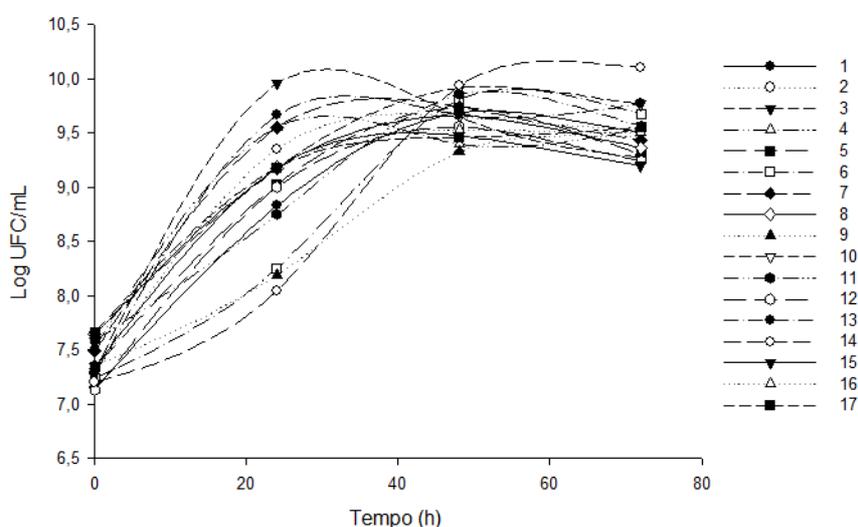


Figura 4 Cinética do crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 para cada tratamento, durante 72 horas de fermentação

O tratamento que apresentou concentrações ótimas, tanto para produção de ácido láctico como para consumo de açúcar e rendimento, foi o tratamento 14, sendo que o meio de fermentação consistia de 180 g/L de FB, 40 g/L de AMM e 55 g/L de CaCO₃. Nesse experimento, foram obtidos valores de 157 g/L de AL, 97,49% de rendimento, 2,181 g/L.h de produtividade e 96,9% de consumo de AR, em 72 horas de fermentação. Verificou-se, ainda, que o microrganismo *L. rhamnosus* aumentou 3 ciclos logarítmicos sua concentração celular ($1,6 \times 10^7$ a $1,3 \times 10^{10}$ UFC/mL), ao longo da fermentação.

Wee, Reddy e Ryu [46] analisaram quatro fontes diferentes de amido (milho, tapioca, batata, trigo e amido), com diferentes concentrações (50, 75, 100 e 125 g/L) e adição de 30 g/L de água de maceração de milho como fonte de nitrogênio para a produção de L(+)-ácido lático por *Enterococcus faecalis* RKY1. Obtiveram rendimento maior que 95% para cada fonte de amido. A maior concentração de AL foi de 129,90 g/L e rendimento de 1,04 g de g/g, a partir de 84 horas de fermentação, utilizando 125 g/L de amido de milho, tempo superior em 12 horas ao requerido no presente estudo.

Li et al. [24], para reduzir o custo de produção de L(+)-ácido lático, utilizaram farelo de trigo como fonte de carbono e AMM como fonte de nitrogênio. Os autores observaram que, utilizando meio de fermentação com 25 g/L de farelo de trigo hidrolisado e 30 g/L de AMM, foram obtidos rendimento de fermentação de 0,99 g/g de ácido lático e 3,75 g/L.h de produtividade, resultado mais elevado em comparação a 25 g/L de farelo de trigo hidrolisado e 15g/L de extrato de levedura (rendimento de 0,95 g/g e produtividade de 2,46 g/L.h), utilizando a cepa *Lactobacillus rhamnosus*.

Wang et al., [47] obtiveram produção eficiente de L(+)- ácido lático produzido a partir de farinha de mandioca por *Lactobacillus rhamnosus*. A alta concentração de AL (175,4 g/L) foi obtida utilizando-se 275 g/L de farinha de mandioca (açúcar total de 222,5 g/L), em processo simultâneo de sacarificação e fermentação (SSF) em batelada, com adição de 15 g/L de extrato de levedura e 165 g/L de CaCO₃. A produtividade foi de 1,8 g/L.h e o rendimento de 0,71 g/g. Neste estudo obteve-se, portanto, maior produção de ácido lático em relação à produtividade e rendimento.

A partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 4, foram feitas as análises de regressão múltipla para as variáveis produção de ácido lático (g/L), rendimento (%), consumo de açúcar (%) e fator de crescimento. Foram considerados significativos os parâmetros com ($p < 0,05$).

Na Tabela 5 mostram-se os coeficientes de regressão para a produção de ácido lático e consumo de açúcar e em negrito estão os parâmetros significativos.

Tabela 5 Coeficientes de regressão para produção de L(+)-ácido lático e consumo de açúcar por *L. rhamnosus* ATCC 9595

| Fonte de variação | Ácido lático (g/L) | | Consumo de açúcar (%) | |
|------------------------------------|--------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| | Regressão | p-valor | Regressão | p-valor |
| Média/ Interação | 113,960 | 0,000 | 66,356 | 0,000 |
| X₁(L) | 0,774 | 0,838 | -5,292 | 0,067 |
| X₁(Q) | -4,390 | 0,312 | 4,581 | 0,133 |
| X₂(L) | 12,047 | 0,013 | 4,906 | 0,085 |
| X₂(Q) | 1,131 | 0,787 | 0,719 | 0,797 |
| X₃(L) | 29,333 | 0,000 | 16,775 | 0,002 |
| X₃(Q) | -2,491 | 0,555 | 2,573 | 0,372 |
| X₁ X₂ | 9,989 | 0,074 | 0,740 | 0,823 |
| X₁ X₃ | -1,141 | 0,818 | 1,124 | 0,735 |
| X₂ X₃ | 10,942 | 0,055 | -0,902 | 0,786 |
| R² | 0,92 | | 0,89 | |

X₁:farinha de batata; X₂:água de maceração de milho, X₃:CaCO₃.

Também é adotada a reparametrização nos dados para se obter uma boa “normalidade” da função, por meio de uma boa precisão nos resultados [48]. Na Tabela 6 mostram-se os coeficientes do modelo reparametrizado, apenas os termos significativos, para produção de ácido lático e consumo de açúcar.

Tabela 6 Coeficientes de regressão, reparametrizados, para produção de L(+)-ácido láctico e consumo de açúcar por *L. rhamnosus* ATCC 9595

| Fonte de variação | Ácido láctico | | Consumo de açúcar (%) | |
|--------------------|---------------|---------|-----------------------|---------|
| | Regressão | p-valor | Regressão | p-valor |
| Média/ Interação | 109,345 | 0,000 | 72,676 | 0,000 |
| X ₂ (L) | 12,047 | 0,012 | - | - |
| X ₃ (L) | 29,333 | 0,000 | 16,775 | 0,000 |
| R ² | 0,80 | | 0,71 | |

X₂:água de maceração de milho, X₃:CaCO₃

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6, os termos lineares da concentração de AMM e de CaCO₃ apresentaram efeito significativo positivo sobre a produção de AL ($p < 0,05$). Para o consumo de açúcar, o termo linear da concentração do CaCO₃ apresentou efeito significativo positivo a 95% de confiança. Isso significa que um aumento de CaCO₃ proporciona um aumento da resposta de produção de ácido láctico e consumo de açúcar dentro dos limites estabelecidos neste estudo, e um aumento da concentração de AMM indica que haverá um aumento da produção de AL. A análise de variância (ANOVA) para os modelos de regressão reparametrizados da produção de AL e consumo de açúcar é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 Análise de variância para produção L(+)- ácido lático e consumo de açúcar por *L. rhamnosus* ATCC 9595

| Ácido lático | | | | | | |
|-----------------------|----------|----|---------|-------------------|-----------------------|---------|
| FV | SQ | gL | QM | F _{calc} | F _{tab (5%)} | p-valor |
| Regressão | 13720,63 | 2 | 6860,31 | 28,40 | 3,74 | 0,00 |
| Erro | 3381,31 | 14 | | | | |
| Total | 17101,93 | 16 | | | | |
| R ² = 0,80 | | | | | | |
| Consumo de açúcar (%) | | | | | | |
| FV | SQ | gL | QM | F _{calc} | F _{tab (5%)} | p-valor |
| Regressão | 3840,08 | 1 | 3840,07 | 36,65 | 4,54 | 0,00 |
| Erro | 1571,44 | 15 | 104,76 | | | |
| Total | 5411,52 | 16 | | | | |
| R ² = 0,71 | | | | | | |

^{FV} Fonte de variação; ^{SQ} Soma dos quadrados; ^{gL} Graus de liberdade; ^{QM} Quadrado médio

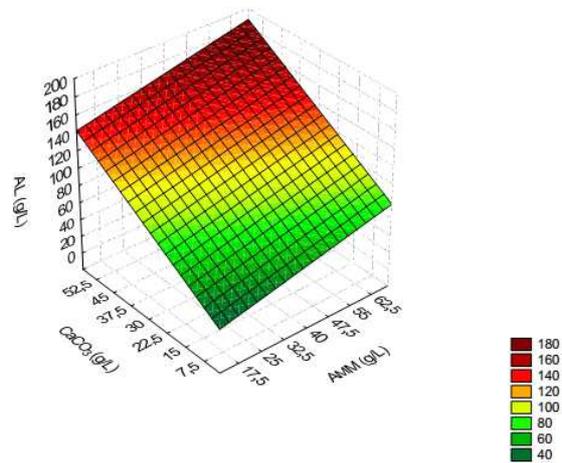
Observa-se, na Tabela 7, que os modelos de regressão para os dados de produção de AL e consumo de açúcar são significativos pelo Teste F, sendo $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ para ambos os modelos, além de apresentar o p-valor baixo. O bom ajuste do modelo foi também verificado pelo coeficiente de determinação (R^2), sendo o valor acima de 0,70 considerado satisfatório para confirmar a significância do modelo [28].

O modelo de regressão codificado obtido para a produção de AL está expresso na equação 10 e a equação 11 mostra o modelo de regressão obtido pelo consumo de açúcar (CA (%)).

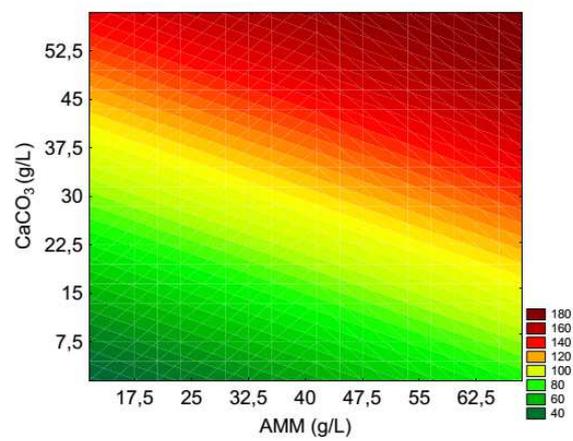
$$AL = 109,34 + 12,047 x_2 + 29,333 x_3 \quad (10)$$

$$CA (\%) = 72,67 + 16,775x_3 \quad (11)$$

Na Figura 2 apresentam-se a superfície de resposta e a curva de contorno para a produção de AL pelo microrganismo *L. rhamnosus* ATCC 9595.



A



B

Figura 2 Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* ATCC 9595, em função das variáveis AMM e CaCO₃

Analisando-se a Figura 2, não foi possível confirmar um valor ótimo para a produção de L(+)-ácido láctico. Entretanto, pode-se definir uma região com valores bastante altos de produção de L(+)-ácido láctico, que corresponde a meios de fermentação com concentrações superiores a 45 g/L para CaCO₃, superiores a 47,5 g/L para AMM e superiores a 180 g/L de farinha de batata.

As bactérias do ácido láctico são microrganismos muito exigentes que requerem múltiplos aminoácidos e vitaminas para o seu crescimento [49, 21]. Neste estudo, obteve-se uma produção eficiente de L(+)-ácido láctico, a partir da adição da AMM como fonte de suplementação do meio de fermentação feito de farinha de batata hidrolisada.

Oh et al. [50] utilizaram cevada, trigo e milho hidrolisados por enzimas amilolíticas comerciais para a produção de AL por *Enterococcus faecalis* RKY1. A produtividade de AL, utilizando cevada e trigo sem adição de nenhum nutriente adicional, foi de 0,8 g/L.h e a biomassa seca obtida foi de 2,3 g/L. Quando comparada esta produtividade ao meio com adição de nutrientes contendo 200 g/L de hidrolisado de farinha de trigo integral, 15 g/L de água de maceração de milho e 1,5 g/L de extrato de levedura, a produtividade do AL e a biomassa seca foram de 5,36 g/L.h e 14,08 g/L, respectivamente. Este resultado representou uma melhoria de 106% na produtividade do AL e 138% na biomassa seca, em comparação com a fermentação de hidrolisado de farinha de trigo integral apenas.

Yu et al. [21] utilizaram água de maceração de milho em substituição ao extrato de levedura, glicose, melão, Tween 80 e MnSO₄ para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. A concentração máxima de AL foi de 113,05 g/L, utilizando 118,20 g/L de glicose, 37,27 mL/L de melão, 42,54 g/L de água de maceração de milho, 1,52 mL/L de Tween 80 e 0,30 g/L de MnSO₄. Os autores também compararam o meio otimizado com

água de maceração de milho com outro meio composto por extrato de levedura como fonte de nitrogênio, obtendo um incremento de 30,4% na produção de AL.

Liu et al. [51] estudaram os efeitos de cinco fontes alternativas de nitrogênio: broto de malte, água de maceração de milho, NH_4Cl , NH_4NO_3 e citrato de diamina sobre a produção de L(+)-ácido lático por *Lactobacillus plantarum* As1.3. O broto de malte e a AMM mostraram efeitos significativos na produção de ácido lático e os seus valores ótimos no meio foram de 16,0 g/L e 12,0 g/L, respectivamente, com produtividade de 3,20 g/L.h e rendimento de 0,98 (g/g). Os resultados obtidos pelos autores indicam que a produção de AL pode ser aprimorada com fontes alternativas de nitrogênio de baixo custo.

Dessa forma, a AMM pode ser utilizada em substituição ao extrato de levedura, uma vez que o alto custo do extrato de levedura tem um impacto negativo para utilização em processos industriais [50]. Sabe-se que a AMM tem, em sua composição, proteínas, aminoácidos, vitaminas do complexo B e outros nutrientes [52] e tem sido amplamente estudada para suplementação em processos fermentativos [53].

Na Figura 3 mostra-se o gráfico de regressão em função da variável CaCO_3 e o consumo de açúcar experimental e o consumo de açúcar predito.

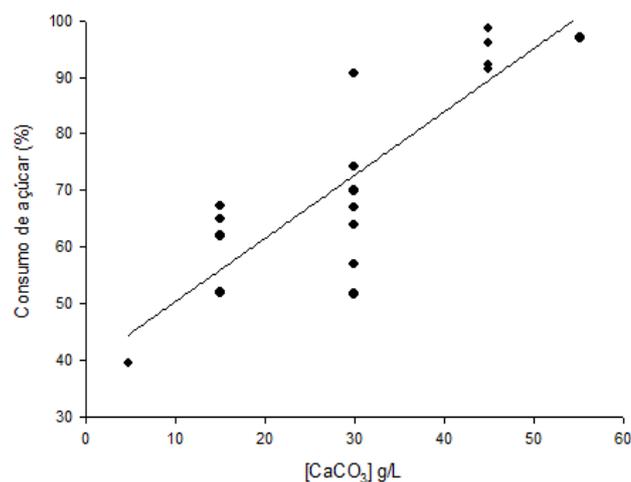


Figura 3 Consumo de açúcar (%) pelo microrganismo *L. rhamnosus* ATCC 9595, em função da concentração de CaCO₃

Wee et al. [55] avaliaram a produtividade, o rendimento, o consumo de açúcar e a produção de L(+)-ácido lático por *Enterococcus faecalis* RKY1, utilizando 200 g/L de melaço (equivalente a 102 g/L de glicose), sob diferentes pH (5 a 9). Os autores observaram que a maior produção (96,1 g/L) e o maior rendimento obtido de AL (96,3 %) foram em pH 6. No presente trabalho, as fermentações iniciaram em valores de pH entre 6 e 7, e as melhores produções de AL foram obtidas utilizando-se as maiores concentrações de CaCO₃, definidas pelo delineamento experimental, que foi de 45 e 55 g/L e o pH final variou de 4,20 a 4,85. Na Figura 4 observa-se o decaimento do pH, dentre os tratamentos, durante 72 horas de processo fermentativo.

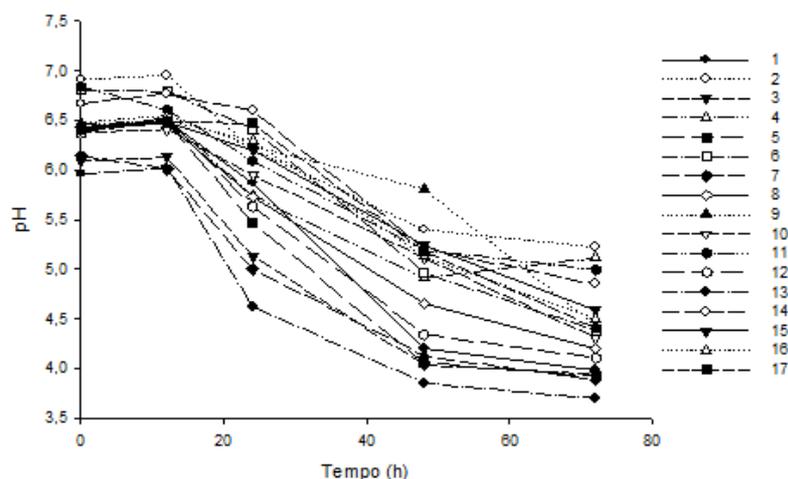


Figura 4 Evolução do pH, dentre os tratamentos, para a produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* ATCC 9595, durante 72 horas

Nakano, Ugwu e Tokiwa [58] estudaram os efeitos de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH e NaOH como agentes neutralizantes para a produção de ácido láctico, por *Lactobacillus delbrueckii*, a partir de arroz quebrado em processo simultâneo de sacarificação e fermentação (SSF). Segundo os autores, a molaridade do lactato no meio de fermentação é menor quando se adiciona $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sendo que, a partir de 2 moles de ácido láctico, formado a partir de 1 mol de glicose, forma-se 1 mol de lactato de cálcio, sendo composto por dois íons lactatos e um cátion de cálcio. Isso resulta em alta eficiência na neutralização na produção ácido láctico [58]. O mesmo ocorre quando se utiliza CaCO_3 no meio de fermentação para controle de pH.

Mussatto et al. [54] avaliaram o controle de pH, com adição de NaOH 5M, e a suplementação do meio MRS com hidrolisado de cevada. O meio com controle de pH atingiu produção de 35,54 g/L de ácido láctico com 0,99 g/g de glicose consumida, enquanto sem o controle de pH a produção de AL foi de

13,02 g/L. Os autores observaram que o tratamento sem o controle de pH, o metabolismo do microrganismo *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 foi afetado, resultando em menor crescimento celular durante a fermentação e o consumo de glicose para a produção de AL cessou depois de 12 horas de processo fermentativo.

Na Tabela 8 mostram-se os coeficientes de regressão para o rendimento em ácido lático e fator de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595. Em negrito são demonstrados os parâmetros significativos e, na Tabela 9, mostram-se os coeficientes dos modelos reparametrizados.

Tabela 8 Coeficientes de regressão para rendimento em ácido lático e fator de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595

| Fonte de variação | Rendimento | | Fator de crescimento | |
|-------------------------------|---------------|--------------|----------------------|--------------|
| | Regressão | p-valor | Regressão | p-valor |
| Média/ Interação | 98,779 | 0,000 | 90,112 | 0,132 |
| X₁ (L) | -9,893 | 0,014 | -8,475 | 0,743 |
| X ₁ (Q) | -5,822 | 0,128 | -3,803 | 0,893 |
| X ₂ (L) | 1,949 | 0,544 | -28,907 | 0,282 |
| X ₂ (Q) | -1,500 | 0,670 | -8,406 | 0,767 |
| X ₃ (L) | 2,949 | 0,367 | 25,131 | 0,345 |
| X ₃ (Q) | -4,281 | 0,245 | 91,151 | 0,012 |
| X ₁ X ₂ | 3,250 | 0,443 | -0,125 | 0,997 |
| X ₁ X ₃ | -2,100 | 0,616 | 17,625 | 0,603 |
| X ₂ X ₃ | 7,625 | 0,098 | -11,125 | 0,741 |
| R ² | 0,74 | | 0,70 | |

X₁:farinha de batata; X₂:água de maceração de milho, X₃:CaCO₃

Tabela 9 Coeficientes de regressão, reparametrizados, para rendimento em ácido láctico e fator de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595

| Fonte de variação | Rendimento | | Fator de crescimento | |
|--------------------|------------|---------|----------------------|---------|
| | Regressão | p-valor | Regressão | p-valor |
| Média/ Interação | 89,464 | 0,000 | 78,080 | 0,006 |
| X ₁ (L) | -9,893 | 0,007 | - | - |
| X ₃ (Q) | - | | 93,928 | 0,000 |
| R ² | 0,39 | | 0,55 | |

X₁:farinha de batata; X₃:CaCO₃

De acordo com os resultados estatísticos apresentados nas Tabelas 8 e 9, apenas o termo linear da concentração da farinha de batata foi estatisticamente significativo sobre o rendimento de AL ($p < 0,05$). O sinal do coeficiente foi negativo, ou seja, a diminuição da concentração de FB proporciona um aumento do rendimento de ácido láctico.

É conhecido na literatura que há diminuição da concentração de ácido láctico devido à inibição do microrganismo pela alta concentração de substrato [1]. Em estudos de cinética de produção de AL, a utilização de até 200 g/L de glicose não inibe a produção de AL por *Lactobacillus* [49,59].

O único coeficiente significativo ($p > 0,05$) para a variável dependente fator de crescimento do *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi o termo quadrático da concentração de CaCO₃ (g/L). O sinal do coeficiente foi positivo, indicando que o crescimento do *Lactobacillus* foi maior em concentrações mais elevadas de CaCO₃.

A ANOVA para os modelos de regressão reparametrizados de rendimento em AL e fator de crescimento é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 Análise de variância rendimento de ácido láctico em ácido láctico e fator de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595

| Rendimento em ácido láctico | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-------------------------|-----------------------------|----------------|
| FV | SQ | gL | QM | F_{calc} | F_{tab (5%)} | p-valor |
| Regressão | 1335,51 | 1 | 1335,51 | 9,43 | 4,54 | 0,00 |
| Erro | 2123,16 | 15 | 141,54 | | | |
| Total | 3458,67 | 16 | | | | |
| R ² = 0,39 | | | | | | |
| Fator de crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 | | | | | | |
| FV | SQ | gL | QM | F_{calc} | F_{tab (5%)} | p-valor |
| Regressão | 114517,58 | 1 | 114517,57 | 20,39 | 4,54 | 0,00 |
| Erro | 84214,7 | 15 | 5614,3 | | | |
| Total | 198732,2 | 16 | | | | |
| R ² = 0,55 | | | | | | |

^{FV} Fonte de variação; ^{SQ} Soma dos quadrados; ^{gL} Graus de liberdade; ^{QM} Quadrado médio

Por meio da análise da ANOVA (Tabela 10), observa-se que, apesar de os modelos de regressão terem sido significativos para ambas as respostas, rendimento em AL e fator de crescimento do *L. rhamnosus* ATCC 9595, no entanto, por meio do teste F ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$), não apresentaram um bom ajuste, o que pode ser verificado pelo coeficiente de determinação (R^2), não sendo possível gerar gráficos de superfície de resposta para essas variáveis dependentes.

Validação do modelo

A estimativa das condições ótimas para a validação dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcar foi realizada com base nos modelos estatísticos propostos e com o auxílio da técnica de otimização simultânea denominada “função desejabilidade”, conforme Figura 5.

De acordo com a Figura 5, as concentrações otimizadas das variáveis estudadas foram acima de 120 g/L para farinha de batata, acima de 55 g/L para água de maceração de milho e acima de 45 g/L para o CaCO_3 .

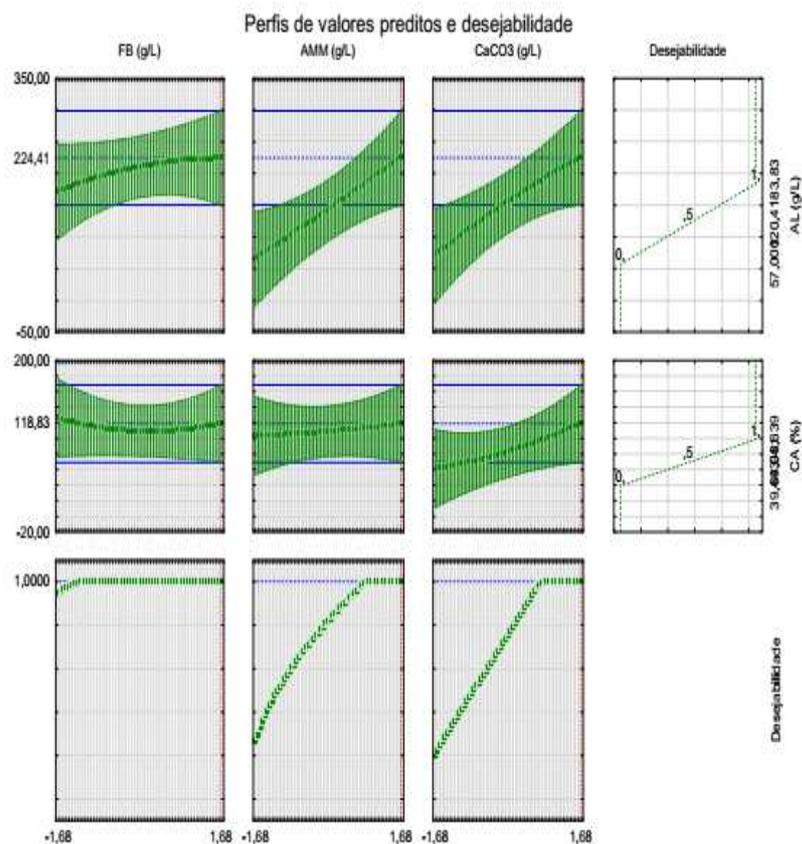


Figura 5 Perfis dos valores preditos e deseabilidade para as respostas de produção de L(+)- ácido láctico e consumo de açúcar pelo microrganismo *L. rhamnosus* ATCC 9595

Para a validação do modelo, na Tabela 11 apresentam-se os valores reais, em g/L, da concentração de farinha de batata (FB), água de maceração de milho (AMM) e CaCO_3 e os valores codificados, entre parênteses, das variáveis estudadas, na faixa máxima de produção de AL e consumo de açúcar, bem como

as respostas obtidas de concentração de ácido láctico e consumo de açúcar experimental, concentração de ácido láctico e açúcar predito e erro relativo.

Tabela 11 Validação do modelo para produção de L(+)-ácido láctico e consumo de açúcar pelo microrganismo *L. rhamnosus* ATCC 9595

| Ácido láctico | | | | | | |
|-------------------|---------------|--------------|-------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|
| Ensaio | FB | AMM | CaCO ₃ | AL experimental (g/L) | AL predito (g/L) | Erro relativo (%) |
| 1 | 210 (0,75) | 65 (1,68) | 55 (1,68) | 179,2±2,8 | 178,8 | 0,6 |
| Consumo de açúcar | | | | | | |
| Ensaio | FB | AMM | CaCO ₃ | Consumo experimental (%) | Consumo predito (%) | Erro relativo (%) |
| 1 | 210 (0,75) | 65 (1,68) | 55 (1,68) | 97,2±0,7 | 100 | -3,7 |

Pode-se observar, na Tabela 11, que os erros relativos, tanto para o ácido láctico quanto para o consumo de açúcar, foram baixos. Isso indica que os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios em relação às variáveis respostas, estando os modelos para ácido láctico e consumo de açúcar, portanto, validados.

Identificação do isômero produzido

A determinação do isômero L(+), realizada pelo kit enzimático, confirmou a presença do isômero nas amostras. Em estudos anteriores, Lu et al. [60] e Wang et al. [61] afirmaram que o *Lactobacillus rhamnosus* é capaz de produzir o isômero L (+)-ácido láctico em grau de pureza elevado.

A capacidade de produzir o L(+)-ácido láctico opticamente puro, a partir de subprodutos agrícolas, é importante para a aplicação industrial [62]. A destinação do AL no setor industrial varia de acordo com o grau de pureza óptica. O ácido láctico com pureza entre 20% e 50% é denominado grau técnico, acima de 80% é chamado de grau alimentar e acima de 90%, de grau farmacêutico e plástico [63].

Cinética da fermentação em biorreator

A produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 foi realizada em biorreator utilizando-se a mesma concentração utilizada na etapa da validação do modelo, 210 g/L de FB (correspondente a 193 g/L de glicose), 65 g/L de AMM, 55 g/L de CaCO_3 e 1% do inóculo. Durante o processo fermentativo (72 horas), foram feitas as amostragens, com as quais se podem observar a cinética do consumo de substrato e a formação do AL (Figura 6), a evolução do pH (Figura 7) e a viabilidade celular do *L. rhamnosus* ATCC 9595 (Figura 8).

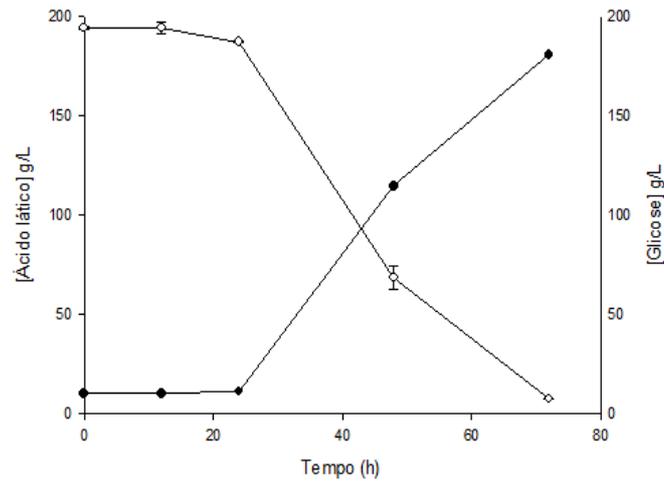


Figura 6 Cinética do consumo de substrato e produção de L (+)- ácido láctico utilizando *L. rhamnosus* ATCC 9595; (o) glicose e (•) ácido láctico

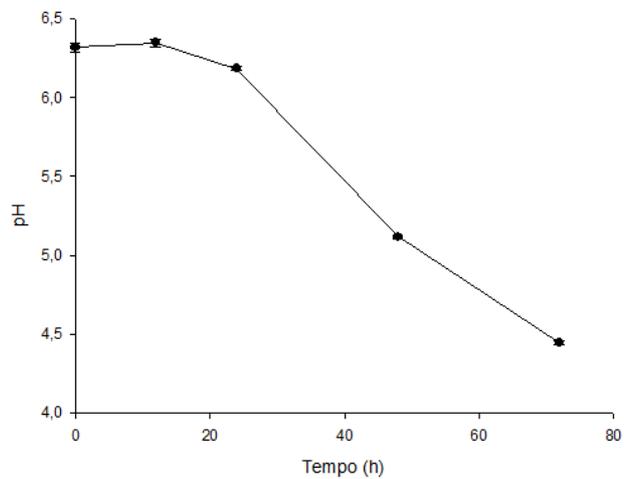


Figura 7 Evolução do pH durante a fermentação em biorreator para produção de L (+)-ácido láctico utilizando *L. rhamnosus* ATCC 9595

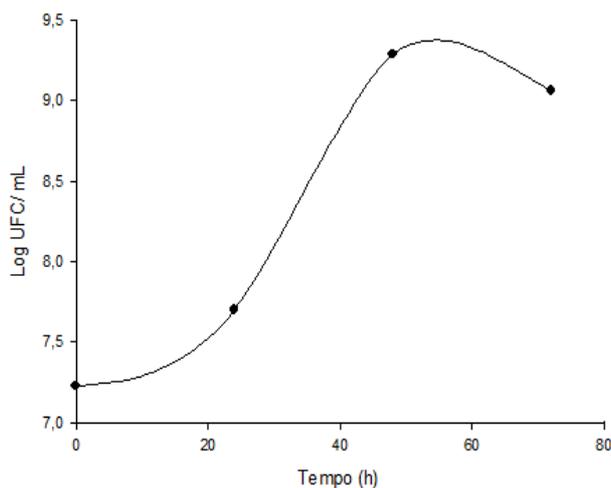


Figura 8 Cinética do crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595 para produção de L (+)- ácido lático em biorreator

Pode-se observar, nos gráficos apresentados, que não houve consumo de glicose, proveniente da farinha de batata hidrolisada, em até 24 horas, assim como não ocorreram abaixamento expressivo do pH e a formação de ácido lático durante esse período. A viabilidade de células, no entanto, aumentou desde a adição do inóculo ($1,7 \times 10^7$ a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL) durante 24 horas, correspondendo à fase de adaptação do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

A partir de 24 horas de fermentação, pôde-se verificar um decréscimo contínuo do consumo de glicose até 72 horas, quando o substrato foi quase totalmente consumido. O inverso ocorreu para a formação de ácido lático, que aumentou continuamente após 24 horas de fermentação, sendo que, ao final de 72 horas, foram produzidos 180,45 g/L de AL.

A evolução do pH, conforme Figura 7, apresentou um decréscimo a partir de 24 horas de cultivo, concomitante com a produção de ácido lático. Durante o período entre 24 a 48 horas de fermentação, a produção de AL aumentou de 11 g/L para 114,36 g/L e o pH variou de 6,2 a 5,2. De acordo com

Büyükkileci e Harsa [64], LeBlanc et al., [65] e Yuwono e Kokugan [66], para a maioria dos *Lactobacillus* o pH entre 5 e 6 é ideal para o crescimento e a produção de ácido láctico.

O pH, ao final da fermentação, foi de 4,4, corroborando Panesar et al. [67] que afirmam que valores baixos de pH levam à inibição da produção de ácido láctico e a fermentação cessa em pH com valor abaixo de 4,5. A adição de CaCO_3 , por meio da neutralização do AL formado, permitiu a condução da fermentação por um tempo mais longo, sob as condições de pH ótimo para a produção de L (+)-ácido láctico pelo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Durante as primeiras 24 horas, houve adaptação do mesmo ao meio de cultivo e, após 24 horas de fermentação, observa-se que o crescimento do *L. rhamnosus* foi expressivo, aumentando de 5×10^7 a $1,9 \times 10^9$ UFC/mL até 48 horas de processo fermentativo. Após esse período, foi observado um pequeno decréscimo na viabilidade do *L. rhamnosus* ATCC 9595, apresentando contagem final de $1,1 \times 10^9$ UFC/mL em 72 horas, provavelmente devido ao acúmulo de ácido láctico e a diminuição do pH reduz a duração da fase estacionária. As curvas de crescimento das células apresentam uma fase estacionária curta e, em seguida, entram na fase de morte [68].

No presente trabalho, foi produzido no biorreator 180,45 g/L de ácido láctico, obtendo rendimento de 96,7% e produtividade de 2,506 g/L.h, semelhante ao resultado encontrado em escala reduzida com a mesma composição de meio de fermentação, realizada em erlenmeyers, a concentração de AL de 179,2 g/L em 72 horas de processo fermentativo. Coelho et al. [69] obtiveram resultados diferentes com a variação de escala, ao realizarem a fermentação otimizada constituída de melaço (193,50 g/L), água de maceração de milho (37,50 mL/L), K_2HPO_4 (2,65 g/L) e Tween 80 (0,83 mL/L), em biorreator utilizando o microrganismo *Lactobacillus plantarum* LMISM6. Após 48 horas de fermentação, obtiveram uma produção de AL de 89,99 g/L, enquanto a produção

em escala reduzida (frascos agitados em shaker), com a mesma composição do meio de fermentação, o AL obtido foi de 94,8 g/L.

Conclusão

As fontes de carbono e nitrogênio obtidas de subprodutos agroindustriais se mostraram adequadas para a produção de AL, diminuindo o custo de produção e contribuindo com processos mais sustentáveis, seguindo os preceitos da química verde.

A farinha de batata pode ser adicionada em quantidades de até 220 g/L, o que não alterará a produtividade do AL. A água de maceração de milho se mostrou excelente substituto do extrato de levedura, minimizando o custo de produção e o carbonato de cálcio contribuiu para o maior rendimento e produtividade do processo.

A aplicação da metodologia de superfície de resposta se mostrou uma ferramenta útil para se obter alto rendimento e produção de AL por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, utilizando excedentes da produção agroindustrial.

Referências

1. Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31, 877–902.
2. Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of biotechnology*, 156, 286–301.
3. Adsul, M., Varma, A. J., Gokhale, D.V. (2006). Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. *Green Chemistry*, 9, 58-62.
4. Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 87-107.

5. Vijayakumar, J.; Aravindan, R., & Vruthagiri, T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22, 245–264.
6. Wee, Y. J., Kim, J. N., & Ryu, H. W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 163–172.
7. Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (1997). L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20,301–307.
8. John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey A. (2006). Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41,759–63.
9. Altaf, M. D., Naveena, B. J., Reddy, G. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+)-lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresource Technology* . 98, 498–503.
10. Hujanen M., & Linko Y. Y. (1996). Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 307–313.
11. Kwon, S., Lee, P. C.; Lee, E. G., Chang, Y. K., & Chang, N. (2000). Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate *Enzyme and Microbial technology*, 26, 209-215.
12. Tinoi, J., Rakariyatham, N., & Deming, R. L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40, 2551-2557.
13. John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 524-534.
14. Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, A. C., & Oliveira, R. P. Z. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 70-83.
15. Poliakoff, M., Fitzpatrick, J. M., Farren, T. R., & Anastas, P. T. (2002). Green chemistry: Science and politics of change. *Science*, 297, 807- 810.
16. Pereira, C. A., Carli, L., Beux, S., Santos, M. S., Busato, S. B., Kobelnik, M., & Barana, A. C. (2005). Utilização de farinha obtida a partir de rejeito de batata na elaboração de biscoitos. *Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia*, 1, 19–26.
17. Barampouti, E. M. P., & Vlyssides, A. G. (2005). Dynamic modeling of biogas production in an UASB reactor for potato processing wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 106, 53–58.

18. Misha, B. K., & Arora, A. (2004). Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 94, 9–12.
19. Fernandes, A. M., Soratto, R. P., Evangelista, R. M., & Nardin, I. (2010). Qualidade físico-química e de fritura de tubérculos de cultivares de batata na safra de inverno. *Horticultura Brasileira*, 28, 299-304.
20. Delgado, R., Castro, A. J., & Vazquez, M. (2009). A kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). *LWT- Food Science and Technology*, 42, 797-804.
21. Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X., & Feng, Y. (2008). Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 496-502.
22. Rivas, B., Moldes, A. B., Domínguez, J. M., & Parajó J. C. (2004). Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*. 97, 93–98.
23. Gao, Y., & Yuan, Y. J. (2011). Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor un 2-keto-L-gulononic acid fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9845-9853.
24. Li, Z., Han, L., Ji, Y., Wang, X., & Tan, T. (2010). Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 138-142.
25. Alves, M. L. F. (2014). Produção de L(+) ácido láctico por bactérias lácticas utilizando meios com batata. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Lavras, Lavras.
26. Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., Von Wright, A., & Ouwehand, A. editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, p. 1-72.
27. Souza, E. R. N., Tebaldi, V. M. R., Piccoli, R. H. (2015). Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17, 528-533.
28. Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. (2014). *Experimental Design and Process Optimization*. Campinas: CRC Press, 336 p.
29. STATISTICA, (2008). Data Analysis Software System. Disponível em: www.stasolft.com.
30. Menezes, A. G. T., Menezes, E. G. T., Alves, J. G. L. F., Rodrigues, L. F., & Cardoso, M. G. (2016). Vodka production from potato (*Solanum tuberosum* L.) using three *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Journal of the Institute of Brewing*, 122, 76-83.

31. Pavlak, M. C. M., Abreu-Lima, T. L., & Carreiro, S. C. (2011). Estudo da fermentação do hidrolisado de batata doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, 34, 82-86.
32. Curvelo-Santana, J. C., Ehrhardt, D.D., & Tambourgi, E. B. (2010). Otimização da produção de álcool de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 613-617.
33. Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official methods of analysis of Association Analytical Chemists. 18nd ed., Gaithersburg, Maryland.
34. Nelson, N. A. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.
35. Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426.
36. Schwan, R. F., Mendonça, A. T., Silva, J. J., Silva, J. R., Rodrigues, V., & Wheals, A. E. (2001). Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 89-96.
37. Silva, N., Junqueira, V., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., & Gomes, R.A.R. (2010). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4 edição. São Paulo: Livraria Varela, 614p.
38. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentos. (2011). Tabela brasileira de composição de alimentos. 4. ed. Campinas: NEPA.
39. Evangelista, R. M., Nardin, I., Fernandes, A. M., & Soratto, R. P. (2011). Qualidade nutricional e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 953-960.
40. _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 263, de 17 de outubro de 2005.
41. Freitas, A. A., Kwiatkowski, A., Tanamati, A. A. C., & Fuchs, R. H. B. (2005). Uso de farinhas de batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.), cv. Monalisa em misturas para cobertura de empanados de frango. *Ciências Exatas Terra, Ciências Agrícolas e Engenharia*, 11,17-26.
42. Chiani, M., Akbarzadeh, A., Farhangi, A., & Mehrabi, M. R. (2010). Production of desferrioxamine B (desderal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13, 1151-1155.
43. Choi, J., Jang, Y. S., Cho, J. H., Seung, D., Lee, S. Y., Papoutsaki, E. T., Bennet, G. N., & Song, H. (2013). Characterization and evaluation of corn steep liquid in acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18, 266-271.
44. Filipovic, S. S., Ristic, M. D., & Sakac, M. B. (2002). Technology of corn steep application in animal mashes and their quality. *Romanian Biotechnological Letters*, 7, 705-710.

45. Liggett, W. R., & Koffler, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Universidade Lafayet*, 12, 297-311.
46. Wee, Y., Reddy, L. V. A., & Ryu, H. W. (2008). Fermentative production of L(+)-lactic acid from starch hydrolyzate and corn steep liquor as inexpensive nutrients by batch culture of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, 83, 1387–1393.
47. Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yang, C., Yu, B., Li, Q., Ma, C., & Xu, P. (2010). Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresource Technology*, 101, 7895–7901.
48. Tomazella, V. L. D., & Fogo, J. C. (2001). Uma reparametrização para a função de confiabilidade considerando o modelo de regressão valor extremo com dados de tempo de vida acelerado. *Revista de Matemática e Estatística*, 19, 85-101.
49. Kadam, S. R., Patil, S. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gokhale, D. V. (2006). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41, 120-126.
50. Oh, H., Wee, Y. Y., Yun, J. S., Han, S. H., Jung, S., & Ryu, H. W. (2005). Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource. Technology*, 96, 1492–1498.
51. Liu, B., Yang, M., Qi, B., Chen, X., Su, Z., Wan, Y. (2010). Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 212-219.
52. Marták, J., Schlosser, S., Sabolová, E., Kristoffiková, L., & Rosenberg, M. (2003). Fermentation for lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation. *Process Biochemistry*, 38, 1573–1583.
53. Coelho, L. F., Lima, C. J. B., Bernardo, M. P., Alvarez, G. M., & Contiero, J. (2010). Improvement of L(+)-latic acid production from cassava wasterwater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1944-1950.
54. Mussatto, S. I., Fernandes, M., Mancilha, I. M., & Roberto, I. C. (2008). Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 437–444.
55. Wee, Y. J., Kim, J. N., Yun, J. S., & Ryu, H. W. (2004). Utilization of sugar molasses for economical L-(+) lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Tecnology*, 35, 568-573.
56. Hetényi, K., Németh, A., & Sevela, B. (2011). Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50, 293- 299.

57. Hartke, A., Bouche, S., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1996). The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Current Microbiology*, 33, 194–199.
58. Nakano, S., Ugwu, C.U., & Tokiwa, Y. (2012). Efficient production of D(–)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)₂ as a neutralizing agent. *Bioresource Technology*, 104, 791–794.
59. Min-tian, G., Koide, M., Gotou, R., Takanashi, H., Hirata, M., & Hano, T. (2005). Development of continuous electrodialysis fermentation system for based production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. *Process Biochemistry*, 40, 1033–1036.
60. Lu, Z., He, F., Shi, Y., Lu, M., & Yu, L. (2010). Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrient. *Bioresource Technology*, 101, 3642–3648.
61. Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yang, C., Yu, B., Li, Q., Ma, C., & Xu, P. (2010). Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresource Technology*, 101, 7895–7901.
62. Wee, Y., Reddy, L.V.A., & Ryu, H.W. (2008). Fermentative production of L(+)-lactic acid from starch hydrolyzate and corn steep liquor as inexpensive nutrients by batch culture of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, 83, 1387–1393.
63. Vijayakumar, J.; Aravindan, R., & Viruthagiri, T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22, 245–264.
64. Büyükkileci, A. O., & Harsa, S. (2004) Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1036–1040.
65. LeBlanc, J. G., Garro, M. S., & Giori, G. S. (2004). Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α-galactosidase activity and fermentation products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 119–123.
66. Yuwono, S. D., & Kokugan, T. (2008). Study of the effects of temperature and pH on lactic acid production from fresh cassava roots in tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 175–183.
67. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, 1–14.
68. Fu, W., & Mathews, A. P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 163–170.
69. Coelho, L. F., Lima, C. J. B., Rodvalho, C. M., Bernardo, M. P., & Contiero, J. (2011). Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum*

LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 27-36.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, determinaram-se as variáveis que exerceram maior influência no desempenho do processo fermentativo para a produção de L(+)-ácido láctico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, por meio da aplicação da metodologia de planejamento experimental sequencial. Por meio da utilização do delineamento Plackett-Burman, o carbonato de cálcio foi selecionado para a etapa de otimização.

No delineamento composto central rotacional (DCCR) obteve-se uma produção eficiente de ácido láctico (183,8 g/L), a partir da adição da água de maceração de milho como fonte de nutrientes do meio de fermentação feito de farinha de batata hidrolisada, juntamente com a adição do CaCO_3 , que contribuiu para o maior rendimento e produtividade do processo, pois, por meio da neutralização do AL formado durante o processo fermentativo, permitiu a condução da fermentação sob boas condições de pH para *Lactobacillus rhamnosus*.

Foram gerados modelos empíricos para produção de ácido láctico e consumo de açúcar redutor, sendo ambos validados. Observou-se também que, na fermentação em biorreator, os resultados foram semelhantes em comparação com os obtidos em escala reduzida e comprovou-se a produção do isômero L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

APÊNDICE A

Na Figura 9 apresenta-se a curva de crescimento do *Lactobacillus rhamnosus*.

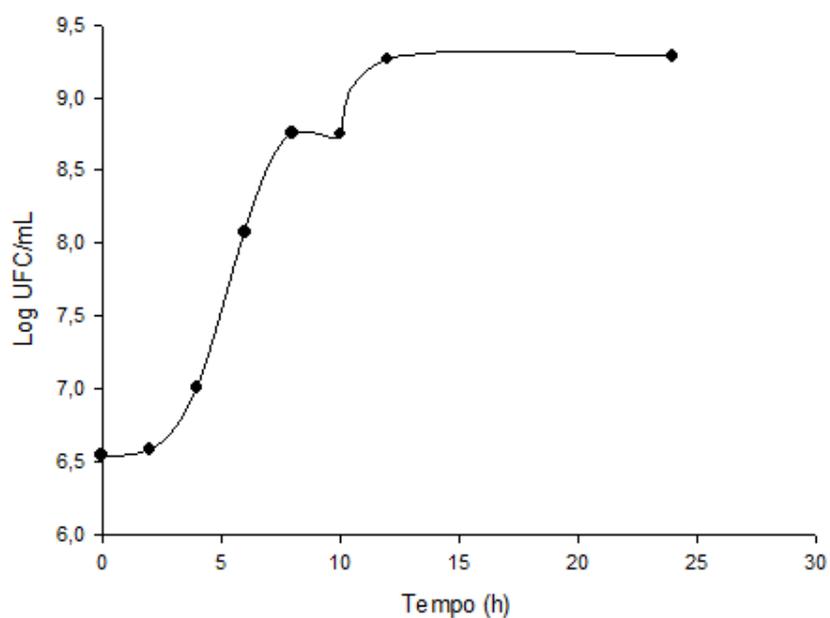


Figura 9 Curva de crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595

A partir dos dados obtidos pela curva de crescimento realizada por Alves (2014), foi construído o gráfico que mostra a correlação entre a absorbância e a contagem de células viáveis do *L. rhamnosus* ATCC 9595 (Figura 10).

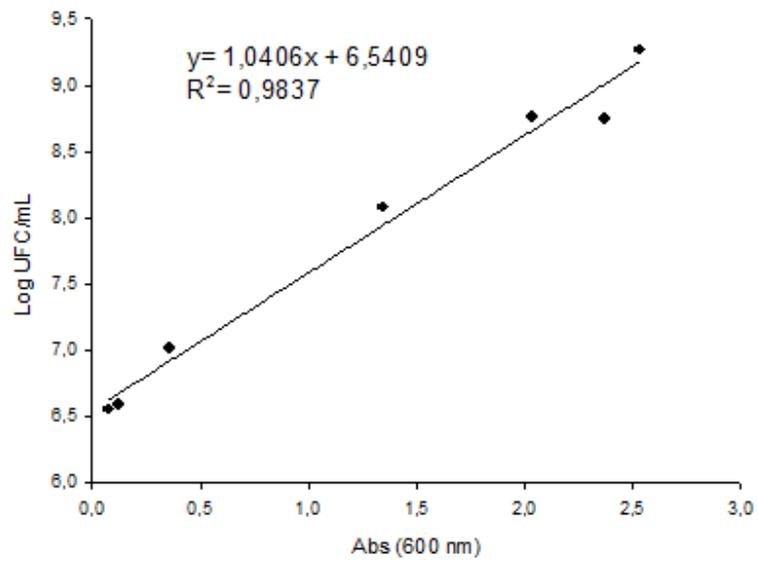


Figura 10 Correlação entre absorvância e a viabilidade celular na curva de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595

APÊNDICE B

Na Figura 11 mostra-se a curva padrão de glicose utilizada na análise de açúcar redutor (AR).

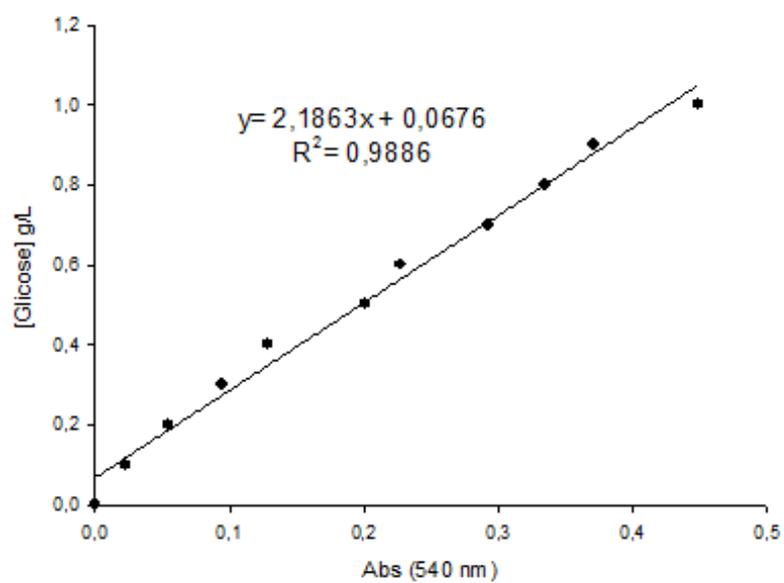


Figura 11 Curva padrão de glicose para determinação de açúcar redutor (AR)

APÊNDICE C

Na Figura 12 mostra-se a curva de calibração de ácido láctico para as análises de HPLC para o delineamento Plackett-Burman.

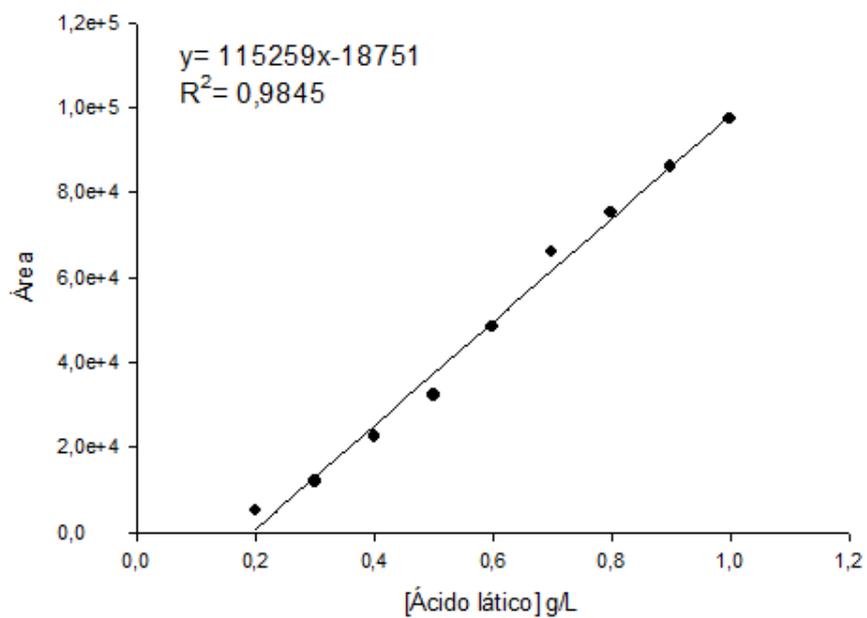


Figura 12 Curva analítica de ácido láctico para análises por HPLC

APÊNDICE D

Na Figura 13 mostra-se a curva de calibração de ácido láctico para as análises de HPLC para o DCCR.

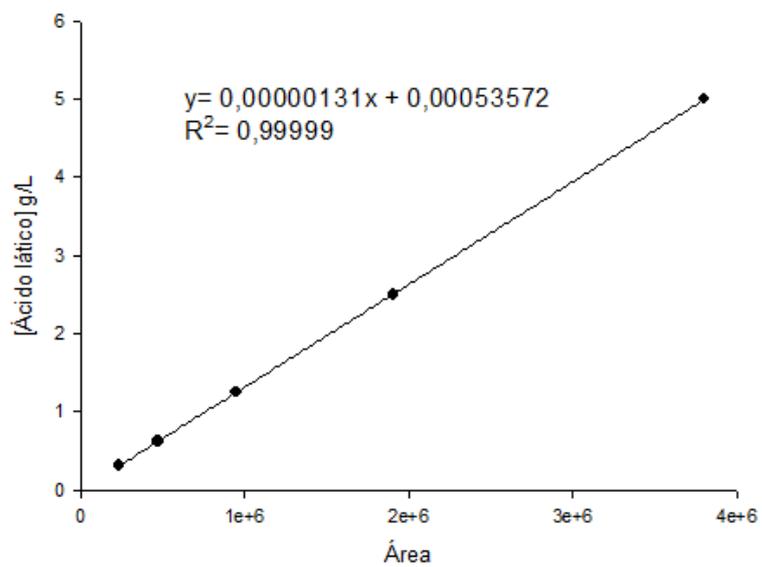


Figura 13 Curva analítica de ácido láctico para análises por HPLC

APÊNDICE E

Na Figura 14 mostra-se o cromatograma das análises de HPLC para a quantificação do ácido láctico obtido produzido.

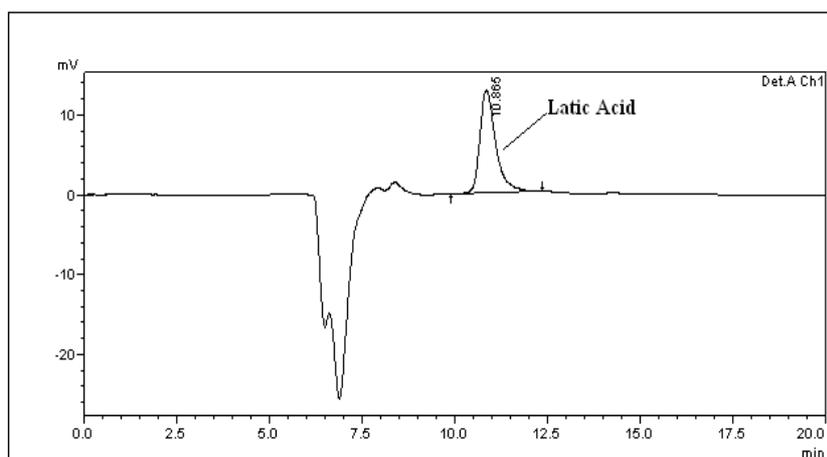


Figura 14 Cromatograma para quantificação do ácido láctico pelas análises de HPLC