



MARILIANA LUIZA FERREIRA ALVES

**PRODUÇÃO DE L(+) ÁCIDO LÁTICO POR
BACTÉRIAS LÁTICAS UTILIZANDO MEIOS
COM BATATA**

LAVRAS – MG

2014

MARILIANA LUIZA FERREIRA ALVES

**PRODUÇÃO DE L(+) ÁCIDO LÁTICO POR BACTÉRIAS LÁTICAS
UTILIZANDO MEIOS COM BATATA**

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 obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Coorientadora

Dra. Olga Lúcia Mondragón Bernal

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e Serviços
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Alves, Mariliana Luiza Ferreira.

Produção de L(+) ácido láctico por bactérias lácticas utilizando meios com batata / Mariliana Luiza Ferreira Alves. – Lavras : UFLA, 2014.

137 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

Bibliografia.

1. Extrato de levedura. 2. *Lactobacillus rhamnosus*. 3. Ácidos orgânicos. 4. DCCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 579.35

MARILIANA LUIZA FERREIRA ALVES

**PRODUÇÃO DE L(+) ÁCIDO LÁTICO POR BACTÉRIAS LÁTICAS
UTILIZANDO MEIOS COM BATATA**

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 obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de Fevereiro de 2014.

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dra. Eliana Setsuko Kamimura USP

Dra. Olga Lúcia Mondragón Bernal UFLA

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
Orientador

LAVRAS – MG

2014

*Aos meus pais, Mariliano Luis Alves e Jucinei Angélica
Ferreira eu dedico todo meu esforço, sempre serei
grata pelo apoio e amor incondicional;
Aos meus amigos que sempre se fizeram presente
mesmo estando tão longe*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves, pelo conhecimento e virtudes adquiridas durante esse longo processo. Obrigada, pela orientação e paciência que sempre teve comigo.

Ao programa de Coordenação de Apoio a Pesquisa (CAPES) do qual fui participante e que viabilizou, financeiramente, meu curso de mestrado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realizar o mestrado.

À empresa Romerlabs, Fundação Oswaldo Cruz e FAPEMIG que se prontificaram na doação de materiais e viabilizaram algumas das análises empregadas. Com toda certeza posso afirmar que sem vocês eu não teria condições de finalizar esta pesquisa.

Aos funcionários, professores e pesquisadores da UFLA, pela participação nesta conquista. Agradeço a Tina, Denise e Heloísa, pela orientação, paciência e apoio emocional que sempre me ofereceram... Vocês jamais vão imaginar a tamanha diferença que fazem para nós!

A todos os amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica: Carmem Nascimento, Daiane Paula, Bruna Santos e Michelle Masotti que sempre me ajudaram e fizeram com que os longos e exaustivos dias na UFLA fossem os mais agradáveis e divertidos. Meu sincero e profundo agradecimento, em especial, a Camilly Aparecida Reis que esteve comigo me ajudando durante todo o experimento e a Aline Galvão Tavares Menezes, minha “irmã de orientação” que tantas vezes me acompanhou, nos mais variados horários e também ajudou no meu experimento.... Sem todos vocês eu não teria conseguido.

Ao Prof. Dr. Hilton Morbeck de Oliveira da Universidade Federal de Mato Grosso, por ter me ajudado e incentivado a ir atrás dos meus sonhos e ideais.

Á todos os amigos que fiz em Minas e região... Em especial, a Giselly Mota da Silva, por me acompanhar e me ajudar a trilhar os longos caminhos que percorremos juntas ao chegar a Minas, agradeço seu apoio e as longas horas de discussões sobre o presente, passado e futuro...

Á Danieli Cristina Schabo e Driene Gomes Gonzaga, pela amizade, apoio, carinho e parceria, ao me acompanharem durante as madrugadas de experimento... O 'trio' sempre deixará saudades!

Á família que Deus me permitiu escolher: Tailís Assis de Melo, Nauara Caroline Figueroa e Jossimara Rezende Soares ("Believe"), simplesmente amo vocês e agradeço infinitamente por sempre acreditarem em mim, mesmo quando tudo parecia impossível; obrigada, por não desistirem de mim e não soltarem a minha mão, mesmo estando tão longe... Agradeço, também, a Danilo Ikeda Caetano, Patric Oliveira dos Santos, Sérgio Soares de Oliveira e a todos os meus amigos de Rondonópolis/MT que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, jamais poderia expressar o quão importante são para mim...

Por fim, agradeço ao meu pai, mãe e minha irmã Marília. Deixei vocês por último, porque sempre deixo o melhor para o final, e vocês são o melhor da minha vida. Obrigada, família, pelo seu apoio incondicional ao longo deste processo de dissertação e de muitos outros. Obrigada, por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Vocês são a minha fortaleza. Simplesmente, não encontro palavras que consigam agradecer. Muito obrigada... Sem vocês nada disso seria possível e se fosse possível não teria valido a pena.

E, finalmente, agradeço infinitamente a Deus. Obrigada, por nunca me abandonares, mesmo nos momentos em que duvidei de Ti e do Teu amor.

“Basta ser sincero e desejar profundo.”

Raul Seixas

RESUMO

O ácido láctico (AL) é o produto final da homofermentação de bactérias lácticas (BAL) e possui grande importância comercial. Algumas BAL são conhecidas por converter diretamente o amido em AL, essas são chamadas de BAL amilolíticas. O isômero L(+) ácido láctico, obtido somente por processo fermentativo, é a principal matéria-prima na produção de alguns polímeros biodegradáveis, como polilactato. A batata, rica em amido e vitaminas, é uma potencial matéria-prima a ser utilizada em processos fermentativos, uma vez que, no Brasil, tem perdas significativas de sua produção durante as etapas de colheita e comercialização. Assim conduziu-se esta pesquisa, com o objetivo de investigar a capacidade de produção de ácido láctico de 5 espécies de BAL (*Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus* e *Streptococcus mutans*), utilizando meios de batata (cultivar ágata), hidrolisados ou não, estudando o efeito do enriquecimento do meio de fermentação com extrato de levedura (EL), a fim de selecionar aquela com maior produtividade. Na segunda etapa, empregou-se planejamento DCCR com fatorial completo 2² e metodologia de superfície de resposta para avaliar a influência, no meio de fermentação, das concentrações de polpa de batata e EL na produtividade e rendimento de L(+) ácido láctico usando *L. rhamnosus*. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers a 37 °C/96 h, em estufa BOD sem agitação e foram utilizados teste enzimático e CLAE para determinar qualitativamente e quantitativamente o L(+) ácido láctico. Nas condições avaliadas, as espécies estudadas apresentaram maior potencial de produção em meio hidrolisado de batata com extrato de levedura. O aumento da concentração de EL no meio, propiciou maior produção de AL. A maior concentração obtida foi de 25 g/L de L(+) ácido láctico, em meio de fermentação com 35 % (m/m) de polpa de batata hidrolisada e 8% (m/v) de EL utilizando *L. rhamnosus*.

Palavras-chave: Extrato de levedura. *L. rhamnosus*. Ácidos orgânicos. DCCR.

ABSTRACT

Lactic acid (LA) is the final product of lactic acid bacteria (LAB) homofermentation and presents great commercial importance. A few LAB are known for directly converting starch into LA, these are called amylolytic LAB. The L(+) lactic acid isomer, obtained only by fermentation, is the main raw material in the production of a few biodegradable polymers such as polylactide. The potato, rich in starch and vitamins, is a potential feedstock to be used in fermentation processes, since, in Brazil, its production during the stages of harvesting and marketing presents significant loss. Thus, this research aimed at investigating lactic acid production capacity from 5 LAB species (*Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus* and *Streptococcus mutans*), using potato mediums (agata cultivar), hydrolyzed or not, studying the effect of enriching the fermentation medium with yeast extract (YE) in order to select the one with highest productivity. In the second stage we used the RCCD 2² full factorial design and surface response methodology to assess the influence, in the fermentation medium, of potato pulp and YE concentrations over L(+) lactic acid productivity and yield using *L. rhamnosus*. The fermentations were conducted in erlenmeyer flasks at 37 °C /96 h in BOD oven without agitation, and enzyme and HPLC tests were used to qualitatively and quantitatively determine the L(+) lactic acid. Under the evaluation conditions, the studied species showed greater production potential in potato hydrolyzed medium with yeast extract. The increased concentration of YE in the medium caused higher LA production. The highest concentration of L(+) lactic acid achieved was of 25g/L in the fermentation medium with 35 % (m/m) hydrolyzed potato pulp and 8 % (w/v) YE using *L. rhamnosus*.

Keywords: Yeast extract. *L. rhamnosus*. Organic acids. RCCD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1	Projeção de Fischer.....	20
Figura 2	Síntese química do ácido láctico através de hidrólise da lactonitrila.....	22
Figura 3	Principais vias de fermentação da glicose em bactérias lácticas: (A) fermentação homoláctica; (B) fermentação heteroláctica.....	32
Quadro 1	Estudos de produção de ácido láctico utilizando diferentes espécies de bactérias lácticas amilolíticas ou não.....	35

CAPÍTULO 2

Figura 1	Organograma de execução das etapas da metodologia.....	53
Figura 2	Esquema de ativação e preparação da cultura estoque de microrganismo em meio congelante.....	54
Figura 3	Aumento da turbidez de <i>L. rhamnosus</i> em caldo MRS, após 24 horas em estufa BOD a 37 °C.....	55
Figura 4	Seqüência de preparação da polpa de batata: (A) lavagem e secagem; (B) descascamento e picagem; (C) pesagem da polpa de batata triturada (D) armazenamento em sacos herméticos.....	58
Figura 5	Mosto de fermentação após esterilização e adição do inoculo.....	60
Figura 6	Amostras já centrifugadas oriundas do processo fermentativo.....	60
Figura 7	Variação do pH durante a fermentação de meio não hidrolisado de batata sem extrato de levedura.....	67
Figura 8	Variação do pH durante a fermentação de meio não hidrolisado de batata com extrato de levedura utilizando.....	68
Figura 9	Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final no processo fermentativo (B) com meios não hidrolisados de batata sem extrato de levedura.....	69
Figura 10	Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final no processo fermentativo (B) com meios não hidrolisados de batata com extrato de levedura.....	70
Figura 11	Variação do pH durante a fermentação de meio hidrolisado de batata sem extrato de levedura.....	71
Figura 12	Variação do pH durante a fermentação de meio hidrolisado	

	de batata com extrato de levedura.....	72
Figura 13	Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final no processo fermentativo (B) em meios hidrolisados de batata sem extrato de levedura.....	73
Figura 14	Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final no processo fermentativo (B) em meios hidrolisados de batata com extrato de levedura.....	74
Figura 15	Produção de ácido láctico por bactérias lácticas em meio de fermentação de polpa de batata hidrolisada ou não, adicionada ou não de extrato de levedura.....	76

CAPÍTULO 3

Figura 1	Variação da concentração total de células durante a fermentação.....	98
Figura 2	Cinética do pH durante a fermentação láctica por <i>L. rhamnosus</i> , conforme o planejamento experimental.....	99
Figura 3	Superfície de resposta para a produção de ácidos totais como uma função das variáveis: concentração de polpa de batata e de extrato de levedura.....	102
Figura 4	Cinética do consumo de açúcares redutores durante a fermentação com <i>L. rhamnosus</i> , conforme planejamento experimental.....	103
Figura 5	Superfície de resposta para produção de ácido láctico como uma função das variáveis: concentração de polpa de batata e de extrato de levedura.....	106
Figura 6	Produção de ácido láctico de acordo com os ensaios do planejamento experimental.....	107

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Características diferenciais das bactérias do ácido lático.....	30
Tabela 2	Composição química da batata por 100g de polpa sem casca.....	39

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Resultados da análise de composição da batata sem casca...	66
Tabela 2	Produtividade de ácido lático ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em meio fermentativo de polpa de batata hidrolisada ou não e adicionada ou não de extrato de levedura.....	76
Tabela 3	Contagem de células (UFC.mL^{-1}) na fermentação de batata hidrolisada ou não e adicionada ou não de extrato de levedura (EL).....	80

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Níveis e fatores do planejamento DCCR para produção de L(+) ácido lático.....	92
Tabela 2	Caracterização química da polpa de batata.....	97
Tabela 3	Produção de ácidos totais variando as concentrações de polpa de batata e extrato de levedura, conforme determinado pelo planejamento.....	100
Tabela 4	Coefficientes de regressão para produção de ácidos totais.....	101
Tabela 5	Análise de variância para produção de ácidos totais.....	101
Tabela 6	Coefficientes de regressão para o consumo de açúcares redutores.....	103
Tabela 7	Matriz de planejamento com os ensaios e as variáveis respostas para rendimento e produção de ácido lático.....	104
Tabela 8	Coefficientes de regressão para produção de ácido lático.....	105
Tabela 9	Análise de variância para produção de ácido lático.....	105
Tabela 10	Coefficientes de regressão para rendimento de ácido lático....	107
Tabela 11	Análise de variância para rendimento de ácido lático.....	108
Tabela 12	Comparação de estudos que relataram a produção de L(+) ácido lático a partir de diferentes substratos amiláceos e condições de fermentação.....	109
Tabela 13	Análise da produção de L(+) ácido lático por <i>L. rhamnosus</i> em ensaios conforme planejamento experimental.....	111

Tabela 14 Validação do modelo de produção de L(+) ácido láctico (g/L).....	112
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

E. *Enterococcus*

h hora (s)

L. *Lactobacillus*

min minuto (s)

S. *Streptococcus*

LISTA DE SIGLAS

ANAVA	Análise de Variância
AR	Açúcar (es) Redutor (es)
AL	Ácido Lático
BAL	Bactéria do Ácido Lático ou Bactéria Láctica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EL	Extrato de Levedura
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
PLA	Ácido Polilático

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	17
1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	Ácido láctico.....	20
2.1.1	Obtenção.....	21
2.1.2	Produção e mercado.....	25
2.1.3	Polímeros Biodegradáveis.....	26
2.2	Bactérias lácticas.....	28
2.2.1	Caracterização.....	28
2.2.2	Importância econômica.....	33
2.2.3	Bactérias lácticas amilolíticas e não-amilolíticas.....	34
2.3	Fontes de nitrogênio.....	36
2.4	Batata.....	36
2.4.1	Importância alimentar e econômica da batata.....	37
2.4.2	Composição química da batata.....	39
2.4.3	Cultivar Ágata.....	39
	REFERÊNCIAS.....	41
	CAPÍTULO 2 Capacidade amilolítica e seleção da espécie com maior produtividade de ácido láctico.....	49
1.	INTRODUÇÃO.....	51
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
2.1	Pré-seleção e manutenção dos microrganismos.....	53
2.1.1	Ativação e propagação da cultura-estoque de bactérias lácticas em meio congelante.....	54
2.1.2	Preparo do inóculo da fermentação.....	56
2.2	Preparo dos meios para fermentação.....	57
2.2.1	Obtenção da matéria-prima e preparo da polpa de batata.....	57
2.2.2	Preparo do meio de fermentação não hidrolisado.....	58
2.2.3	Preparo do meio de fermentação hidrolisado.....	59
2.3	Capacidade amilolítica e seleção da melhor linhagem produtora de ácido láctico.....	61
2.4	Metodologia analítica.....	61
2.4.1	Caracterização da matéria-prima.....	61
2.4.1.1	Teor de Umidade.....	61
2.4.1.2	Determinação da composição centesimal e teor de amido.....	62
2.4.2	Determinação do pH e acidez titulável.....	63
2.4.3	Determinação do ácido láctico.....	64
2.4.4	Determinação da produtividade do ácido láctico.....	64
2.4.5	Contagem de bactérias lácticas por plaqueamento.....	65

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1	Caracterização da polpa de batata.....	66
3.2	Estudo cinético do pH e acidez durante as fermentações.....	66
3.2.1	Meios de fermentação não hidrolisados.....	67
3.2.2	Meios de fermentação hidrolisados.....	71
3.3	Produção de ácido láctico.....	75
3.4	Capacidade amilolítica das bactérias lácticas.....	77
3.5	Seleção da espécie com maior produção de ácido láctico.....	79
3.6	Viabilidade Celular.....	79
4.	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	CAPÍTULO 3 Influência da composição do meio de fermentação na produção de L(+) ácido láctico por <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	87
1.	INTRODUÇÃO.....	89
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
2.1	Obtenção e manutenção do microrganismo.....	91
2.1.1	Preparo do inóculo da fermentação.....	91
2.2	Preparo dos meios de fermentação.....	92
2.3	Delineamento composto central rotacional.....	92
2.4	Metodologia analítica.....	93
2.4.1	Caracterização da matéria-prima.....	93
2.4.2	Determinação do pH e Acidez.....	94
2.4.3	Determinação dos Açúcares Redutores no mosto.....	94
2.4.4	Análises quantitativas e qualitativas de ácido láctico.....	95
2.4.5	Determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação.....	96
2.4.6	Contagem de bactérias lácticas por plaqueamento.....	96
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
3.1	Caracterização da polpa de batata.....	97
3.2	Delineamento composto central rotacional.....	97
3.2.1	Contagem de células e viabilidade celular.....	98
3.2.2	pH e acidez.....	99
3.2.3	Consumo de açúcares redutores.....	102
3.2.4	Produção e rendimento de ácido láctico.....	103
3.2.5	Identificação do isômero produzido.....	110
3.2.6	Validação do modelo.....	112
4	CONCLUSÃO.....	113
	REFERÊNCIAS.....	114
	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	117
	APÊNDICES.....	119

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O ácido láctico (AL) ou ácido 2-hidroxiopropanóico é um ácido orgânico produzido naturalmente pelo metabolismo animal e que pode também ser obtido por fermentação ou síntese química. Apresenta-se na forma de dois isômeros ópticos, o D e o L- ácido láctico, além de poder estar em uma mistura racêmica (DL - ácido láctico). A síntese química tem como vantagem a produção de um ácido termicamente estável, com menores custos de purificação e sem quantidades residuais de carboidratos, fato este comum ao ácido produzido por fermentação. Esse processo, porém, pode envolver recursos não renováveis da indústria petroquímica e métodos mais caros, além de possuir elevados custos de matéria-prima e fornecer somente a mistura racêmica do AL. Já com a obtenção por fermentação microbiana, de acordo com o microrganismo selecionado é possível produzir um dos estereoisômeros, ou seja, um ácido opticamente puro. A fermentação microbiana apresenta ainda a vantagem de poder empregar nesse processo matéria-prima de baixo custo, subprodutos ou resíduos industriais, fator este que vem corroborar com a crescente preocupação da sociedade com a preservação ambiental.

O ácido láctico possui versátil e vasta gama de aplicações e conta com o surgimento de novos campos de emprego, entre eles destaca-se sua utilização na indústria de bioplásticos, onde este é a principal matéria-prima para a produção de biopolímeros e polilactatos biocompatíveis, como o ácido polilático (PLA), um substituto biodegradável do termoplástico convencional. A isomeria e pureza do ácido láctico são determinantes para as propriedades do polímero a ser produzido, podendo afetar diretamente no tempo de degradação. O Brasil possui vantagens competitivas em relação à produção dos biopolímeros, devido à

capacidade de cultivo de matérias-primas utilizadas na produção desses plásticos. Atualmente, o mercado nacional de biopolímeros é composto em sua maioria de PLA e poli-3-hidroxibutirato (PHB) e, apesar da importância do uso de plásticos biodegradáveis, estes são pouco difundidos no mercado, pelo alto custo da sua principal matéria-prima e, conseqüentemente, seu preço comercial.

Inúmeras pesquisas têm investigado nos últimos anos fatores que reduzam os custos de produção do ácido láctico, correlacionando variáveis como microrganismos, substratos fermentativos e aspectos ambientais, com o aumento das concentrações, dos rendimentos e produtividades desse ácido.

As bactérias do ácido láctico (BAL), frequentemente denominadas bactérias lácticas, constituem um grupo de bactérias Gram-positivas que obtêm energia por meio da fermentação de açúcares e possuem duas vias principais de fermentação, sendo o ácido láctico o produto da via homofermentativa. Nos últimos anos, diversos pesquisadores vêm relatando a existência de algumas espécies de BAL, capazes de converter amido diretamente em ácido láctico, dividindo as bactérias lácticas em dois grupos: amilolíticas e não-amilolíticas. As amilolíticas produzem enzimas que hidrolisam amido em açúcar fermentescível e as não-amilolíticas necessitam de um tratamento prévio de hidrólise.

Visando à obtenção de um maior rendimento na produção do ácido láctico, vários estudos têm sugerido a suplementação do meio de cultivo com fontes de nitrogênio que possam atender às necessidades nutricionais dessas bactérias e, conseqüentemente, aumentar a produção do AL. Dentre as fontes de nitrogênio atualmente utilizadas, está o extrato de levedura.

A batata é conhecida nutricionalmente por apresentar alto teor de amido, proteína, vitaminas e sais minerais. Considerada a quarta fonte alimentar da humanidade, seu comércio constitui-se em um agronegócio de grande importância em todos os continentes. No Brasil, o Estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de batatas do país, e a região sul mineira a

segunda maior produtora do Estado. Apesar da importância econômica, a bataticultura nacional agrega várias deficiências, entre elas estão os problemas agroeconômicos e agrotecnológicos que afetam a cadeia produtiva da batata devido as exigências quanto à aparência externa do tubérculo, fazendo com que grande parte da produção nacional seja descartada com frequência. Nos últimos anos, mundialmente têm-se despendido 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 os possíveis impactos ambientais.

Baseado no contexto apresentado neste trabalho, objetivou-se avaliar a capacidade amilolítica de 5 espécies de BAL, bem como a seleção da espécie com melhor produtividade e características para produção de L(+) ácido láctico. Visou-se, ainda, ao estudo da influência da adição de extrato de levedura na produção de AL e otimizar o meio de fermentação, variando as concentrações de substrato e fonte de nitrogênio, empregando metodologia de superfície de resposta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido Láctico

O ácido láctico (AL) ou ácido 2-hidroxi-propanóico foi isolado pela primeira vez em 1780, pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele, em amostras de leite coalhado, fato que deu origem ao nome da molécula (DATTA; HENRY, 2006; LIMA et al., 2001). Em razão das impurezas da amostra original, houve consideráveis críticas quanto à existência do AL e foi apenas em 1810 que confirmaram sua presença em tecidos orgânicos. Em 1833, amostras puras desse ácido foram preparadas e sua fórmula química foi então determinada, e somente em 1869 que houve a constatação da existência de vários isômeros ópticos do AL (ROBERGS; GHIASVAND; PARKER, 2004).

A determinação de isomeria do AL é feita de acordo com sua capacidade de rotação óptica na luz (Figura 1), se a rotação é para a direita, este é denominado Dextrorrotatório (D); se para a esquerda, é Levorrotatório (L). Se houver uma mistura de ambos, L(+) e D(-) ácido láctico, este é denominado mistura racêmica (DL - ácido láctico), uma mistura equimolar das duas formas enantioméricas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; LIMA et al., 2001).

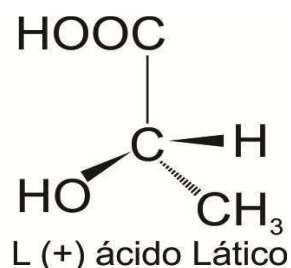
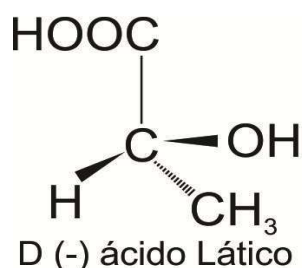


Figura 1 Projeção de Fischer

Embora seja classificado como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) para utilização como aditivo alimentar pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, o ácido láctico na forma D(-) ácido láctico, pode apresentar efeitos prejudiciais ao ser humano (DATTA; TSAI; BONSIGNORE, 1995), uma vez que este não é facilmente metabolizado e seu consumo excessivo pode causar distúrbios médicos (LIU, 2003), como acidose e descalcificação (DATTA; TSAI; BONSIGNORE, 1995).

2.1.1 Obtenção

O AL é um ácido orgânico produzido naturalmente pelo metabolismo animal, podendo ainda ser obtido por fermentação ou por síntese química. No metabolismo animal, ele é produzido pelo músculo quando há uma diminuição na oferta de oxigênio ou quando este é sujeito a esforço físico. Durante esse processo, o glicogênio armazenado nos músculos é disponibilizado em forma de glicose, dando início ao processo denominado glicólise, onde cada molécula de glicose é convertida em duas de ácido pirúvico e, em condições normais, o ácido pirúvico passa para as mitocôndrias das células musculares e reage com o oxigênio (oxidando totalmente a CO_2 e H_2O), para formar várias moléculas de ATP (adenosina trifosfato). Quando o oxigênio é escasso, para que ocorra a etapa oxidativa do metabolismo da glicose, a maior parte do ácido pirúvico é convertida em AL e este é formado mais rapidamente do que pode ser eliminado e sua acumulação transiente causa sensação de cansaço e dor muscular (NELSON; COX, 2002; ROBERGS; GHIASVAND; PARKER, 2004). Enquanto os animais e plantas superiores produzem e metabolizam apenas o L(+) ácido láctico, as BAL, fungos (leveduras e ficomicetos) e algas são capazes de produzir ambos os isômeros e a mistura racêmica (LIMA et al., 2001).

A via sintética ou síntese química tem como base a hidrólise da lactonitrila. Nesse processo, o ácido cianídrico é adicionado ao acetaldeído na presença de uma base para produzir a lactonitrila, sendo que essa reação ocorre na fase líquida sob alta pressão atmosférica. A lactonitrila é recuperada e purificada por destilação, sendo hidrolisada a ácido láctico, mediante adição de ácido clorídrico ou ácido sulfúrico; com isso, ocorre a produção de sais de amônio e AL (Figura 2). A produção ocorre após a reação de esterificação do ácido láctico que se une ao metanol e é possível a formação de um novo composto, o metil lactato. Por sua vez, o metil lactato pode sofrer hidrólise e os compostos iniciais podem ser recuperados, sendo esta a reação inversa do processo (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

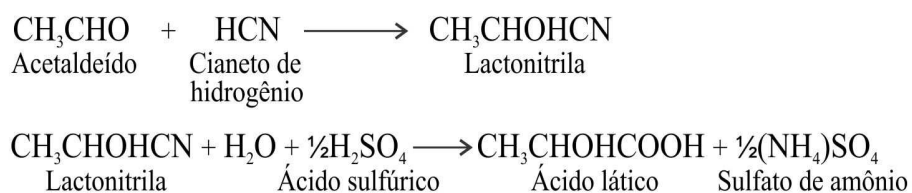


Figura 2 Síntese química do ácido láctico através de hidrólise da lactonitrila
 Fonte: Adaptado de Narayanan; Roychoudhury; Srivastava (2004).

A síntese química fornece somente a mistura racêmica do AL, o DL-ácido láctico, enquanto que na fermentação, de acordo com o microrganismo selecionado, é possível a obtenção de um dos estereoisômeros, podendo haver a uma pequena quantidade do outro isômero (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000) conforme a fase de crescimento da bactéria, quem determina tal variação é a presença da coenzima NAD⁺, dependente específica conhecida como lactato desidrogenase (nLDH) e sua respectiva atividade, onde, conforme sua presença, há a produção de um dos isômeros ou da mistura racêmica (AXELSSON, 2004).

Existem também outras possíveis vias químicas para a síntese do ácido láctico, que incluem base catalisada, degradação dos açúcares, oxidação de propilenoglicol, reação de acetaldeído, monóxido de carbono, água em temperaturas elevadas, pressões, hidrólise do cloro-propiónico, entre outros. Porém, nenhuma dessas rotas se mostra economicamente viável (DATTA; TSAI; BONSIGNORE, 1995).

A vantagem da produção do ácido láctico por síntese química está no fato deste ser termicamente estável, possuir menores custos de purificação e não conter quantidades residuais de carboidratos, fato este comum ao ácido produzido por fermentação e que pode vir a comprometer a qualidade do produto, sobretudo quando é estocado por grandes períodos (TRINDADE, 2002). No entanto, como já dito anteriormente, a via sintética sempre leva à formação de uma mistura racêmica e, em geral, os métodos sintéticos de produção se mostram mais caros que os fermentativos, além de possuírem elevados custos de matéria-prima.

A obtenção do AL pela fermentação microbiana apresenta vantagens significativas sobre a síntese química, o que inclui não somente a produção de isômeros opticamente puros, L(+) ou D(-) ácido láctico, mas também o fato de poder empregar nesse processo matérias-primas de baixo custo, subprodutos ou resíduos da agroindústria (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). De acordo com Lima et al. (2001), em decorrência de grandes quantidades de AL produzidas pela indústria petroquímica, o uso da fermentação na produção desse composto tendia a entrar em desuso. Porém, a necessidade crescente de aproveitamento de resíduos agroindustriais e, conseqüentemente, o aumento na oferta de fontes renováveis para a produção do AL vem fazendo com que esse processo de fermentação assuma um papel importante na indústria (NAVEENA; ALTAF; BHADRAYYA, 2004; REDDY et al., 2008). Em 2008, 90 % da

produção mundial de AL foi obtida por fermentação bacteriana, sendo o restante por via sintética (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008).

Nos últimos anos, diversas pesquisas foram realizadas visando à investigação de fatores que possam reduzir os custos de produção desse ácido orgânico, correlacionando elementos como, substratos fermentativos (batata, mandioca, melão, soro de leite, resíduos da fabricação do queijo e das indústrias de papel - celulose e a hemicelulose), microrganismos e problemas de aspectos ambientais, com métodos que aumentem as concentrações, os rendimentos e produtividades do ácido láctico (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2000).

É importante ressaltar que conforme a matéria-prima e os microrganismos empregados no processo, alguns tratamentos prévios são indispensáveis. A celulose e hemicelulose necessitam de pré-tratamento físico, seguido de hidrólise química ou enzimática, enquanto que em outras matérias-primas (batata, amido de milho, a mandioca e a cevada) apenas um tratamento moderado para solubilização e hidrólise pode ser empregado. O uso de recursos renováveis ricos em nutrientes, como os vários agro-resíduos, fornece muitas possibilidades e uma forma dupla de trabalho para agregação de valor, por meio de uma tecnologia ecológica (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007; LOPES, 2008).

Apesar de aproximadamente 70 % do custo de produção do ácido láctico corresponder à matéria-prima (YADAV; CHAUDHARI; KOTHARI, 2011), outros fatores, além dos econômicos (baixo custo), devem ser levados em conta durante a seleção do material a ser empregado no processo, como os baixos níveis de contaminantes, materiais tóxicos gerados pelo processo, taxa de subprodutos, disponibilidade da matéria-prima durante o ano e os custos agregados à purificação do produto quando necessário (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007; WEE; KIM; RYU, 2006).

2.1.2 Produção e mercado

O mercado mundial de AL tem se mostrado, em grande parte, imune às recentes turbulências da economia global com taxa de crescimento constante na última década. Análogos ao crescimento do setor estão os principais desenvolvimentos tecnológicos que têm ajudado a aperfeiçoar diversos processos de produção (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC, 2012). Em 2012, a produção mundial se aproximou de 259 mil toneladas e a previsão para 2017 são de 368 mil toneladas (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; MARTINEZ et al., 2013). Com versátil e vasta gama de aplicações, o AL é o primeiro ácido orgânico multifuncional biotecnologicamente produzido (REDDY et al., 2008).

Semelhante ao crescimento da produção do AL está o surgimento de novos campos de aplicações, entre eles o emprego em produtos farmacêuticos, nas indústrias de couro e têxteis e como matéria-prima química (JOHN et al., 2009; REDDY et al., 2008; VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008). Na indústria de cosméticos vem ganhando destaque, em razão da capacidade de retenção de água, tornando adequada sua utilização em formulações hidratantes (GAO; MA; XU, 2011). Contudo, a indústria alimentar é quem lidera o mercado consumidor desde 1982, sendo o AL amplamente utilizado como conservante, acidulante, aromatizante e tamponante (REDDY et al., 2008).

Mesmo com as indústrias de alimentos liderando o consumo de AL, recentemente este tem recebido grande atenção como matéria-prima para a produção de plásticos biodegradáveis, fazendo com que a produção de biopolímeros e polilactatos biocompatíveis, como o ácido polilático (PLA), seja atualmente uma das aplicações mais promissoras do setor (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC., 2012).

Em razão da crescente quantidade de resíduos plásticos em todo o mundo, consideráveis esforços da pesquisa e desenvolvimento têm se dedicado a buscar um substituto biodegradável para os termoplásticos convencionais (REDDY et al., 2008). Esse tipo de polímero também vem sendo extensamente utilizado nas práticas médicas, tais como suturas cirúrgicas, próteses e sistemas de liberação controlada de medicamentos (PING et al., 2005; WEE; KIM; RYU, 2006).

2.1.3 Polímeros biodegradáveis

Segundo definição da IUPAC, polímeros biodegradáveis são polímeros suscetíveis à degradação pela atividade biológica de microrganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, cuja degradação acompanha uma redução da sua massa molar. Esses polímeros podem ser oriundos de fontes naturais renováveis como batata, milho, celulose e cana-de-açúcar, sendo estes chamados de biopolímeros, ou ainda serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas de ácidos ou até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitina, quitosana ou proteínas. Outros polímeros biodegradáveis podem ser obtidos de fontes fósseis, petróleo, ou da mistura entre biomassa e petróleo (BRITO et al., 2011; HORIE et al., 2004).

O AL é a principal matéria-prima na produção do PLA (DATTA; HENRY, 2006; REDDY et al., 2008), um biopolímero sustentável e biodegradável (BRITO et al., 2011; RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010). Segundo Lunt (1998), é essencial se ter claro que a pureza óptica do AL é determinante para as propriedades físicas do polímero, podendo alterar as propriedades de temperatura de fusão e grau cristalinidade (RUDNIK, 2007) e afetar diretamente o tempo de degradação do polímero (RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010).

Atualmente, o setor de embalagens consome cerca de 70 % do PLA produzido, sendo o restante da produção distribuída no setor de fibras, têxtil, agricultura, eletrônicos, aparelhos e aparatos domésticos. O PLA também é uma promessa para aplicações em medicina, cirurgia e produtos farmacêuticos (BRITO et al., 2011; GUPTA; REVAGADE; HILBORN, 2007; SHIH; HUANG; CHEN, 2010).

O mercado de biopolímeros corresponde a menos de 5 % da demanda dos plásticos totais e apresenta crescimento anual superior a 20 %, os custos de produção também tendem a diminuir, sendo esperado nos próximos cinco anos uma redução de 25 % para 20 %, enquanto que os preços dos plásticos petroquímicos devem crescer nesse mesmo período. Essa compensação de preço pode beneficiar a difusão do PLA no mercado, visto que atualmente a diferença de custo desses sobre os plásticos convencionais chega a atingir uma marca de 30 a 70 %, impondo um importante desafio a essa economia (JAMSHIDIAN et al., 2010).

No Brasil, apesar da pequena conscientização sobre o uso destes bioplásticos, o mercado vem gerando de US\$ 4 milhões a US\$ 5 milhões em receitas nos últimos anos, mercado este composto em sua maioria de ácido polilático (PLA) e poli-3-hidroxitirato (PHB). O país ainda possui vantagens competitivas em relação à produção dos biopolímeros, pela sua capacidade de cultivo das matérias-primas (cana de açúcar, batata e mandioca) utilizadas na produção desses bioplásticos (LANCELLOTTI, 2010).

Entre as vantagens do PLA sobre os polímeros à base de hidrocarbonetos está a diminuição da emissão de CO₂, já que este emite menor quantidade de gás carbônico, durante sua produção e compostagem, e ainda colabora com a absorção desse gás, durante a plantação das matérias-primas a serem utilizadas na produção do PLA (JAMSHIDIAN et al., 2010).

2.2 Bactérias lácticas

As bactérias do ácido láctico (BAL), frequentemente denominadas bactérias lácticas, constituem um grupo de bactérias Gram-positivas unidas por diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas.

2.2.1 Caracterização

Em geral, as bactérias lácticas não apresentam motilidade ou formação de esporos, são anaeróbias ou aerotolerantes, não patogênicas, apresentam forma de cocos ou bacilos, produzem ácido láctico como produto principal da fermentação de carboidratos, não sintetizam ATP por meio da respiração, catalase negativa, não produzem indol e ácido sulfídrico; suas colônias são pequenas e a produção de pigmentos é rara, mas se presente, pode ser amarela ou laranja-escuro, ou ainda, vermelho-escuro (AXELSSON, 2004; REDDY et al., 2008).

Os limites do grupo das BAL foram sujeitos a certa controvérsia, mas historicamente os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, e *Streptococcus* formam o núcleo do grupo. Revisões taxonômicas desses gêneros e a descrição de novos gêneros afirmam que as BAL poderiam em sua ampla definição fisiológica, compreender cerca de 20 gêneros. No entanto, a partir de um prático ponto de vista da tecnologia de alimentos, os seguintes gêneros são considerados principais: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (AXELSSON, 2004).

A classificação das BAL em diferentes gêneros é, em grande parte, baseada na morfologia, modo de fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do AL produzido, capacidade de crescer

em elevadas concentrações salinas e tolerância ácida ou alcalina, como mostra a Tabela 1 (AXELSSON, 2004).

Tabela 1 Características diferenciais das bactérias do ácido láctico

Características	Bacilos				Cocos					
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i> ^a
Formação téttrade	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ a partir da glicose ^b	- ^c	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Cresc. em 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Cresc. em 45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Cresc. 6,5 % NaCl	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Cresc. em 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cresc. em pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Cresc. em pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Configuração do AL	L	D, L, DL ^e	L	L	L	D	L, DL ^e	L	L	D, DL ^e

+, positivo; -, negativo; ±, resposta varia de acordo com a espécie; ND, não determinado; AL, Ácido Láctico; Cresc. = crescimento.

^a Cepas de *Weissella* podem também apresentar forma de bacilos.

^b Teste para homo- ou heterofermentativo a partir de glicose; negativos e positivos denota homo- e heterofermentativo, respectivamente.

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

^d Nenhum crescimento em NaCl 8 % tem sido relatada.

^e Produção de ácido D, L, ou DL-láctico varia entre espécies.

Fonte: Adaptado de Axelsson (2004).

Esses organismos heterotróficos costumam apresentar complexas exigências nutricionais para o seu desenvolvimento, tais como: aminoácidos, peptídeos, ácidos nucléicos e derivados, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos, em razão da sua habilidade limitada para sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; REDDY et al., 2008).

As BAL obtêm energia, por meio da fermentação de açúcares e tem como produtos finais do seu metabolismo o lactato, acetato, fumarato, succinato, dióxido de carbono e etanol (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A temperatura ótima de crescimento varia entre 20 e 45 °C (MARTINEZ et al., 2013), são acidófilas, toleram baixos níveis de pH (entre 3 e 4), com faixa ótima entre 5 e 7 (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008), dependendo da espécie. Em pH neutro ou em reações alcalinas há uma diminuição na produção de ácido. Essas bactérias estão geralmente associadas a habitats ricos em nutrientes, como alguns alimentos (vegetais, leite, carnes e bebidas) e também na microbiota natural, por exemplo, a do homem (AXELSSON, 2004).

Duas vias principais de fermentação de açúcares são observadas nas bactérias láticas, a homofermentativa (ou fermentação homolática) e heterofermentativa (ou fermentação heterolática), dividindo-as em dois grupos de acordo com o produto final da via, Figura 3.

Na homofermentação, o AL é o principal produto final do metabolismo da glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas ou via glicolítica (Figura 3A), na qual o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico pela ação da enzima lactato desidrogenase, produzindo aproximadamente 85 % de AL. Nesse tipo de fermentação, as BAL fermentam um mol de glicose em dois moles de ácido láctico, gerando um rendimento líquido de dois moles de ATP por molécula de glicose metabolizada.

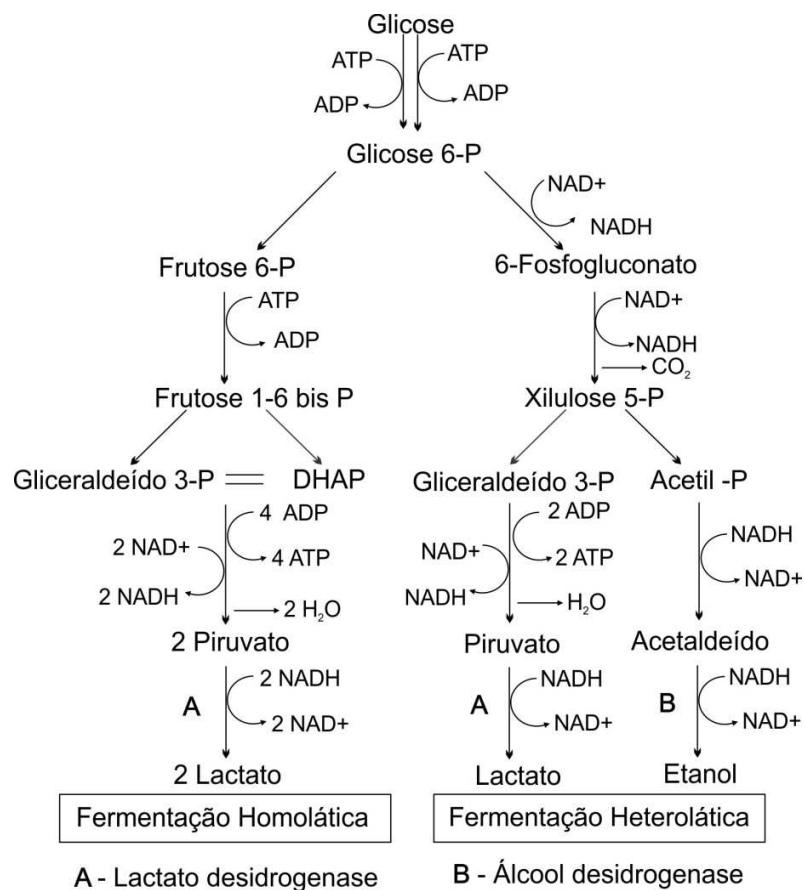


Figura 3 Principais vias de fermentação da glicose em bactérias lácticas: (A) fermentação homolática; (B) fermentação heterolática

Fonte: Adaptado de Reddy et al. (2008)

Já na via 6-fosfogluconato (Figura 3B), quantidades equimolares de AL, dióxido de carbono e etanol ou acetato são formados a partir da glicose pela via oxidativa das pentoses (fosfoquinase), sendo o piruvato e o acetaldeído, substâncias intermediárias dessa via, formando o etanol ao final do processo. Nessa via, o metabolismo é referido como a fermentação heterolática ou heterofermentativa. Nesse processo, um mol de glicose gera um mol de ácido láctico, um mol de etanol, e um mol de CO₂. E apenas um mol de ATP é gerado

por mol de glicose, resultando em um menor crescimento por mol de glicose metabolizada. A proporção de etanol e acetato formado depende do potencial redox do sistema. Condições de crescimento diferentes podem alterar significativamente a formação do produto final por algumas BAL. Essas alterações podem ser atribuídas a um metabolismo do piruvato alterado e/ou a utilização de receptores de elétrons externos, tais como o oxigênio em ambas as respirações (aeróbia e anaeróbia) ou compostos orgânicos (AXELSSON, 2004; HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; REDDY et al., 2008).

2.2.2 Importância econômica

As BAL são microrganismos amplamente conhecidos e de extrema importância comercial por participarem do processamento de carnes, vegetais e produtos lácteos, como iogurtes e leites fermentados. Na indústria de alimentos, atuam também na produção de compostos aromáticos, realçadores de sabor (CARR; CHILL; MAIDA, 2002) e conservante de alimentos (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010), podendo ser utilizadas, ainda, na produção de dextrano, nisina e AL para diferentes aplicações (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000) e como vetores de vacina oral (DETMER; GLENTING, 2006).

Não obstante sua importância na indústria, às bactérias do ácido láctico constituem-se de agentes prejudiciais às fermentações alcoólicas, já que estas participam de forma ativa na deterioração de matérias-primas desses setores, como na cana-de-açúcar colhida. As BAL reduzem o tempo de armazenamento e introduz indesejáveis produtos do seu metabolismo no processo. Esses microrganismos provocam a floculação e perda do fermento, consomem a sacarose e outros nutrientes do mosto destinados às leveduras, levando a perdas consideráveis no rendimento da produção de álcool (AMORIM, 2005).

2.2.3 Bactérias lácticas amilolíticas e não-amilolíticas

As BAL são frequentemente utilizadas, visando à produção de AL, a partir de fontes de carbono previamente hidrolisadas. Contudo, nos últimos anos inúmeras pesquisas vêm relatando a capacidade de algumas espécies em produzir enzimas capazes de hidrolisar o amido, dispensando a etapa de hidrólise do carboidrato, essas são chamadas amilolíticas, enquanto que aquelas espécies isentas de tal capacidade são nomeadas não-amilolíticas.

A descoberta das bactérias amilolíticas se deu a partir de diferentes alimentos amiláceos tropicais, com destaque para a mandioca e cereais de milho (JOHANSSON et al., 1995). Devido à capacidade de hidrolisar parcialmente amidos crus, essas bactérias podem fermentar diferentes tipos de matérias-primas amiláceas, tais como batata, milho ou mandioca e diferentes substratos feculentos (ALTAF; NAVEENA, 2005; CHATTERJEE et al., 1997), utilizando biomassa e féculas para converter em ácido láctico em uma única etapa de fermentação, podendo tornar o processo mais econômico (JOHN et al., 2009; REDDY et al., 2008). No Quadro 1, listam-se algumas espécies de bactérias lácticas já relatadas, de acordo com o relato de atividade amilolítica ou não.

Quadro 1 Estudos de produção de ácido láctico utilizando diferentes espécies de bactérias lácticas amilolíticas ou não

Microrganismo	Produção de ácido láctico relatada	Amilolítica	Autor
<i>E. faecalis</i>	93 g.L ⁻¹ em 100g.L ⁻¹ de glicose em madeira hidrolisada	Não	Wee et al., (2004)
<i>E. faecium</i>	16,6g/g de sagu	Sim	Shibata et al., (2007)
<i>L. amylophilus</i>	0.76g/96g de amido solúvel	Sim	Vishnu; Seenayya; Reddy, (2000)
	0.93g/g de farinha de trigo	Sim	Vishnu; Seenayya; Reddy, (2002)
	0,78g/g de farinha	Não	Altaf; Naveena; Reddy, (2007)
<i>L. cellobiosus</i>	0.5g/g de resíduo de batata	Sim	Chatterjee et al., (1997)
<i>L. fermentum</i>	21,3g/L em meio enriquecido de batata	Sim	Fossi; Tavea, (2013)
<i>L. manihotivorans</i>	0.45g/g de amido solúvel	Sim	Guyot; Calderon; Morlon-Guyot, (2000)
	19.5g/200g de resíduo de alimentos	Sim	Guyot; Morlon-Guyot, (2001)
<i>L. paracasei</i>	192g/L em 200g/L de glicose	Não	Moon; Wee; Choi, (2012)
<i>L. plantarum</i>	23,86/100g de farinha de batata doce	Sim	Panda; Ray, (2008)
	4g/100g de massa seca de batata	Sim	Giraud et al., (1994)
<i>L. rhamnosus</i>	125g/L a partir de 150g/L de glicose	Não	Kwon et al., (2000)
	1,67 mol de ácido láctico/mol de glicose	Não	Berry et al., (1999)
<i>Lc. lactis</i>	~5.5 g.L ⁻¹ em meios de cultivo comerciais	Sim	Petrov; Urshev; Petrova, (2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20.75 g.L ⁻¹ em suco de caju como substrato	Não	Honorato; Rabelo; Pinto, (2007)
	15,5 g.L ⁻¹ em xarope de caju como substrato	Não	Guilherme; Pinto; Rodrigues, (2009)
<i>P.acidilactici</i>	1,06g/L/h em resíduo lignocelulósico	Não	Zhao et al., (2013)
<i>S. bovis</i>	14.7g/l em 20g de amido de milho	Sim	Narita; Nakahara; Fukuda, (2004)

Abreviações: *E. Enterococcus*; *L. Lactobacillus*; *Lc. Lactococcus*; *P. Pediococcus*; *S. Streptococcus*

2.3 Fontes de nitrogênio

Visando à obtenção de um maior rendimento na produção do ácido láctico, inúmeros pesquisadores têm suplementado o meio de cultivo com fontes de nitrogênio (ALTAF; NAVEENA; REDDY, 2007; ALTAF; NAVEENA, 2005; HUANEN; LINKO, 1996; LIMA et al., 2009; MI-YOUNG et al., 2003; OHKOUCHI; INOUE, 2007; OLIVEIRA et al., 2009) que possam atender às necessidades nutricionais das bactérias lácticas e, conseqüentemente, aumentar a produção desse ácido orgânico.

Dentre as fontes de nitrogênio atualmente utilizadas, está o extrato de levedura (HUJANEN; LINKO; LEISOLA, 2001; HUANEN; LINKO, 1996; MI-YOUNG et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009; WEE et al., 2004).

2.4 Batata

A batateira, embora seja cultivada como bianual na Região Sul do Brasil, é uma solanácea anual, pertencente ao gênero *Solanum*, originária dos Andes, próximo à fronteira do Peru e Bolívia. Algumas espécies têm sido utilizadas em programas de melhoramento genético, a fim de introduzir no mercado cultivares resistente a fatores bióticos e abióticos deletérios a cultura. É popularmente conhecida como batata, batatinha ou batata inglesa - uma denominação errônea, já que esta é uma cultura sul-americana (FILGUEIRA, 2003).

A parte de interesse da planta são os tubérculos, e é sua boa aparência que determina a aceitação de uma cultivar por parte do consumidor. Os tubérculos podem apresentar coloração variada com película externa clara ou rosada, lisa ou áspera; a polpa pode ser ligeiramente amarelada ou amarelo intenso, também pode apresentar coloração creme ou branca; 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).

2.4.1 Importância alimentar e econômica da batata

Segundo a Associação Brasileira da Batata (ABBA), a batata é considerada a quarta fonte alimentar da humanidade, atrás apenas do arroz, trigo e milho – cereais que constituem as três fontes principais de carboidrato. Alguns autores consideram ser ela a terceira fonte, já que em muitos países o milho não é aceito como alimento humano. A bataticultura constitui-se em um agronegócio de importância alimentar em todos os continentes, sendo seu consumo de maior ou menor importância conforme a região (FILGUEIRA, 2003; PEREIRA, 2008).

A batata é primeira cultura olerácea em importância econômica, sendo aquela de maior área cultivada. Segundo dados macroeconômicos do Ipeadata (2013) esses valores vêm oscilando entre 140 e 150 mil hectares na última década. Em 2013, a produção atingiu a marca aproximadamente 3,5 milhões de toneladas, sendo as regiões sudeste e sul as maiores produtoras, responsáveis por 83 % da produção nacional. Nesse contexto, os estados líderes na colheita da solanácea são: Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente, juntos somam 80 % da produção brasileira. Em outubro de 2013, Minas Gerais respondeu por aproximadamente 36 % da produção nacional. A região sul de Minas Gerais possui a maior área colhida do Estado e a segunda maior produção (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

Mesmo com a grande importância econômica, a bataticultura nacional agrega várias deficiências, inclusive no custo de produção elevado. Há muito se

constata o uso excessivo de fertilizantes e defensivos agrícolas, bem como a baixa utilização de batata-semente qualificada, mas esse quadro vem se modificando positivamente. Em 2010, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos de Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) monitorou os resíduos de agrotóxicos em 18 culturas coletadas em 25 estados do país e no Distrito Federal. Ao contrário da grande maioria das culturas analisadas, a batata obteve resultados satisfatórios em 100 % das amostras analisadas. Em 2001, primeiro ano de monitoramento do programa, 22,2 % das amostras de batata coletadas apresentavam irregularidades (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

O produto obtido das culturas de batateira é de qualidade variável, muito embora no Brasil a aparência externa seja superior ao da batata comercializada em outros países. Isso se deve à exigência dos brasileiros quanto ao aspecto do tubérculo diferente do que ocorre em países como o Peru, Holanda, Alemanha e Polônia (FILGUEIRA, 2003; ZAMBOLIM, 2011). Nesse contexto, os problemas agroeconômicos e agrotecnológicos são agravados pela elite econômica nacional, afetando a cadeia produtiva da batata, por meio das exigências feitas quanto à aparência externa do tubérculo. Fazendo com que grande parte de toda a produção nacional seja descartada com frequência (TAVARES, 2009).

Nos últimos anos, mundialmente têm-se despendido 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 possíveis impactos ambientais das mesmas. O potencial biotecnológico brasileiro depende não só da reutilização de resíduos agroindustriais, mas também do valor disso para as commodities agrícolas (como a batata e outros) produzidas em grandes quantidades e que têm um valor baixo no mercado internacional (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003), fato

este que nos revela que há muito a ser feito nessas áreas para desenvolver processos comerciais com viabilidade técnico-econômica.

2.4.2 Composição química da batata

A batata é conhecida nutricionalmente por apresentar alto teor de carboidratos, onde o amido é a forma predominante (60 a 80 % da matéria seca). Esse tubérculo possui em torno de 2 % de proteína total (cerca de 10 % da matéria seca) e quantidade importante de vitamina C, vitaminas do complexo B, ácido fólico e sais minerais (ZAMBOLIM, 2011), Tabela 2.

Tabela 2 Composição química da batata por 100 g de polpa sem casca

Centesimal		Minerais (mg)		Vitaminas (mg)	
Umidade (%)	82,9	Magnésio	15	Tiamina	0,1
Energia (Kcal)	64	Manganês	0,1	Riboflavina	Traços
Proteína (g)	1,8	Fósforo	39	Vitamina C	31,1
Lípídeos (g)	Traços	Ferro	0,4	Niacina	Traços
Carboidrato (g)	14,7	Potássio	302	Piridoxina	0,15
Fibra alimentar (g)	1,2	Cálcio	4		
Cinzas (g)	0,6	Cobre	0,09		
		Zinco	0,2		

Fonte: Adaptado de TACO (2006).

A composição química da batata, além de ser influenciada por fatores genéticos, pode variar ainda de acordo com as condições de cultivo, tais como o sistema de produção, clima e tipo de solo.

2.4.3 Cultivar Ágata

Nas últimas décadas, em meio às cultivares de batata existentes no Brasil, a cultivar ágata, de origem holandesa, vem dominando o setor de produção de batata para mercado fresco. Tal preferência se dá pelas características externas

dos tubérculos, potencial produtivo, facilidade de manejo e brotação (PEREIRA, 2011).

A cultivar ágata possui maturação precoce e produtividade elevada, os tubérculos são graúdos, ovalados, uniformes, com película amarela e lisa, olhos superficiais e polpa amarelo-clara. Seu baixo teor de matéria seca (EVANGELISTA et al., 2011; FERNANDES; SORATTO; SILVA, 2010; FILGUEIRA, 2003; ZAMBOLIM, 2011) limita o uso culinário, uma vez que esta não é indicada ao preparo de fritas (PEREIRA, 2011).

REFERÊNCIAS

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, Nov. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Relatório de atividades de 2010**. Brasília: Anvisa, 2011.

ALTAF, M.; NAVEENA, B. J. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v. 43, n. 3, p. 235–239, June 2005.

ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; REDDY, G. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 498–503, Feb. 2007.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005.

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

BERRY, A. R. et al. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 163–167, Feb. 1999.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Santa Catarina, v. 2, p. 127–139, 2011.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 28, n. 4, p. 281–370, Jan. 2002.

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

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, July 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, p. 221–231, 1995.

DETMER, A.; GLENTING, J. Live bacterial vaccines: a review and identification of potential hazards. **Microbial Cell Factories**, Amsterdam, v. 23, n. 5, p. 1–12, June 2006.

EVANGELISTA, R. M. et al. Qualidade nutricional e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 953–960, ago. 2011.

FERNANDES, A. M.; SORATTO, R. P.; SILVA, B. L. Crescimento, acúmulo e distribuição de matéria seca em cultivares de batata na safra de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 826–835, ago. 2010.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas**: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló. Lavras: Editora da UFPA, 2003.

FOSSI, B.; TAVEA, F. Application of amylolytic *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 in fermentation for simultaneous production of thermostable α -amylase and lactic acid. In: KONGO, M. (Ed.). **Lactic acid bacteria: R & D for food, health and livestock purposes**. Canadá: Intech, 2013. Chap. 27, p. 633-658.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 6, p. 930–939, Nov./Dec. 2011.

GIRAUD, E. et al. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 12, p. 4319–4323, Dec. 1994.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC. Lactic Acid: global strategic business report. **Research and Markets The World's Largest Market Research Store**, Taylors Lane, Apr. 2012. Disponível em: <http://www.researchandmarkets.com/research/pkzwxk/lactic_acid>. Acesso em: 15 jul. 2013.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 738–747, dez. 2009.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly (lactic acid) fiber: an overview. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 32, n. 4, p. 455–482, Apr. 2007.

GUYOT, J. P.; CALDERON, M.; MORLON-GUYOT, J. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 176–182, Jan. 2000.

GUYOT, J. P.; MORLON-GUYOT, J. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32 T, an amylolytic *Lactobacillus* isolated from sour starch cassava fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 217–225, 2001.

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, Feb. 2000.

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

HORIE, K. et al. Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 76, n. 4, p. 889–906, Feb. 2004.

HUJANEN, M.; LINKO, S.; LEISOLA, M. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+) (S) lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 1-2, p. 126–130, July 2001.

HUJANEN, M.; LINKO, Y.-Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 3, p. 307–313, Apr. 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Batata. São Paulo:IBGE, 2013. Disponível em: <[http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php?option=com_content &view=article&id=1361&Itemid=29](http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1361&Itemid=29)>. Acesso em: 20 out. 2013.

IPEADATA. **Área colhida**: batata inglesa. Rio de Janeiro: Abia, 2013. Disponível em: <<http://www.ipeadata.gov.br/>>. Acesso em: 29 nov. 2013.

JAMSHIDIAN, M. et al. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, London, v. 9, n. 5, p. 552–571, Sept. 2010.

JOHANSSON, M. L. et al. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 159–168, Apr. 1995.

JOHN, R. P. et al. Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 145–152, Mar./Apr. 2009.

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, Mar. 2007.

KWON, S. et al. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 2-4, p. 209–215, Feb. 2000.

LANCELLOTTI, A. Bioplastics in Brazil: beyond the green speech. **Frost & Sullivan Market Insight**, Oxford, May 2010. Disponível em: <<http://www.frost.com/prod/servlet/market-insight-print.pag?docid=202545927>>. Acesso em: 06 abr. 2012.

LIMA, C. J. B. et al. Response surface optimization of D(-) lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate

as an alternative nitrogen source. **African Journal of Biotechnology**, Dordrecht, v. 8, n. 21, p. 5842–5846, Nov. 2009.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos: volume 3**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 115-131, June 2003.

LOPES, A. R. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

LUNT, J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 59, n. 1-3, p. 145–152, Jan. 1998.

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, Mar. 2013.

MI-YOUNG, H. et al. Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/ corn steep liquor / glucose medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 96, n. 2, p. 134–140, 2003.

MOON, S.; WEE, Y.; CHOI, G. 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.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. (Ed.). **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**. Ames: Blackwell, 2010.

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

NARITA, J.; NAKAHARA, S.; FUKUDA, H. Efficient production of L(+) lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 97, n. 6, p. 423–425, 2004.

NAVEENA, B. J.; ALTAF, M.; BHADRAYYA, K. Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v. 42, n. 3, p. 147–152, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTOS. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2. ed. Campinas: NEPA, 2006.

OHKOUCHI, Y.; INOUE, Y. Impact of chemical components of organic wastes on L(+) lactic acid production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 546–553, Feb. 2007.

OLIVEIRA, R. F. et al. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, p. 34–40, June 2009.

PANDA, S. H.; RAY, R. C. Direct conversion of raw starch to lactic acid by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 in semi-solid fermentation using sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) flour. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 67, n. 7, p. 531–537, July 2008.

PEREIRA, A. S. A evolução da cultura da batata no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51., 2011, Viçosa. **Anais...** Viçosa: ABH, 2011. p. 4237-4243.

PEREIRA, A. S. Batata: fonte de alimento para a humanidade. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 133-133, jul. 2008.

PETROV, K.; URSHEV, Z.; PETROVA, P. L(+) Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 4, p. 550–557, June 2008.

PING, L. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 265–276, 2005.

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly (lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, 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, Jan./Feb. 2008.
- ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, Bethesda, v. 287, n. 3, p. 502–516, Sept. 2004.
- RUDNIK, E. **Compostable polymer materials**. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- SHIBATA, K. et al. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 1-2, p. 149–155, July 2007.
- SHIH, Y-F.; HUANG, C.-C.; CHEN, P.-W. Biodegradable green composites reinforced by the fiber recycling from disposable chopsticks. **Materials Science and Engineering A**, Lausanne, v. 527, n. 6, p. 1516–1521, Mar. 2010.
- 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, Mar. 2003.
- TAVARES, V. B. **Silagens de capim-elefante aditivadas com raspa de batata diversa na alimentação de bovinos leiteiros**. 2009. 100 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- TRINDADE, M. C. **Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas surfatantes**. 2002. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 245–264, 2008.
- 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, Aug. 2000.
- WEE, Y.-J. et al. Biotechnological production of L(+) lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 71–74, Jan. 2004.

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

ZAMBOLIM, L. **Produção integrada da batata**. Viçosa: Editora da UFV, 2011.

ZHAO, K. et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. **Bioresource Technology**, Essex, v. 135, p. 481–489, May 2013.

YADAV, A. K.; CHAUDHARI, A. B.; KOTHARI, R. M. Bioconversion of renewable resources into lactic acid: an industrial view. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 31, n. 1, p. 1–19, Mar. 2011.

CAPÍTULO 2 Capacidade amilolítica e seleção da espécie de bactéria láctica com maior produtividade de ácido láctico

RESUMO

O ácido láctico (AL) é um ácido orgânico que pode ser obtido industrialmente por fermentação, utilizando principalmente bactérias lácticas (BAL). Nos últimos anos, inúmeros pesquisadores vêm relatando a existência de espécies capazes de converter amido diretamente em AL, dispensando o processo de hidrólise, sendo chamadas de BAL amilolíticas. O cultivo de batata apresenta importância econômica no Brasil, sendo o Estado de Minas Gerais o maior produtor. Entretanto, suas perdas são significativas durante a colheita e comercialização. Assim, neste trabalho, foram testadas 5 espécies de BAL (*Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus* e *Streptococcus mutans*), utilizando meios de fermentação à base de batata da cultivar ágata para avaliar a produção de ácido láctico. Os meios de fermentação continham 33 % (m/v) de polpa de batata e foram submetidos ou não à hidrólise enzimática com α -amilase e amiloglicosidase. Para avaliar a influência do enriquecimento do meio fermentativo com uma fonte de nitrogênio, os meios foram adicionados ou não com 5 % (m/v) de extrato de levedura (EL). A fermentação foi conduzida em erlenmeyer e armazenada em estufa BOD, sem agitação a 37 °C/96 h. Avaliou-se a cinética de pH e acidez da fermentação e o volume de AL produzido foi quantificado com CLAE. Dentre os meios avaliados a maior produtividade se deu em meios hidrolisados e enriquecidos com EL. Considerando os aspectos de produtividade de AL, conclui-se que a maior produção se deu por *L. rhamnosus* (7,95 g/L) e *L. plantarum* (6,55 g/L) em meios fermentativos de polpa de batata hidrolisada e enriquecida com EL, com produtividade de 0,08 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,07 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. De acordo com as características fisiológicas das melhores produtoras, optou-se pela seleção de *L. rhamnosus*, uma vez que essa espécie é relatada com produtora exclusiva do isômero L(+) ácido láctico. As diferentes linhagens de BAL investigadas mostraram baixo potencial amilolítico nas condições em que foram testadas.

Palavras-chave: Batata. Fermentação. Extrato de Levedura. *L. rhamnosus*.

ABSTRACT

Lactic acid (LA) is an organic acid that can be industrially obtained by fermentation especially using lactic acid bacteria (LAB). In recent years, several researchers have reported the existence of species capable of converting starch directly to LA, eliminating the hydrolysis process, being called amylolytic LAB. The potato crop has economic importance in Brazil, with the state of Minas Gerais being the largest producer. However, its losses are significant during harvesting and marketing. Thus, in this work we tested 5 LAB species (*Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus* and *Streptococcus mutans*), using fermentation media based on potato, agata cultivar, to evaluate the production of lactic acid. The fermentation media contained 33 % (w/v) of potato pulp and were submitted or not to enzymatic hydrolysis with alpha-amylase and amyloglucosidase. To evaluate the influence of enriching the fermentative medium with a nitrogen source, the means were added or not with 5 % (w/v) yeast extract (YE). The fermentation was conducted in erlenmeyer flask and stored in BOD oven without agitation, at 37 °C for 96 h. We evaluated the kinetics of fermentation pH and acidity and volume of LA produced was quantified by HPLC. Among the evaluated media, the highest productivity was obtained in hydrolyzed and enriched with YE media. Considering the productivity aspects LA, we concluded that the highest production was obtained by *L. rhamnosus* (7.95 g/L) and *L. plantarum* (6.55g/L) in hydrolyzed potato pulp enriched with YE, with productivity of 0.08 gL⁻¹.h⁻¹ and 0.07 gL⁻¹.h⁻¹, respectively. According to the physiological characteristics of the best producers, we opted for the selection of *L. rhamnosus*, since this species is reported as exclusive producer of the L(+) lactic acid isomer. The different strains of LAB investigated showed low amylolytic potential under the testing conditions.

Keywords: Potato. Fermentation. Yeast extract. *L. rhamnosus*.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico são microrganismos amplamente conhecidos e de extrema importância comercial. Esse grupo de bactérias obtém energia através da fermentação de açúcares e possui o ácido láctico como principal produto final da via homofermentativa. Nos últimos anos, diversas pesquisas vêm relatando a existência de espécies de bactérias lácticas capazes de converter amido diretamente em ácido láctico, dispensando o processo de hidrólise comumente utilizada, a estas deu-se o nome de bactérias lácticas amilolíticas.

O ácido láctico é um ácido orgânico produzido naturalmente pelo metabolismo animal e pode também ser obtido por fermentação ou síntese química. Sua obtenção por via fermentativa apresenta vantagens em relação à síntese química, já que o processo de fermentação pode gerar um produto opticamente puro e, ainda, empregar nesse processo matérias-primas de baixo custo, subprodutos ou resíduos industriais, atendendo assim à crescente preocupação da sociedade com o desenvolvimento e sustentabilidade do meio ambiente. A pureza do ácido produzido pode influenciar diretamente no emprego final do produto.

Durante a fermentação microbiana é possível agregar ou subtrair fatores que aumentem a produção do ácido láctico. Fundamentado nesse conceito, vários estudos investigam tais condições, a fim de correlacionar elementos como microrganismos, substratos fermentativos e problemas de aspectos ambientais, com métodos que aumentem as concentrações, os rendimentos e produtividades do ácido láctico.

Atualmente, a substituição eficiente da fonte de carbono empregada e de alto valor agregado por excedentes e resíduos da agroindústria e da indústria de alimentos, tal como o amido, facilmente disponíveis a partir da batata, mandioca, milho e outras biomassas, representa uma atraente alternativa para o

processo. É importante ressaltar ainda que o Brasil é produtor de grande parte das culturas utilizadas na indústria do ácido lático, o que nos garante certa vantagem em relação aos demais países. No Brasil, a utilização da batata como substrato fermentativo desse processo certamente favorece o Estado de Minas Gerais, uma vez que este é o maior produtor nacional do tubérculo e a região sul mineira, a segunda maior produtora do Estado. Logo, o uso da batata como matéria-prima renovável e em excesso no mercado, paralelamente ao enriquecimento do meio de fermentação com uma fonte de nitrogênio, trata-se de uma alternativa viável para a indústria de ácido lático, onde se espera o aumento da produtividade, diminuição nos custos de obtenção e consequente difusão desse ácido no mercado, com menores valores de produção, beneficiando principalmente a indústria de biopolímeros, uma vez que o isômero L desse ácido é a principal matéria-prima para a fabricação de bioplásticos.

Assim, nesta pesquisa, objetivou-se selecionar, entre as diferentes linhagens de bactérias lácticas, a espécie e as condições do meio fermentativo que proporcionar maior produção de ácido lático, avaliando a cinética da fermentação láctica e a produtividade do processo, além de investigar a capacidade amilolítica das espécies estudadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Produtos vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos e no laboratório de Enzimas Microbianas do Departamento de Biologia, todos situados na Universidade Federal de Lavras (UFLA). A metodologia foi executada conforme ilustra-se, na Figura 1.

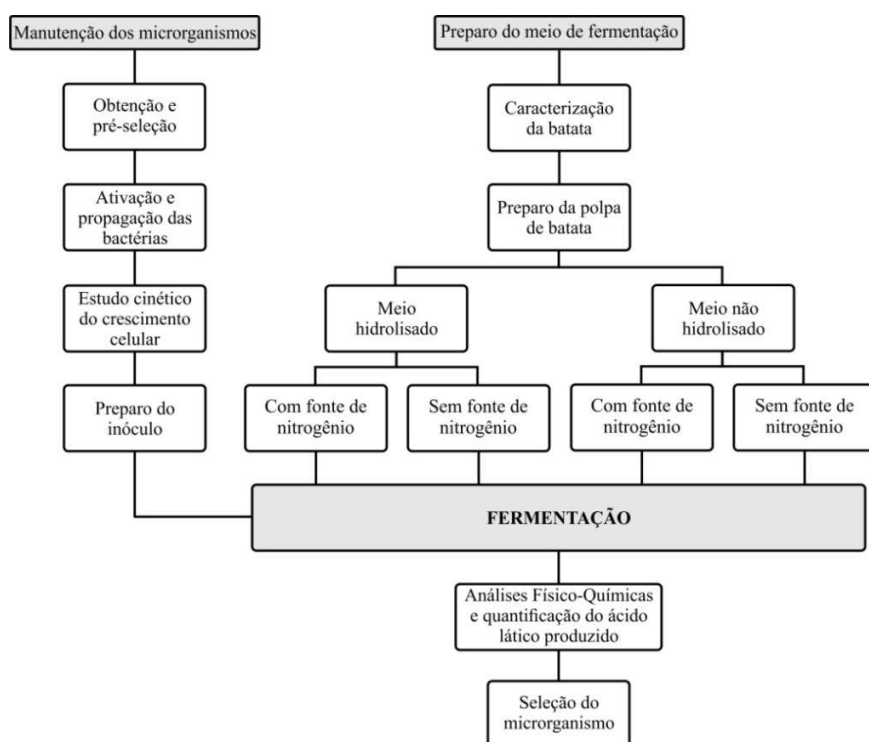


Figura 1 Organograma de execução das etapas da metodologia

2.1 Pré-seleção e manutenção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados foram cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz – FioCruz (Rio de Janeiro/RJ). De acordo com o acervo disponível na

instituição, as espécies de BAL foram selecionadas, seguindo dois critérios: produção de L(+) ácido lático e atividade amilolítica já relatada.

Os microrganismos investigados foram: *Enterococcus durans* (ATCC 6056), *E. faecalis* (ATCC 29212), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 10012), *L. rhamnosus* (ATCC 9595) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

2.1.1 Ativação e propagação da cultura estoque de bactérias lácticas em meio congelante

Na Figura 2, esquematizam-se os procedimentos adotados para a ativação e propagação da cultura estoque em meio congelante. Posteriormente, esse esquema é descrito em detalhes.

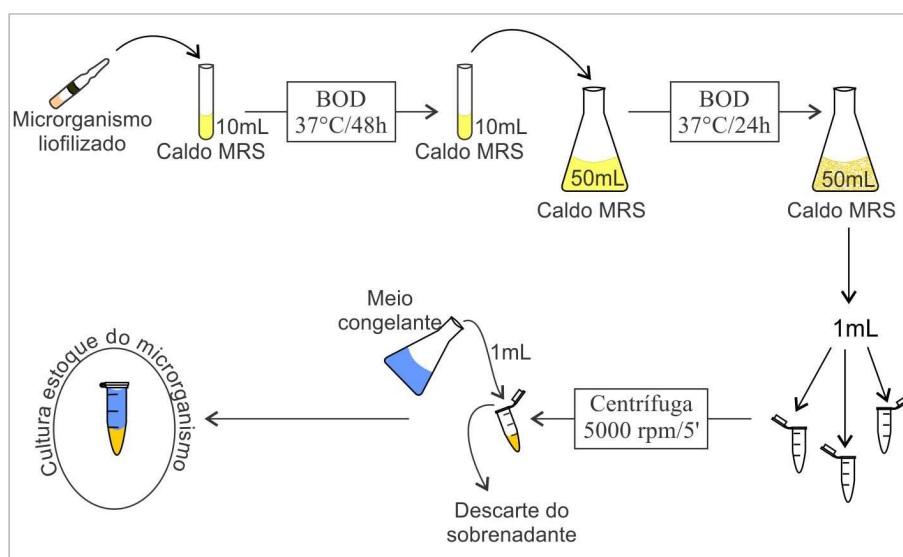


Figura 2 Esquema de ativação e preparação da cultura estoque dos microrganismos em meio congelante

Uma vez que os microrganismos foram adquiridos na forma liofilizada, uma etapa de ativação dos mesmos foi necessária. Tal procedimento se deu pela

transferência dos liofilizados para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe, marca Himédia[®], composto por peptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 4 g.L⁻¹, extrato de carne 8 g.L⁻¹, glicose 20 g.L⁻¹, monooleato de sorbitan 1 mL.L⁻¹, fosfato de dipotássio 2 g.L⁻¹, acetato de sódio 2 g.L⁻¹, citrato triamônico 2 g.L⁻¹, sulfato de magnésio 0,20 g.L⁻¹ e sulfato de manganês 0,05 g.L⁻¹) previamente esterilizado em autoclave (121 °C/15 min). Em seguida, estes foram mantidos em estufa BOD a 37 °C por 48 horas. A temperatura utilizada é considerada ótima para as BAL (AXELSSON, 2004).

A etapa subsequente à ativação das bactérias foi a propagação. Após a verificação do aumento da turbidez do inóculo (Figura 3), este foi então transferido para erlenmeyer 125 mL, contendo 50 mL de caldo MRS estéril e mantido em estufa BOD 37 °C por 24 horas, até o aumento da turbidez.



Figura 3 Aumento da turbidez de *L. rhamnosus* em caldo MRS, após 24 horas em estufa BOD a 37 °C

Em seguida, a fim de preparar as culturas estoque, uma alíquota de 1 mL do novo inóculo que se encontrava em fermentação no caldo MRS, foi transferida para eppendorfs, previamente esterilizado (121 °C/15 min) e centrifugado a 5000rpm, por 5 minutos, 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) e a solução esterilizada (121 °C/15min).

2.1.2 Preparo do inóculo da fermentação

Com base na correlação absorbância e número de células viáveis previamente estabelecida por meio das curvas de crescimento (APÊNDICE A), foi possível determinar o valor de absorbância correspondente a uma contagem entre 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹. Uma vez conhecida a quantidade de inóculo a ser transferido para o meio de fermentação, determinaram-se os volumes de inóculos de 1 % v/v (*L. plantarum* e *L. rhamnosus*) e 10 % v/v (*E. durans*, *E. faecalis* e *S. mutans*).

A seguir, são descritas as metodologias para preparo de cada inóculo, conforme o volume final de fermentação, para testes em triplicata.

Inóculo de fermentação para *L. plantarum* e *L. rhamnosus* (1 % v/v): Um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS estéril foi adicionado de 10 % da cultura estoque e mantido em estufa BOD a 37 °C/24 h. Posteriormente, um erlenmeyer contendo 50 mL de caldo MRS estéril foi adicionado 10 % (v/v) do inóculo anterior (5 mL) e mantido a 37 °C. Após 12 h, foi conferido o valor de absorbância do inóculo e 1 % (v/v) do inóculo foi transferido para erlenmeyer contendo 300 mL de meio de fermentação.

Inóculo de fermentação para *E. durans*, *E. faecalis* e *S. mutans* (10 % v/v):

Um tubo de ensaio contendo 30 mL de caldo MRS estéril foi adicionado de 10% da cultura estoque e mantido em estufa BOD a 37 °C/24 h. Posteriormente, um erlenmeyer contendo 300 mL de caldo MRS estéril foi adicionado de 10 % (v/v) do inóculo anterior (30 mL) e mantido a 37 °C. Após 8 h, conferiu-se o valor da absorbância e 10 % (v/v) do inóculo foi transferido para erlenmeyer, contendo 300 mL do meio de fermentação.

2.2 Preparo de meios para fermentação

Os procedimentos adotados para a obtenção da polpa de batata e preparação dos meios fermentativos são descritos a seguir.

2.2.1 Obtenção da matéria-prima e preparo da polpa de batata

Batatas da espécie *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, cultivar Ágata, foram adquiridas no comércio local da cidade de Lavras/MG. As batatas foram lavadas, secas, descascadas, picadas e trituradas em liquidificador industrial por aproximadamente 5 minutos. Em sequência, a polpa homogeneizada foi pesada e armazenada em sacos hermeticamente fechados (1 kg/saco) em temperatura de congelamento para posterior utilização (Figura 4).

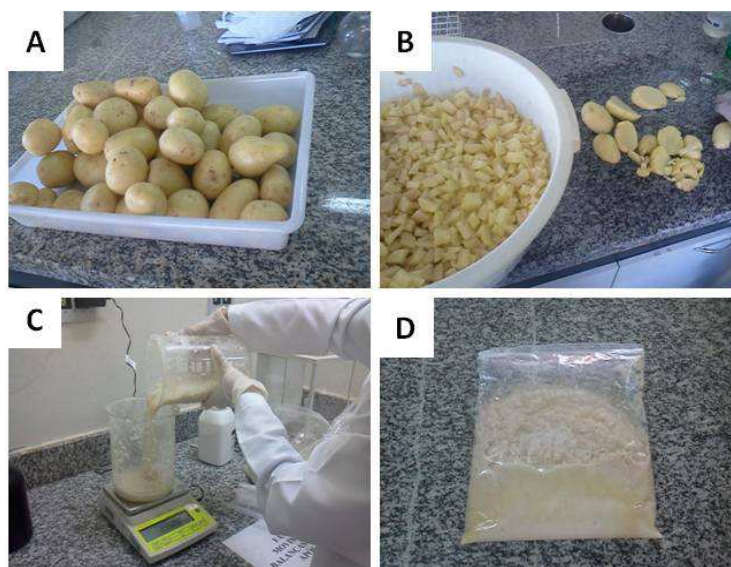


Figura 4 Sequência de preparação da polpa de batata: (A) lavagem e secagem; (B) descascamento e picagem; (C) pesagem da polpa de batata triturada (D) armazenamento em sacos herméticos

Uma amostra da polpa foi retirada para a caracterização da batata (Metodologia analítica, Item 2.4).

2.2.2 Preparo do meio de fermentação não hidrolisado

A polpa de batata descongelada foi homogeneizada em água destilada na proporção de 330 g da polpa por 670 mL de água. Essa mistura foi acrescida ou não de 5 % (m/v) de extrato de levedura (EL) e homogeneizada manualmente. O pH foi ajustado para a faixa ótima de atuação das BAL, entre 5 e 7 (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008) e o meio foi então esterilizado em autoclave (121 °C/15 min). Após o resfriamento, o mosto (meio de cultura) foi inoculado (conforme o Item 2.1.2) e as fermentações conduzidas em estufa BOD sem agitação a 37 °C/96 h, dentro de erlenmeyers vedados com algodão.

2.2.3 Preparo do meio de fermentação hidrolisado

Para a obtenção do hidrolisado, a polpa de batata descongelada foi homogeneizada em água destilada (330 g da polpa por 670 mL de água). O volume total da mistura sofreu processo de hidrólise enzimática do amido realizado em duas etapas.

A primeira etapa da hidrólise consistiu na gelificação do amido por meio do aquecimento da mistura em banho-maria com agitação. Ao atingir 90 °C o pH foi ajustado para a faixa ótima (6,0 e 6,5) de atuação da enzima α -amilase (Termamyl 2X[®]) e a mesma foi adicionada à mistura (1,5 mL/kg de polpa batata). A mistura foi mantida a 90 °C/1 h, para hidrólise da cadeia linear do amido. Novamente, o pH foi ajustado para o ótimo de atividade da segunda enzima glicoamilase (entre 4,0 e 4,5) e a temperatura reduzida para 60 °C. A enzima amiloglicosidase (AMG 300L[®]) foi adicionada (1,5 mL/kg de polpa de batata) e mantida a mistura mantida a 60 °C/1 h, para garantir que as dextrinas produzidas pela primeira enzima pudessem ser hidrolisadas em monômeros de glicose (PAVLAK; ABREU-LIMA; CARREIRO, 2011). Concluída a etapa de hidrólise, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e o pH ajustado para a faixa ótima de atuação das BAL, entre 5 e 7 (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008). As enzimas utilizadas nesse processo foram doadas pela empresa Romerlabs e as correções de pH utilizaram potenciômetro digital (Tecnopon, modelo mPA-210) e soluções de HCl (1 M e 0,01 M) e NaOH (1 M e 0,01 M).

Por fim, o mosto foi acrescido ou não de 5 % (v/v) de extrato de levedura e após a homogeneização foi esterilizado em autoclave (121 °C/15 min). O mosto foi resfriado e o inóculo adicionado (conforme Item 2.1.2). As fermentações foram conduzidas em estufa BOD sem agitação a 37 °C/96 h,

dentro de erlenmeyers vedados com algodão (Figura 5). Todos os processos fermentativos foram realizados em triplicata.



Figura 5 Mosto de fermentação após esterilização e adição do inóculo

Após o início da fermentação e a cada 12 h foram retiradas do mosto aproximadamente 15 mL de amostra. Essas amostras foram adquiridas assepticamente e centrifugadas a 2260 g/30 min (Figura 6).



Figura 6 Amostras já centrifugadas oriundas do processo fermentativo

O sedimentado foi descartado e o sobrenadante foi congelado e armazenado para análises posteriores de pH, ácidos totais e ácido lático.

2.3 Capacidade amilolítica e seleção da melhor linhagem produtora de ácido láctico

A investigação da capacidade amilolítica das BAL empregadas neste estudo, teve como base a comparação do desempenho das mesmas em produzir AL em meio não hidrolisado e hidrolisado de polpa de batata.

A seleção da espécie com melhores características de produção de AL baseou-se no fundamento teórico e nos resultados obtidos por este estudo (pH, acidez, produção de AL e características morfofisiológicas das bactérias).

2.4 Metodologia analítica

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

2.4.1 Caracterização da matéria-prima

A polpa da batata (sem a casca) foi caracterizada pelo teor de umidade, teor de amido e composição centesimal. A metodologia utilizada é descrita a seguir:

2.4.1.1 Teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade, foi utilizada a metodologia AOAC International (2012). Foi pesada uma massa de 30 g de polpa de batata (obtida conforme o Item 2.2.1) em balança analítica (Bioprecisa). Em seguida, as amostras foram desidratadas por aproximadamente 72 h em estufa a 65 °C até

peso constante. As amostras secas foram arrefecidas em dessecador e seu peso determinado. O valor de umidade foi obtido pela Equação 1.

$$\text{Teor de Umidade} = (\text{Massa integral} - \text{Massa seca})/\text{Massa integral} \times 100 \quad (1)$$

Posteriormente, as amostras desidratadas foram trituradas, com o auxílio de gral e pistilo, para a determinação da composição centesimal e do teor de amido.

2.4.1.2 Determinação da composição centesimal e teor de amido

Os teores de proteína, fibra, extrato etéreo e cinzas, foram determinados conforme a metodologia da AOAC International (2012) e do Instituto Adolfo Lutz (2008).

O teor de amido na batata foi avaliado pelo método de Somogyi modificado por Nelson (1944).

Extração: Para a etapa de extração, foi necessária a adição de 0,5 g de carbonato de cálcio (CaCO_3) e 1 g de amostra seca em 80 mL de álcool etílico 70 °GL, posteriormente essa mistura foi levada ao banho-maria por 1 hora e depois permaneceu em repouso por 15 h. Após o repouso, o resíduo foi lavado e filtrado com aproximadamente 30 mL de álcool etílico 95 °GL. O resíduo sólido foi utilizado na determinação de amido.

Hidrólise do amido: Nesta etapa, o resíduo sólido foi misturado com 80 ml de água destilada, três gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10 % e autoclavado (120 °C/1 h). Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e novamente autoclavado (120 °C/30 min). Após resfriar, as amostras foram neutralizadas (pH 7,0) com NaOH 10 % e 50 % e o volume foi completado para 100 mL com água destilada e filtrado.

Desproteínoização: O desproteínoizado foi formado pela mistura de 3 mL de filtrado, 9 mL de água destilada, 1,2 mL hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) 0,3M e 1,2 mL de sulfato de zinco (ZnSO_4) 5 %. Posteriormente, foi realizada uma nova filtração dessa mistura.

Determinação do Amido: Uma alíquota de 2 mL do desproteínoizado foi retirada para reação com 1 mL do reativo de Somogyi, também chamado de reativo cúprico (mistura de 25 mL de reativo A e 1 mL de reativo B). As amostras foram levadas para banho-maria por 20 minutos e imediatamente resfriadas em banho de gelo. Em seguida, foi acrescentado 1 mL do reagente de Nelson, também chamado de reativo Arsenomolibdico e 6 mL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Cary 50 Probe® da Varian) com comprimento de onda de 510 nm e expressos em g/100 g de amostra em comparação com a curva padrão de glicose.

2.4.2 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 foram diluídos 1 mL de amostra em 50 mL de água destilada e titulado com solução de NaOH 0,01N, tendo-se usado fenolftaleína 1 % como indicador (AOAC INTERNATIONAL, 2012). O pH da titulação foi conferido com potenciômetro digital de bancada até atingir pH próximo de 8,3 (PLATA-OVIEDO, 1998).

A acidez titulável foi expressa em % (m/v), com auxílio da Equação 2.

$$\text{AT (\% de ácido láctico, m/v)} = (\text{V} \times \text{f} \times 0,9 \times \text{N} \times 100) / \text{A} \quad (2)$$

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);

0,9: fator de conversão do ácido láctico;

N: normalidade da solução de NaOH utilizada (0,01 N ou 0,1N).

2.4.3 Determinação do ácido láctico

As análises de quantificação do AL produzido foram realizadas no polo de Café localizado no campus da UFLA. 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 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 deionizada antes da injeção no cromatógrafo. A quantificação do AL foi determinada pela comparação dos tempos de retenção dos picos e curva de calibração de padrão de ácido láctico, da marca Sigma® (APÊNDICE B).

2.4.4 Determinação da produtividade do ácido láctico

A determinação da produtividade se deu pela relação da concentração de ácido láctico final e o tempo de fermentação, conforme a Equação 3 (OLIVEIRA et al., 2009).

$$\text{Produtividade (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}) = \text{Ácido Lático (g.L)}/\text{Tempo de fermentação(h)} \quad (3)$$

2.4.5 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 despejou-se cerca de 15 mL de ágar MRS. A amostra foi homogeneizada no meio de cultura, realizando movimentos aleatórios até a secagem do meio. Uma sobrecamada foi adicionada, com o objetivo de criar uma atmosfera de aproximadamente 15 % de CO_2 . As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas (TEBALDI et al., 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da polpa de batata

Os resultados da análise química da polpa de batata utilizada para formulação dos meios de fermentação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Resultados da análise de composição química da batata sem casca

Parâmetros (% m/m)	<i>Este estudo</i>	EVANGELISTA ¹	TACO ²	USDA ^{3a}
Amido	8,17	10,21	- ^b	15,44
Cinzas	0,72	0,86	0,6	1,08
Fibra	0,6	0,34	1,2	2,2
Lipídeos	0,14	Traço	traço	0,09
Proteína	2,25	1,42	1,8	2,02
Umidade	85,65	85,54	83	80

^a Os autores utilizaram a casca da batata durante as análises; ^b Não consta essa informação no estudo citado.

Fonte: ¹Evangelista et al. (2011), ²Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentos (2006) e ³United States Department of Agriculture (2011)

Os valores da composição química da polpa de batata utilizada nesse estudo são próximos aos relatados por outros autores, exceto para amido. As diferenças no teor de amido podem estar relacionadas às práticas de cultivo adotadas no manejo da cultura, como a adubação potássica que altera o teor de amido nos tubérculos (EVANGELISTA et al., 2011), ou diferenças na época de plantio (ZAMBOLIM, 2011).

3.2 Estudo cinético do pH e acidez durante as fermentações

Os meios de fermentação hidrolisados ou não hidrolisados, independentemente da adição do extrato de levedura (EL), apresentaram pH

inicial entre 5 e 7, valor este considerado ótimo para atividade metabólica dos microrganismos, (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008) e que proporciona condições adequadas para a produção do metabólito de interesse, o ácido láctico.

3.2.1 Meios de fermentação não hidrolisados

Avaliando a evolução do pH ao longo da fermentação em meio sem EL (Figura 7), observa-se que entre as espécies estudadas, *L. rhamnosus* manteve maior valor de pH, durante as 96 h do processo fermentativo, com pH final (5,29) próximo daquele apresentado inicialmente (5,56). Notou-se ainda que em todas as linhagens testadas, o valor de pH se estabilizou após 12 h de fermentação e que *L. plantarum* apresentou maior queda de pH nesse período (4,28).

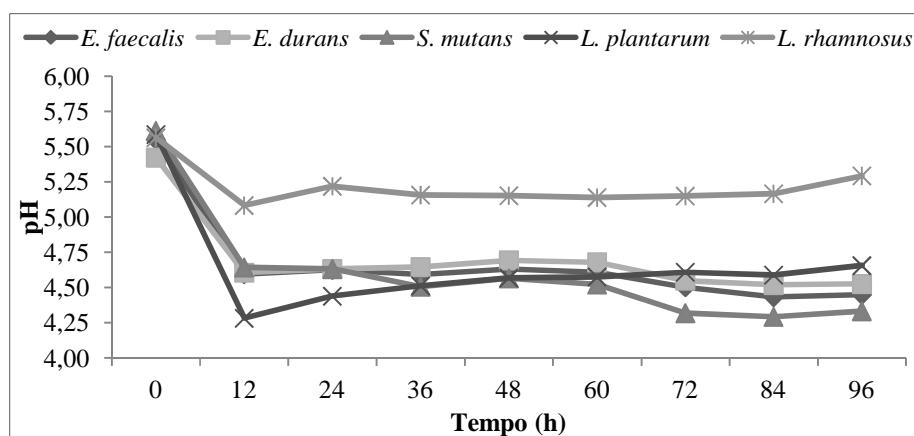


Figura 7 Variação do pH durante a fermentação de meio não hidrolisado de batata sem extrato de levedura

No meio fermentativo adicionado de extrato de levedura (Figura 8) as espécies do gênero *Lactobacillus* apresentaram comportamento semelhante ao

meio sem extrato, ou seja, com estabilização de pH após 12 h de fermentação. Com respeito às demais espécies, verificou-se gradativa redução do pH no decorrer do processo e, na fermentação com *E. durans*, o pH estabilizou-se apenas 72 h após a adição do inóculo.

Todas as espécies estudadas apresentaram pH final próximos entre si, variando entre 4,5 e 4,75.

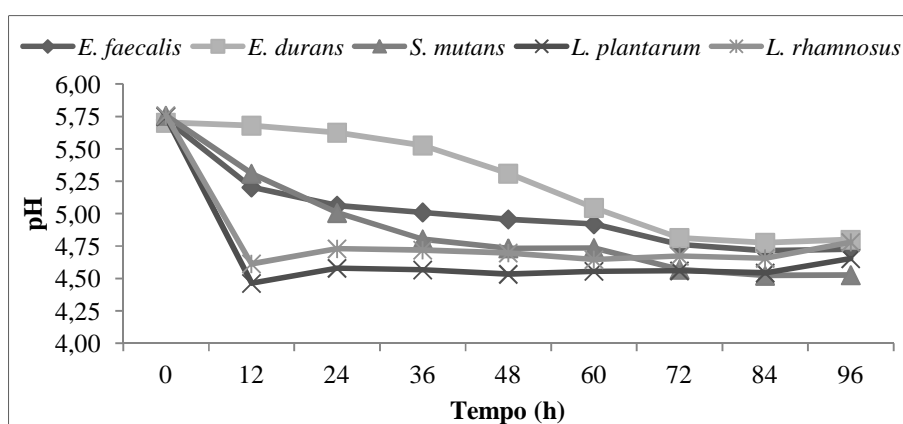


Figura 8 Variação do pH durante a fermentação de meio não hidrolisado de batata com extrato de levedura

A produção de ácidos totais nos meios de fermentação sem EL é observada na Figura 9, onde é possível analisar a evolução da produção de ácidos orgânicos totais durante as 96 h do processo fermentativo (Figura 9A) e a concentração inicial e final desses ácidos (Figura 9B). Nota-se que a evolução da acidez corrobora com o comportamento do pH quando as mesmas condições foram testadas, onde a maior produção de ácidos ocorreu nas 12 primeiras horas de fermentação (Figura 9A) e, conseqüentemente, houve a diminuição de pH (Figura 7) nesse mesmo período.

Pela Figura 9B, observa-se que, entre as espécies estudadas, *L. rhamnosus* apresentou irrisória produção de ácidos orgânicos. Uma vez que a

acidez final foi de 0,93 %, essa linhagem produziu somente 0,03 % de ácidos totais. Ainda conforme a Figura 9B, *S. mutans* apresentou maior teor de ácidos orgânicos, com acidez final de 3,9 % a produção foi de 1,92 % de ácidos totais.

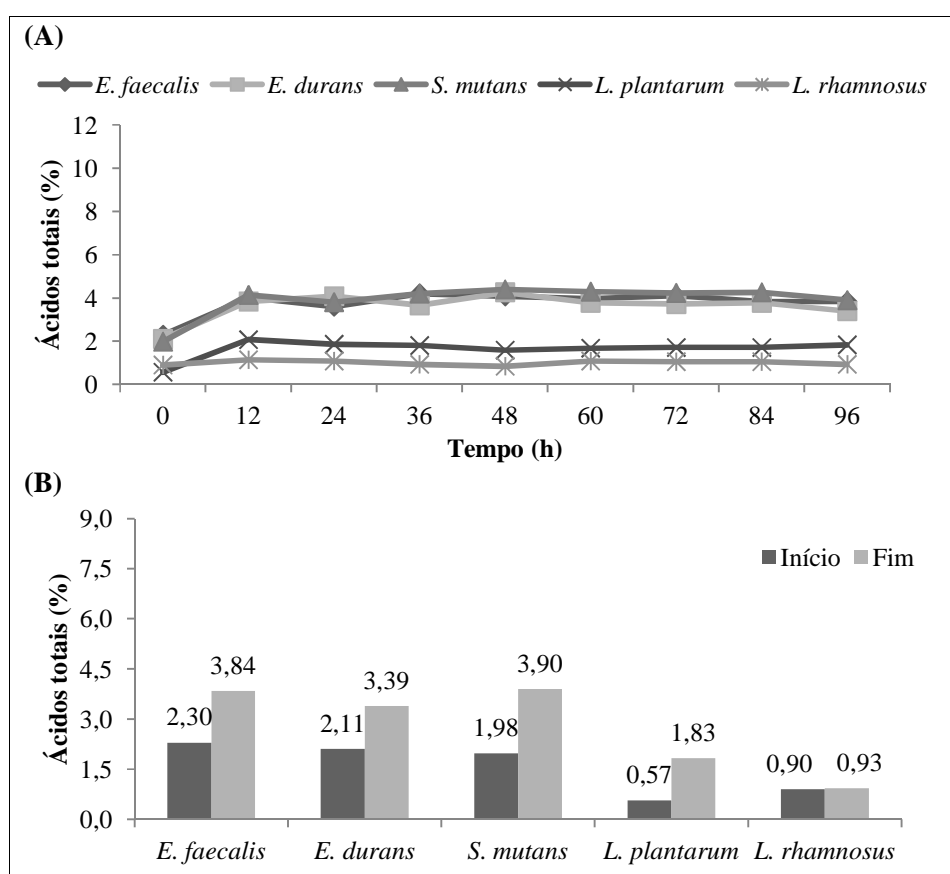


Figura 9 Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final em processo fermentativo (B) com meios não hidrolisados de batata sem extrato de levedura

Na Figura 10, é apresentada a acidez titulável dos meios de fermentação não hidrolisados e com EL, possibilitando avaliar a produção de ácidos orgânicos por cada microrganismo. Na Figura 10A, mostra-se a cinética da

produção de ácidos orgânicos totais ao longo do processo fermentativo e na Figura 10B, ilustra-se a concentração inicial e final desses ácidos.

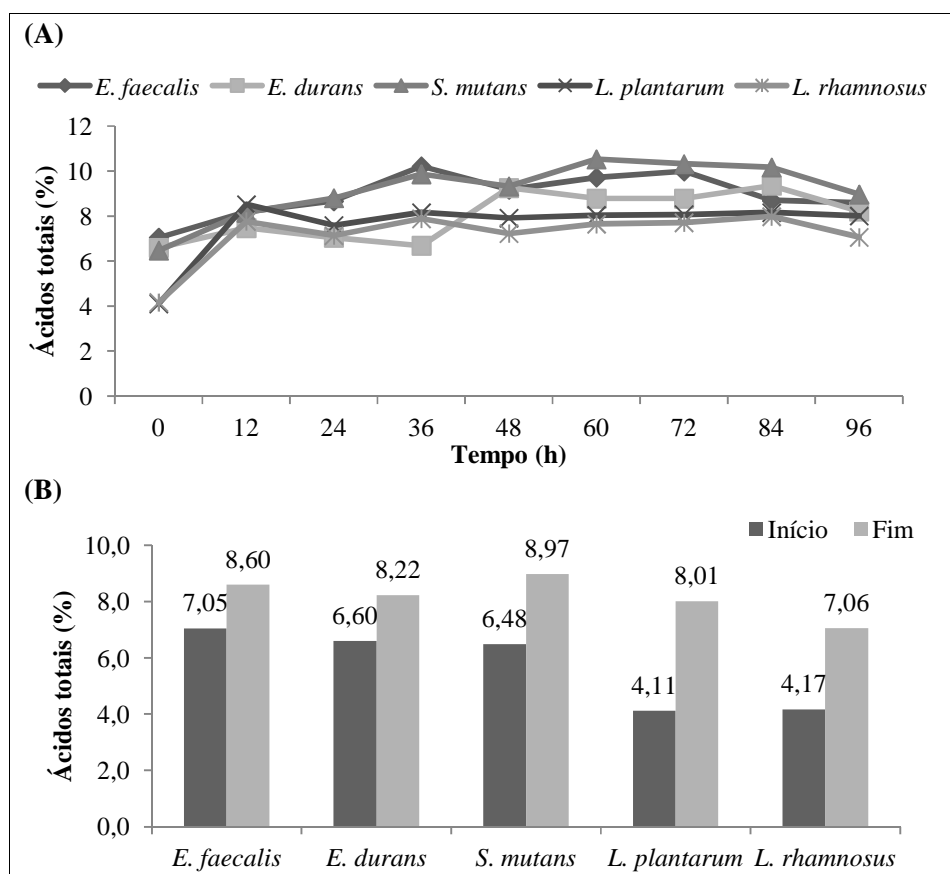


Figura 10 Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final em processo fermentativo (B) com meios não hidrolisados de batata com extrato de levedura

A adição do EL aumentou consideravelmente a produção de ácidos ao longo do processo fermentativo (Figura 10A), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de ácidos, quando utilizados espécies do gênero *Lactobacillus*. O microrganismo com maior produção de ácidos orgânicos nessas condições foi *L. plantarum* (cerca de 4 %), Figura 10B.

Ao comparar os meios não hidrolisados, é possível verificar que a adição de EL influenciou significativamente no desempenho dos microrganismos. O maior produtor de ácidos orgânicos foi *L. plantarum* seguido por *L. rhamnosus*, com 3,90 % e 2,90 %, respectivamente, em meios com de EL (Figura 10). Esses mesmos microrganismos produziram 1,26 % e 0,03 %, respectivamente, de ácidos orgânicos quando o meio não foi suplementado (Figura 9).

3.2.2 Meios de fermentação hidrolisados

A seguir, são apresentados os resultados das análises da fermentação utilizando BAL em meio de fermentação hidrolisados. Na Figura 11, mostra-se a variação do pH em meio de fermentação hidrolisado sem EL.

Os menores valores finais de pH foram observados para *E. faecalis*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, variando entre 3,11 e 3,33. Na fermentação utilizando *S. mutans* obteve-se a menor variação de pH, com valor final de 4,26, seguido de *E. durans*, com pH final de 3,75 (Figura 11).

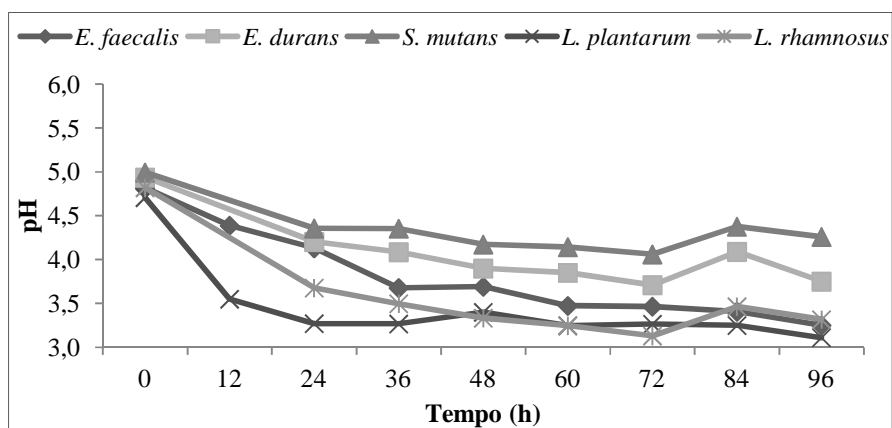


Figura 11 Variação do pH durante a fermentação de meio hidrolisado de batata sem extrato de levedura

Nos meios de fermentação hidrolisados e adicionados de EL (Figura 12), as maiores quedas de pH também ocorreram quando se utilizou *E. faecalis*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, sendo que o último atingiu valor final de 3,79. *E. durans* e *S. mutans* apresentaram maior pH final, de 4,41 e 4,33, respectivamente, sem diferença significativa entre si ($p < 0,05$). Com as demais espécies o pH final oscilou entre 3,79 e 3,9. Independentemente do microrganismo utilizado, o pH se estabilizou após 36 h de fermentação.

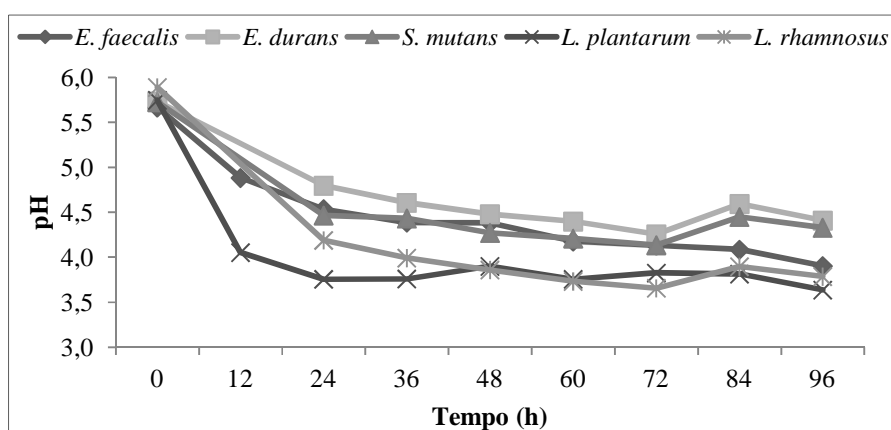


Figura 12 Variação do pH durante a fermentação de meio hidrolisado de batata com extrato de levedura

Na Figura 13, ilustra-se a acidez titulável em meios de fermentação hidrolisados e sem EL, possibilitando avaliar a cinética da produção de ácidos orgânicos totais (Figura 13A) e a concentração inicial e final desses ácidos (Figura 13B).

No decorrer da fermentação, as espécies do gênero *Lactobacillus* acompanhado por *E. faecalis* mostraram aumento gradativo na concentração de ácidos, enquanto que *E. durans* e *S. mutans* produziram pouco ácidos orgânicos (Figura 13A).

As maiores produções foram obtidas por *E. faecalis* (9,45 %), *L. plantarum* (9,36 %) e *L. rhamnosus* (7,95 %), que atingiram após 96 horas, acidez final de 12,24, 12,00 e 9,93 %, respectivamente (Figura 13B).

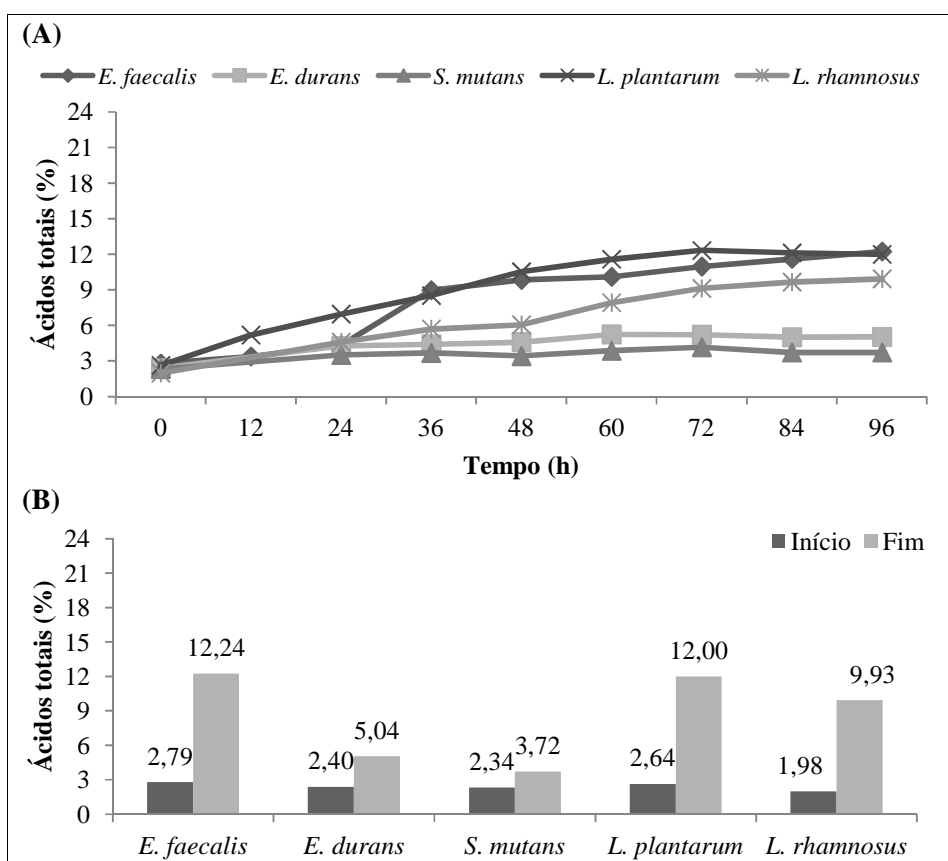


Figura 13 Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final em processo fermentativo (B) com meios hidrolisados de batata sem extrato de levedura

Na Figura 14, é apresentada a cinética da produção de ácidos orgânicos totais ao longo do processo fermentativo (Figura 14A) e a concentração inicial e final desses ácidos (Figura 14B) em meios fermentativos hidrolisados e enriquecidos com EL. Nessas condições, as maiores produções foram obtidas

por *L. rhamnosus* (15,63 %), *L. plantarum* (15,09 %), *E. faecalis* (10,56 %), Figura 14B. Comportamento diferente do apresentado nos meios hidrolisados sem EL (Figura 13B), onde *E. faecalis* obteve a maior produção (9,45 %), seguida por *L. plantarum* (9,36 %) e *L. rhamnosus* (7,95 %).

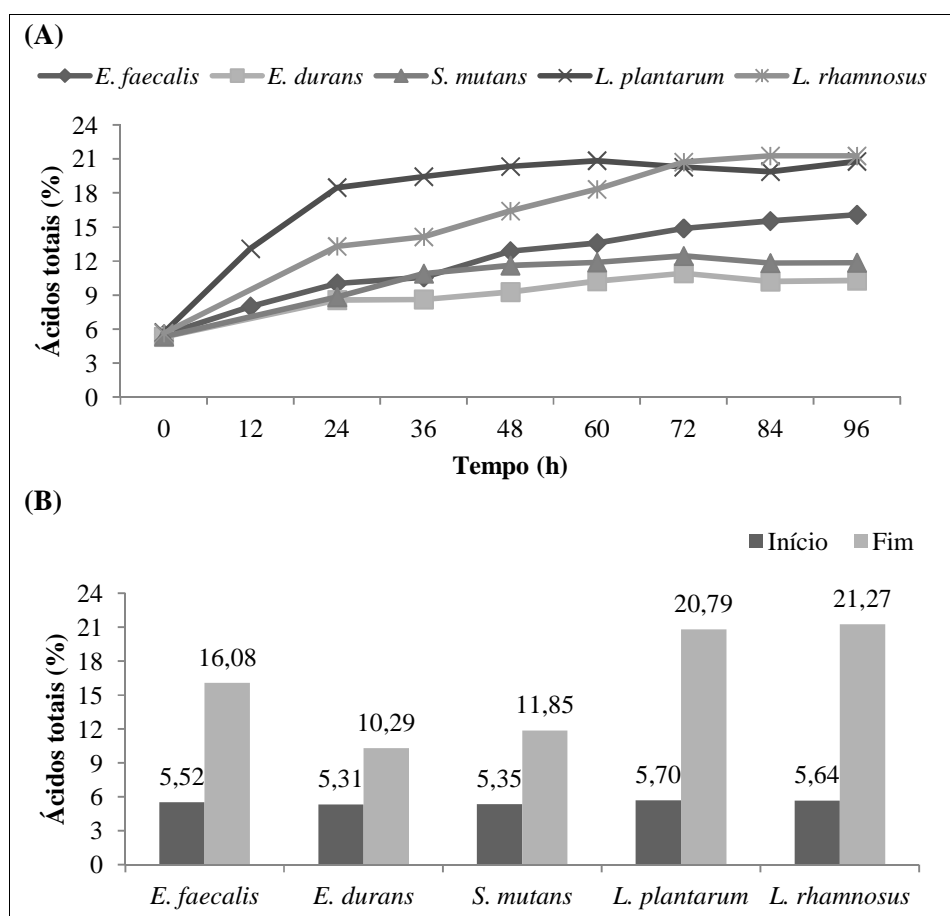


Figura 14 Cinética de produção dos ácidos orgânicos (A) e sua concentração inicial e final em processo fermentativo (B) com meios hidrolisados de batata com extrato de levedura

Conforme esperado, com o aumento de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo ocorreu a diminuição do pH do meio (Figuras 11 e 13; 12

e14). Independente da adição ou não do EL nos meios de fermentação (Figuras 13 e 14), a produção de ácidos estabilizou-se após 72 h e no meio sem EL (Figura 13) alguns microrganismos tiveram a produção estabilizada antes desse período. As Figuras 13 e 14 permitem afirmar ainda que a suplementação dos meios influenciou positivamente a produção de ácidos na fermentação

A produção de AL, pode ser diretamente influenciada pelo pH já que a atividade catalítica das enzimas e a atividade metabólica dos microrganismos dependem do pH intra e extra celular (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010; AXELSSON, 2004). Nesse contexto, vários fatores são relatados para melhorar a eficácia da produção de AL em processos fermentativos com bactérias lácticas, entre eles está o controle do pH.

Apesar das BAL suportarem baixos valores de pH no meio fermentativo (AXELSSON, 2004; MARTINEZ et al., 2013), muitos pesquisadores concluíram que o controle do pH no processo fermentativo pode aumentar, significativamente, a produção de ácido láctico (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; GUYOT; CALDERON; MORLON-GUYOT, 2000; MI-YOUNG et al., 2003; MOON; WEE; CHOI, 2012). Porém, alguns métodos de controle de pH, como a adição de agentes neutralizantes (CHEN et al., 2012; DJUKIĆ-VUKOVIĆ et al., 2012), podem afetar a produção de AL pelo aumento dos custos de purificação, causando consideráveis problemas ambientais (JOHN; NAMPOOTHIRI, 2008; MARTINEZ et al., 2013; YANG; LU; TSAO, 1995).

3.3 Produção de ácido láctico

As maiores produções de AL foram obtidas a partir de meios de cultura elaborados com polpa de batata hidrolisada, adicionados de EL e fermentados por *L. rhamnosus*, *plantarum* e *E. faecalis* (Figura 15), onde foram atingidos teores entre 5 e 8 g/L.

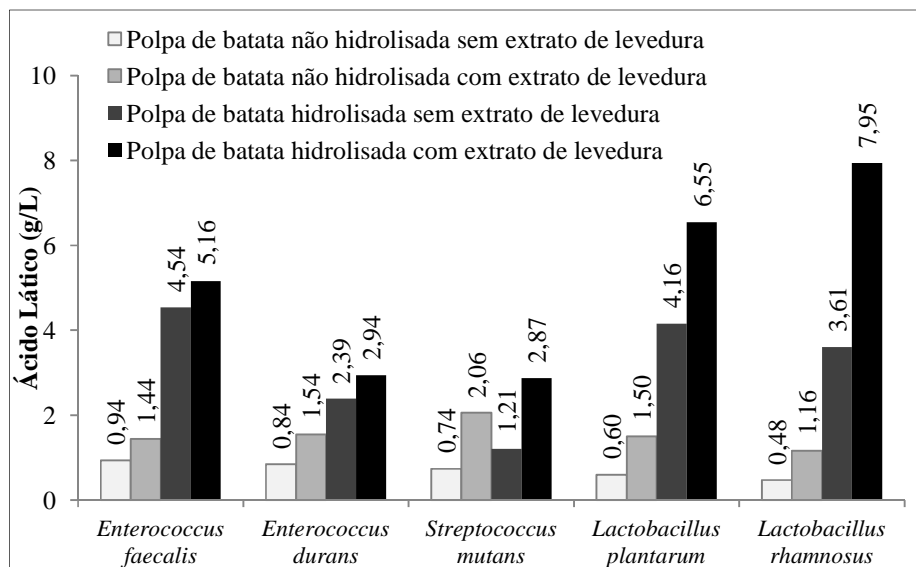


Figura 15 Produção de ácido láctico por bactérias lácticas em diferentes meios de fermentação de polpa de batata enriquecidos ou não com extrato de levedura

De acordo com as análises cromatográficas de quantificação de AL, determinou-se a produtividade após as 96 h de fermentação (Tabela 2).

Tabela 2 Produtividade de ácido láctico ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em meio fermentativo de polpa de batata hidrolisada ou não e adicionada ou não de extrato de levedura

Microrganismos	Polpa não hidrolisada		Polpa hidrolisada	
	Sem extrato	Com extrato	Sem extrato	Com extrato
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,01	0,01	0,05	0,05
<i>Enterococcus durans</i>	0,01	0,02	0,02	0,03
<i>Streptococcus mutans</i>	0,01	0,02	0,01	0,03
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,01	0,02	0,04	0,07
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,00	0,01	0,04	0,08

Os resultados obtidos neste trabalho elucidam a importância da suplementação do meio de batata com fonte de nitrogênio quando se visa à

maior produção de AL. Conforme a Figura 15, a adição de EL no meio de fermentação hidrolisado proporcionou o aumento de 3,6 para 7,95 g/L na produção de AL por *L. rhamnosus*. Segundo Mi-Young et al., (2003), o EL satisfaz as exigências nutricionais das BAL. Visto que esses microrganismos apresentam complexas exigências nutricionais para o seu desenvolvimento (REDDY et al., 2008), o enriquecimento exerce notadamente efeito positivo na produção de AL pelo aumento no consumo de AR, uma vez que é de conhecimento prévio que esses microrganismos obtêm energia por meio da fermentação de açúcares (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Vários autores já relataram a importância do enriquecimento do meio de fermentação com uma fonte de nitrogênio, quando se utilizam BAL no processo, independente do substrato empregado (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; NAVEENA et al., 2011; WEE et al., 2004). Oliveira et al. (2009) duplicaram a produção de AL ao enriquecer o meio de melaço de cana com 2 % de EL e Guilherme, Pinto e Rodrigues (2009) aumentaram a produção de 9,01g/L para 15,48 g/L de AL ao enriquecer o meio de fermentação de xarope de caju com 8 % de EL. Chauhan, Trivedi e Patel (2007) também enriqueceram o meio fermentativo com EL e observaram um aumento de 15,1 g/L de AL utilizando suco de tamareira.

3.4 Capacidade amilolítica das bactérias lácticas em meios com batata

A produção biotecnológica de AL ocorre principalmente pela fermentação de açúcares simples. Frequentemente empregam-se nesse processo matérias-primas ricas em amido que necessitam de um tratamento prévio de hidrólise enzimática para sua conversão em glicose e subsequente produção de AL (PING et al., 2005). Porém, a bioconversão de amido em AL pode ser realizada diretamente, dispensando a etapa de hidrólise do substrato, por meio da

utilização de bactérias amilolíticas. Essas bactérias são capazes de sintetizar enzimas responsáveis pela conversão do amido em açúcares fermentescíveis (REDDY et al., 2008), reduzindo, conseqüentemente, os custos do processo de fermentação.

Ao investigar a capacidade de conversão direta de amido em AL pelas espécies de BAL, observou-se que a produtividade máxima nos meios de polpa de batata não hidrolisada foi de $0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, com produção máxima de 2,06 g/L de AL pelo *S. mutans*, conforme apresentado anteriormente pela Tabela 2 e Figura 15, respectivamente.

Estudos anteriores apontam isolados amilolíticos do gênero *Lactobacillus*, com produção máxima de 4,2 g/L de AL em meio de fermentação de batata (XIAODONG; XUAN; RAKSHIT, 1997), o mesmo meio também foi utilizado por Shibata et al. (2007) ao produzirem 14,3 g/L de AL e produtividade de $0,545 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com espécie amilolítica do gênero *Enterococcus*. Portanto, com base nas produtividades de AL apresentadas neste estudo, observa-se que as espécies estudadas possuem baixo potencial para a produção direta de AL, a partir do amido de batata nas condições testadas.

Apesar de *L. rhamnosus* já ter sido relatada como amilolítica (BIELECKI et al., 2000), sabe-se que essa característica pode ser alterada conforme o substrato fermentativo e as condições de fermentação (REDDY et al., 2008; VISHNU et al., 1998). Bomrungnok et al. (2012), concluíram que *L. plantarum* SW14 tinha potencial para a produção de ácido láctico diretamente a partir do amido de mandioca, quando estudou a fermentação de modo contínuo com alta densidade celular e elevada taxa de diluição, observando produtividade de ácido láctico de $8,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Mesmo utilizando um produto amiláceo como substrato fermentativo, as condições de fermentação apresentadas pelos autores diferem daquelas utilizadas neste estudo, principalmente no modo de fermentação, já que o presente estudo utilizou a batelada simples.

3.5 Seleção da espécie com maior produção de ácido lático

Dentre as espécies investigadas, aquelas do gênero *Lactobacillus* apresentaram as maiores produções de AL nas condições testadas, 6,6 e 7,9 g/L. Uma vez que esses valores mostraram não haver diferença significativa entre si ($p>0,05$), é importante levar em consideração algumas características metabólicas dessas espécies, para então selecionar a melhor.

Apesar de ambas serem relatadas com metabolismo hetero e homofermentativo, *L. rhamnosus* possui vantagem significativa de produzir apenas isômeros opticamente puros de L(+) ácido lático, enquanto que *L. plantarum* produz tanto esse isômero como sua mistura racêmica, o DL-ácido lático (BERRY et al., 1999; AXELSSON, 2004). Conscientes da crescente demanda de L(+) ácido lático no mercado de biopolímeros (BRITO et al., 2011; DATTA; HENRY, 2006; GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC, 2011), *L. rhamnosus* trata-se de uma potencial espécie a ser utilizada para a produção de L(+) ácido lático.

3.6 Viabilidade celular

Os inóculos iniciais foram da ordem de 10^8 e 10^9 UFC.mL⁻¹. Após sua adição ao meio de fermentação, estes atingiram contagem entre 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹ em sua maioria (Tabela 3).

Embora os meios de fermentação tenham atingido baixos valores de pH e elevada acidez ao longo do processo fermentativo, esses fatores pouco influenciaram na redução da viabilidade celular final dos meios fermentativos, visto que, na maioria dos casos, a contagem de células manteve-se na ordem de 10^7 e 10^8 UFC.ml⁻¹ ao final do processo, independente do meio utilizado. Tal ocorrência se deve a alta tolerância das bactérias lácticas em condições ácidas,

pH<5 (MARTINEZ et al., 2013), conferindo, assim, uma vantagem significativa em relação aos demais microrganismos.

Tabela 3 Contagem de células na fermentação de batata hidrolisada ou não e adicionada ou não de extrato de levedura (EL)

Microrganismos	Meio de cultivo		Tempo inicial (0h)	Tempo final (96h)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Não hidrolisado	Sem EL	$1,1 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$
		Com EL	$1,2 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
	Hidrolisado	Sem EL	$4,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$
		Com EL	$5,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
<i>Enterococcus durans</i>	Não hidrolisado	Sem EL	$5,4 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$
		Com EL	$4,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$
	Hidrolisado	Sem EL	$2,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$
		Com EL	$8,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
<i>Streptococcus mutans</i>	Não hidrolisado	Sem EL	$1,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
		Com EL	$4,9 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$
	Hidrolisado	Sem EL	$2,3 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
		Com EL	$1,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Não hidrolisado	Sem EL	$3,8 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
		Com EL	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
	Hidrolisado	Sem EL	$1,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
		Com EL	$1,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Não hidrolisado	Sem EL	$2,6 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
		Com EL	$8,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^8$
	Hidrolisado	Sem EL	$9,0 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$
		Com EL	$1,0 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$

Espécies do gênero *Lactobacillus* são notáveis por possuírem considerável resistência a baixos valores de pH (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Essa característica de resistência ao pH foi confirmada ao verificar a viabilidade celular mantida por *L. plantarum* e *rhamnosus* quando

expostas a um meio mais ácido que as demais bactérias estudadas, em razão da maior quantidade de ácidos por elas produzidos. O uso de espécies que toleram baixo pH é importante, pois minimizam o uso de agentes tamponantes, reduzindo, assim, os custos e os problemas de poluição, além de facilitar os processos de recuperação do ácido láctico (JOHN; NAMPOOTHIRI, 2008).

4 CONCLUSÃO

Considerando os aspectos de maior produtividade de AL e as características metabólicas das espécies aqui estudadas, conclui-se que *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 trata-se de uma potencial espécie a ser utilizada em meios fermentativos com polpa de batata hidrolisada e enriquecida com 5 % de extrato de levedura. Essa espécie possui ainda a vantagem de produzir isômeros opticamente puros de L(+) ácido lático. A concentração final de ácido lático produzida foi de 7,95 g/L com produtividade de 0,08 g.L⁻¹.h⁻¹ após 96 h de fermentação a 37 °C sem agitação.

Quanto à condição amilolítica das bactérias lácticas, conclui-se que as diferentes linhagens investigadas não possuem potencial para a produção direta de ácido lático, a partir do amido de batata, nas condições testadas, uma vez que a concentração de ácido lático obtida foi muito baixa (menor que 2 g/L).

REFERÊNCIAS

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, Nov. 2013.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19. th. ed. Chicago: Pharmabooks, 2012.

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

BERRY, A. R. et al. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 163–167, Feb. 1999.

BIELECKI, S. et al. Degradation of raw potato starch by an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum* C. **Progress in Biotechnology, Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 17, p. 187–192, 2000.

BOMRUNGNOK, W. et al. Single step lactic acid production from cassava starch by *Lactobacillus plantarum* SW14 in conventional continuous and continuous with high cell density. **APCBEE Procedia**, Bangkok, v. 2, p. 97–103, Apr. 2012.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Santa Catarina, v. 2, p. 127–139, 2011.

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, Jan. 2007.

CHEN, L. et al. A novel process for recovery and refining of L-lactic acid from fermentation broth. **Bioresource Technology**, Essex, v. 112, p. 280–284, May 2012.

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, July 2006.

DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. P. et al. Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage. **Food Chemistry**, London, v. 134, n. 2, p. 1038–1043, Sept. 2012.

EVANGELISTA, R. M. et al. Qualidade nutricional e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 953–960, ago. 2011.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC. Lactic Acid: global strategic business report. **Research and Markets The World's Largest Market Research Store**, Taylors Lane, Apr. 2011. Disponível em: <http://www.researchandmarkets.com/research/pkzwkxk/lactic_acid>. Acesso em: 15 jul. 2013.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 738–747, dez. 2009.

GUYOT, J. P.; CALDERON, M.; MORLON-GUYOT, J. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 176–182, Jan. 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, Feb. 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3105–3109, Dec. 2008.

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, Mar. 2013.

MI-YOUNG, H. et al. Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor / glucose medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 96, n. 2, p. 134–140, 2003.

MOON, S.; WEE, Y.; CHOI, G. 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.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. (Ed.). **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**. Ames: Blackwell, 2010.

NAVEENA, B. J. et al. Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract: optimization by RSM. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 2, p. 465–472, Feb. 2011.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, n. 2, p. 375–380, May 1944.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTOS. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2. ed. Campinas: NEPA, 2006.

OLIVEIRA, R. F. et al. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melão da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, p. 34–40, June 2009.

PAVLAK, M. C. M.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 82-86, 2011.

PING, L. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 265–276, 2005.

PLATA-OVIEDO, M. S. **Secagem do amido fermentado de mandioca: modificação química relacionada com propriedade de expansão e características físico-químicas**. 1998. 114 p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

- REDDY, G. et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 22–34, Jan./Feb. 2008.
- SHIBATA, K. et al. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 1-2, p. 149–155, July 2007.
- TEBALDI, V. M. R. et al. Avaliação microbiológica de bebidas lácteas fermentadas adquiridas no comércio varejista do sul de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1085–1088, jul./ago. 2007.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **National nutrient database for standard reference, release 24**. [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR24/reports/sr24fg11.pdf>>. Acesso em: 7 maio 2012.
- VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 245–264, 2008.
- VISHNU, C. et al. Amylolytic bacteria producing lactic acid. **Journal Of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 57, n. 10, p. 600-603, 1998.
- XIAODONG, W.; XUAN, G.; RAKSHIT, S. K. Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 19, n. 9, p. 841–843, 1997.
- WEE, Y.-J. et al. Utilization of sugar molasses for economical L(+) lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 35, n. 6-7, p. 568–573, Dec. 2004.
- ZAMBOLIM, L. **Produção integrada da batata**. Viçosa: Editora da UFV, 2011.
- YANG, C. W.; LU, Z.; TSAO, G. T. Lactic acid production by Pellet-Form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Clifton, v. 51-52, p. 55-71, 1995.

CAPITULO 3 Influência da composição do meio de fermentação na produção de L(+) ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*

RESUMO

O ácido láctico (AL) é um ácido orgânico amplamente utilizado nas indústrias alimentícias e biopoliméricas. O isômero L(+) ácido láctico é a principal matéria-prima na produção de polímeros biodegradáveis e sua pureza óptica é determinante para características do polímero a ser produzido. As bactérias do ácido láctico (BAL) são amplamente utilizadas na produção em escala industrial de AL sendo o gênero *Lactobacillus* o mais utilizado em virtude da alta tolerância ácida. Muitos fatores na produção de AL podem aumentar significativamente os custos de produção e o uso de excedentes agrícolas, como a batata, pode ser uma medida viável para a redução dos custos. O enriquecimento do meio de fermentação pode aumentar a produtividade do ácido de interesse, uma vez que as BAL costumam apresentar complexas exigências nutricionais para o seu desenvolvimento. Nesse contexto, no presente estudo, objetivou-se aumentar a produção de L(+) ácido láctico utilizando *Lb. rhamnosus* em meios com polpa de batata hidrolisada, enriquecido com extrato de levedura (EL). A produção máxima de L(+) ácido láctico (25 g/L) foi obtida em meio de fermentação com 35 % (v/v) de polpa de batata hidrolisada e 8 % (m/v) de EL. Verificou-se ainda que o microrganismo aumentou em média de 1 ciclo logarítmico (de 10^7 para 10^8 UFC.mL⁻¹) ao longo da fermentação. As metodologias utilizadas para análise quantitativa (CLAE) e qualitativa (testes enzimáticos) mostraram-se satisfatórias para a determinação da produção de AL e do isômero produzido e a metodologia de superfície de resposta associada ao planejamento experimental fatorial também mostrou ser um método eficaz para a otimização do processo. Conforme a análise de validação, o modelo pode ser validado com desvio relativo médio próximo a 10 %.

Palavras-chave: Teste enzimático. DCCR. CLAE. Ácido láctico.

ABSTRACT

Lactic acid (LA) is an organic acid widely used in food and biopolymer industries. The L(+) lactic acid isomer is the main raw material in the production of biodegradable polymers and its optical purity is crucial to characteristics of the polymer to be produced. The lactic acid bacteria (LAB) are widely used in industrial scale production of LA, with the *Lactobacillus* genus being the most used due to the high acid tolerance. Many factors in the production of LA may significantly increase production costs, and the use of agricultural surpluses, such as potatoes, may be a viable measure to reduce costs. The enrichment of the fermentation medium may increase the productivity of the acid of interest, since the LAB usually present complex nutritional requirements for its development. In this context, the present study aimed at increasing the production of L(+) lactic acid using *Lb. rhamnosus* on medium containing potato pulp hydrolyzed enriched with yeast extract (YE). The maximum production of L(+) lactic acid (25 g/L) acid was obtained in fermentation medium with 35 % (v/v) hydrolyzed potato pulp and 8 % (w/v) YE. We also verified that the organism grew an average of 1 log cycle (from 10^7 to 10^8 UFC.mL⁻¹) throughout the fermentation. The methodologies used for quantitative (HPLC) and qualitative (enzymatic assays) analysis were satisfactory for determining LA and isomer production, and the surface response methodology associated with the factorial design also proved to be an effective method for optimizing the process. According to the validation analysis, the model can be validated with an average relative deviation close to 10 %.

Keywords: Enzyme assay, HPLC, RCCD, Lactic acid

1 INTRODUÇÃO

O ácido láctico (AL) é um ácido orgânico produzido por síntese química ou por fermentação, amplamente utilizado nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis, biopoliméricas e outras. Existente em duas formas enantioméricas e também em mistura racêmica, o ácido 2-hidroxiopropanóico como também é denominado, tem seu comportamento químico determinado pelas suas propriedades físico-químicas. O L(+) ácido láctico é a principal matéria-prima na produção de polímeros biodegradáveis e sua pureza ótica é determinante para características do polímero a ser produzido. É importante ressaltar ainda que o uso desse ácido na indústria de biopolímeros vem ganhando grande atenção nos últimos anos.

As bactérias do ácido láctico (BAL) são amplamente utilizadas na produção em escala industrial de ácido láctico, pois dentre outras vantagens, a maioria desses microrganismos não oferecem riscos à saúde dos consumidores e trabalhadores do processo. Entre os gêneros que fazem parte desse grupo de bactérias, *Lactobacillus* é o mais utilizado em virtude da sua alta tolerância ácida e produção seletiva dos isômeros de ácido láctico.

Em virtude da crescente preocupação da sociedade com questões ambientais, inúmeros estudos visam atualmente ao emprego de recursos renováveis e excedentes agrícolas como fontes de carbono na produção de ácido láctico por BAL. O Brasil possui vantagens competitivas em relação à produção dos biopolímeros, pela sua capacidade de cultivo das matérias-primas utilizadas na produção desses bioplásticos. Nesse contexto, a utilização de batata como substrato de fermentação é uma atraente alternativa, uma vez que o estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional dessa cultura e grande parte da sua produção é descartada anualmente em virtude das muitas exigências feitas por parte dos consumidores em relação à aparência externa do tubérculo.

A matéria-prima tem grande impacto nos custos de produção do ácido láctico por fermentação e o uso de excedentes agrícolas, como a batata, pode ser uma medida viável para a redução dos custos. O enriquecimento do meio de fermentação com fonte de nitrogênio pode aumentar a produtividade do ácido de interesse, uma vez que as bactérias lácticas costumam apresentar complexas exigências nutricionais para o seu desenvolvimento.

Atualmente, diversos métodos são utilizados para análises quantitativas e qualitativas do ácido láctico, entre elas estão a análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e testes enzimáticos, respectivamente. O uso de metodologia de superfície de resposta também é amplamente utilizado na otimização de processos fermentativos. Conduziu-se o presente estudo, com o objetivo de aumentar a produção de L(+) ácido láctico utilizando *L. rhamnosus* em meios com polpa de batata hidrolisada enriquecido com extrato de levedura, utilizando métodos qualitativos e quantitativos para a determinação da produção de ácido láctico e do isômero produzido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Produtos vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos situado na Universidade Federal de Lavras/MG.

2.1 Obtenção e manutenção do microrganismo

Neste estudo foi utilizado *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595) cedido pela Fundação Oswaldo Cruz – FioCruz (Rio de Janeiro/RJ). Sua ativação e propagação se deram conforme descrito anteriormente (Capítulo 2, Item 2.1.1).

2.1.1 Preparo do inóculo da fermentação

Baseado na correlação entre a absorbância e número de células viáveis, previamente estabelecida por meio das curvas de crescimento (APÊNDICE A), foi possível determinar o valor de absorbância correspondente a uma contagem de células entre 10^8 e 10^9 UFC.mL⁻¹. Uma vez conhecida a quantidade de inóculo a ser transferido para o meio de fermentação, determinou-se o volume do inóculo de 1 %.

Para o preparo do inóculo, um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS estéril foi adicionado de 10 % da cultura estoque (1 mL) e mantido em estufa BOD a 37 °C/24 h. Posteriormente, um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo MRS estéril foi adicionado de 10 % (v/v) do inóculo anterior (10 mL) e mantido a 37 °C. Após 12 h, foi conferido o valor de absorbância do inóculo e foi transferido de 1 % (v/v) do inóculo para erlenmeyer contendo 200 mL de meio de fermentação.

2.2 Preparo dos meios de fermentação

Batatas da espécie *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, cultivar Ágata, foram adquiridas no comércio local do município de Lavras/MG. O preparo da polpa seguiu conforme descrito anteriormente (Capítulo 2, Item 2.2.1).

Para a obtenção do hidrolisado, a polpa de batata descongelada foi homogeneizada em água destilada à razão correspondente ao planejamento experimental (Tabela 1). A mistura foi submetida à hidrólise enzimática do amido, conforme descrito anteriormente (Capítulo 2, Item 2.2.3). Concluída a etapa de hidrólise, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e o pH ajustado para a faixa ótima de atuação da BAL, entre 5 e 7 (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008). As enzimas utilizadas no processo de hidrólise foram doadas pela empresa Romerlabs.

Tabela 1 Níveis e fatores do delineamento composto central rotacional (DCCR) para produção de L(+) ácido láctico

Variável	Código	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato de levedura (% m/v)	X ₁	2	3	5	7	8
Polpa de batata (% v/v)	X ₂	28	30	35	40	42

Por fim, o mosto foi acrescido de extrato de levedura (EL) em quantidades determinadas pelo planejamento experimental (Tabela 1), homogeneizado e esterilizado (121 °C/15 min). Após o arrefecimento do meio de fermentação, o inóculo foi adicionado (1% v/v). As fermentações foram conduzidas em erlenmeyer vedados com algodão e mantidos em estufas BOD sem agitação a 37 °C por 72 h.

2.3 Delineamento composto central rotacional

Segundo Rodrigues e Iemma (2009), quando se tem, no mínimo, duas variáveis independentes, recomenda-se como estratégia experimental o uso de delineamento composto central rotacional, o DCCR. Assim, neste trabalho, optou-se pela utilização do planejamento DCCR, realizado conforme o fatorial completo 2^2 , com 4 ensaios nas condições axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios. Os dados foram tratados com o auxílio do software STATISTICA v.8.0. As duas variáveis independentes foram: concentração de extrato de levedura (X_1) e proporção de polpa de batata em água (X_2) e as variáveis respostas foram: produção de ácidos totais, consumo de açúcares redutores e produção e rendimento de AL. Logo, o cultivo de *L. rhamnosus* visando à produção de L(+) ácido lático foi realizado em meio hidrolisado de polpa de batata, variando a concentração de substrato e do EL.

Para o estudo cinético da fermentação, a cada 12 h foram retiradas, assepticamente, amostras de aproximadamente 15 mL, até totalizar 72 h. Essas amostras foram centrifugadas (2260 g/30 min) e o sobrenadante armazenado em condições de congelamento (-5 °C) para então serem submetidos a análises de pH, acidez titulável (ácidos totais), açúcares redutores e produção de AL.

2.4 Metodologia analítica

Todas as análises realizadas neste experimento foram executadas em triplicata, e seus resultados expressam a média desses valores.

2.4.1 Caracterização da matéria-prima

Para a caracterização da matéria-prima, foram empregadas metodologias da AOAC International (2012) e do Instituto Adolfo Lutz (2008), conforme descrito anteriormente (Capítulo 2, Item 2.4.1).

2.4.2 Determinação do pH e Acidez

Os valores de pH de acidez foram determinados conforme descrito anteriormente (Capítulo 2, Item 2.4.2). Para a titulação das amostras utilizou-se solução de NaOH 0,1 M.

2.4.3 Determinação dos açúcares redutores no mosto

Mediante testes realizados previamente, verificou-se que a adição do EL no meio de fermentação afetava diretamente a cor das amostras e, conseqüentemente, a leitura espectrofotométrica, essencial para a determinação de açúcares redutores (AR) pelo método de Miller (1959). Logo, foi necessária uma etapa de desproteinização da amostra.

A etapa de desproteinização consistiu na mistura de 3 mL de amostra, 9 mL de água destilada, 1,2 mL hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) 0,3 N e 1,2 mL de sulfato de zinco (ZnSO_4) 5 %. Posteriormente, foi realizada uma filtração dessa mistura em papel filtro, e a amostra desproteinizada foi, então, utilizada para determinar a concentração de AR, seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), utilizando-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Esse procedimento foi feito pela adição de 1 mL de reagente DNS (10,6g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8 g de NaOH, 1416 mL de água destilada, 7,6mL de fenol e 8,3 g de metabissulfito de sódio) à 1 mL de amostra desproteinizada. Após a adição do reagente DNS, este foi levado em banho-maria (ebulição) por 5 min e resfriado em banho de gelo. Em sequência, foram adicionados 16 mL de solução de tartarato duplo de sódio de potássio (15,1 g de tartarato duplo de Na e $\text{K}_4(\text{H}_2\text{O})$ em balão volumétrico de 1 litro, completou-se o volume com água destilada) e feita a leitura em espectrofotômetro (FEMTO 700 S Soft., Brasil) com comprimento de onda de 540 nm (DO_{540}). Os valores da

absorbância foram expressos em g/L comparando-se com a curva padrão de glicose (APENDICE C).

2.4.4 Análises quantitativas e qualitativas de ácido láctico

As análises descritas a seguir, foram realizadas em triplicata e apenas no tempo final da fermentação.

O AL foi identificado e quantificado por CLAE, em cromatógrafo (Shimadzu), com detector condutividade (CDD-6A), polaridade +, utilizando 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 Bis-Tris, 4 mM ácido p-tolueno sulfônico e 100 µM EDTA; com fluxo: de 0,8 mL/min. O volume injetado da amostra foi de 20 µL e a temperatura de injeção 45 °C. As amostras foram centrifugadas, filtradas (filtros de seringa de 0,22 µm de porosidade e 25mm de diâmetro) e diluídas com água deionizada antes da injeção no cromatógrafo. Os picos correspondentes ao AL foram identificados pelo tempo de retenção, utilizando-se como comparação os tempos de retenção do padrão, e a quantificação feita conforme a curva de calibração do padrão (APENDICE B).

A análise qualitativa para a determinação do isômero óptico produzido foi obtida mediante reações do kit enzimático K-LATE (Megazyme[®], Wicklow, Irlanda), específico para o ácido L(+) láctico, com 98 % de confiança. Os procedimentos foram executados manualmente, conforme as instruções do fabricante.

O kit baseia-se no seguinte princípio: A quantificação de ácido L(+) láctico requer duas reações enzimáticas. Na primeira reação, o ácido L(+) láctico (L-lactato), catalisado pela L-lactato desidrogenase (L-LDH), é oxidado a piruvato por Dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). No entanto, visto

que o equilíbrio dessa reação encontra-se firmemente em favor do ácido L(+) láctico e de NAD⁺, uma próxima reação é necessária para “capturar” o piruvato. Isso é obtido pela conversão do piruvato para a D-alanina e 2-oxoglutarato, com a enzima D-transaminase de glutamato-piruvato (D-GPT), na presença de um excesso de D-glutamato. A quantidade de NADH produzida nessa reação é associada estequiometricamente com a quantidade de L(+) láctico ácido, sendo o NADH medido pelo aumento na absorbância a 340 nm.

2.4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação

O processo fermentativo foi analisado quanto aos parâmetros de consumo de AR (Equação 1), rendimento (Equação 2) e produtividade (Equação 3, descrito no Capítulo 2, Item 2.4.4) de ácido láctico (OLIVEIRA et al., 2009).

$$\text{Consumo de AR (\%)} = (\text{AR consumido (g.L)} / \text{AR inicial (g.L)}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{Ácido Láctico (g.L)} / \text{AR consumido (g.L)}) \times 100 \quad (2)$$

2.4.6 Contagem de bactérias lácticas por plaqueamento

Para a análise de viabilidade celular, foram retiradas amostras a cada 24 h e a contagem de colônias viáveis foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade ou "pour plate", conforme já descrito (Capítulo 2, Item 2.4.5).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da polpa de batata

Os resultados das análises físico-químicas da polpa de batata utilizada para formulação dos meios de fermentação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Caracterização química da polpa de batata*

Parâmetros (%)	1° Lote	2° Lote
Amido	8,17	8,63
Cinzas	0,72	0,77
Fibra	0,6	0,72
Lipídeos	0,14	0,12
Proteína	2,25	2,33
Umidade	85,65	85,29

* O 1° lote refere-se às análises da polpa de batata realizadas na primeira parte deste experimento (Capítulo 2, Item 3.1) e o 2° lote refere-se às análises feitas na polpa de batata utilizada para a segunda parte do experimento, o planejamento.

Os valores encontrados neste lote de matéria-prima se aproximam daqueles encontrados anteriormente (Capítulo 2, Item 3.1), como mostra a Tabela 2. Algumas variações podem ocorrer em decorrência da diferença nas práticas de cultivo, adotadas no manejo da cultura (EVANGELISTA et al., 2011) ou diferenças na época de plantio (ZAMBOLIM, 2011). Os valores entre o primeiro e segundo lote de polpa de batata não diferenciaram estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância.

3.2 Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR

Os resultados do obtidos pelo DCCR são apresentados e discutidos a seguir.

3.2.1 Contagem de células e viabilidade celular

A contagem de células totais durante o processo de fermentação é apresentada na Figura 1. Todos os ensaios foram adicionados de inóculos com concentração celular inicial entre 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹, porém após sua diluição no meio de fermentação, essa concentração foi reduzida.

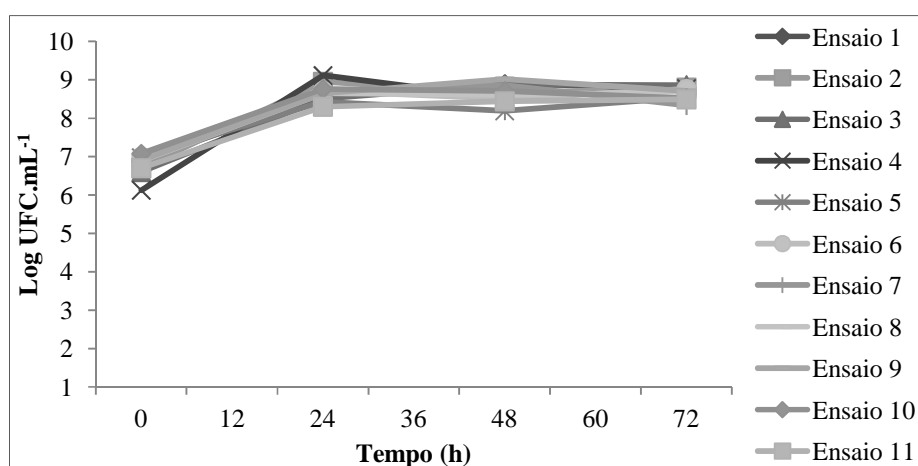


Figura 1 Variação da concentração total de células durante a fermentação

Nas primeiras 24 h de fermentação, observa-se um crescimento padrão do microrganismo em todos os ensaios, indicando que a espécie estava adaptada ao meio de fermentação e com boa atividade metabólica. Isso ocorre, pela concentração de produtos resultante do metabolismo ser mais baixa no período inicial da fermentação (GONÇALVES et al., 1997) e é também quando há uma maior oferta de nutriente das mesmas.

A redução do pH no meio fermentativo, após as primeiras 12 h de fermentação (Figura 2), sugere o aumento de ácidos no meio, provocando, conseqüentemente, a estabilização do crescimento após esse período. Tal ocorrência pode referir-se a um efeito de toxicidade do AL, agora presente no

meio em grandes quantidades, aumentando, assim, a fase de latência do microrganismo (YÁÑEZ et al., 2008). Não foi possível perceber a fase de morte da bactéria durante o período da fermentação.

3.2.2 pH e acidez

O pH inicial de todos os meios fermentativos testados estavam dentro da faixa ótima de atuação do microrganismo, entre 5 e 7 (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008), como mostra a Figura 2.

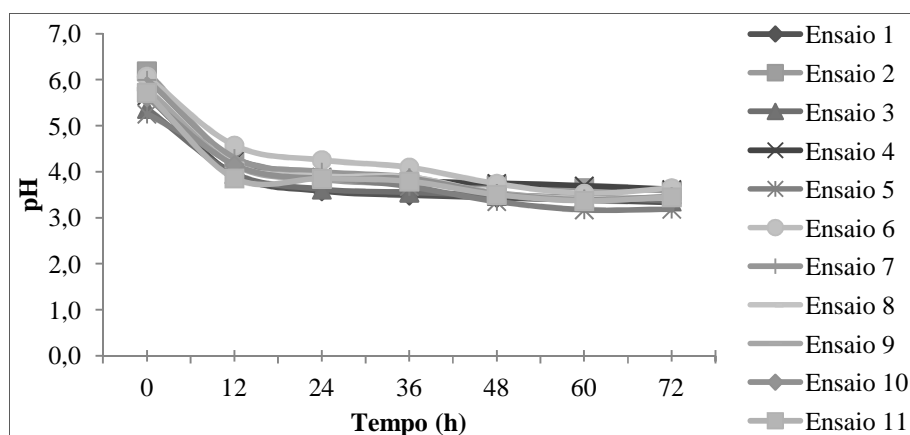


Figura 2 Cinética do pH durante a fermentação com *L. rhamnosus*, conforme o planejamento experimental

Em todos os meios testados ao longo do processo fermentativo, a maior redução de pH se deu nas 12 primeiras horas e a estabilização ocorreu progressivamente após esse período. Isso ocorre, em razão da baixa concentração de ácidos existente nessa fase da fermentação (GONÇALVES et al., 1997). O pH final dos meios fermentativos situou-se entre 3 e 4.

O estresse ácido faz parte do ciclo de vida das BAL, em virtude da sua capacidade de fermentar glicose em AL. Porém, a redução do pH ocasionada

pela produção de ácidos pode reduzir a produção do ácido de interesse. Essa diminuição em condições de elevada acidez pode não estar associada somente à inibição do metabolismo celular, mas também à redução do número de células sem interferir necessariamente no metabolismo da célula (YÁÑEZ et al., 2008).

Na Tabela 3, encontram-se os resultados de produção de ácidos totais para cada ensaio realizado. Após 72 h de fermentação, a maior produção de ácidos totais ocorreu no ensaio 6 (25,8 g/L) que apresentava 35 % de polpa de batata e a maior concentração de EL (8 %) dentre os demais ensaios. Os ensaios 2 e 4 também mostraram alta produção de ácidos (24,60 g/L) e ambos foram adicionados de 7 % de EL, variando apenas a concentração de substrato empregada, 30 e 40 % de substrato, respectivamente.

Tabela 3 Produção de ácidos totais variando as concentrações de extrato de levedura e de polpa de batata, conforme o planejamento experimental

Ensaio	Concentração de extrato de levedura (% m/v)	Concentração de polpa de batata (% v/v)	Produção de ácidos totais (g/L)
1	3	30	17,70
2	7	30	24,60
3	3	40	18,30
4	7	40	24,60
5	2	35	16,20
6	8	35	25,80
7	5	28	20,55
8	5	42	22,50
9	5	35	21,60
10	5	35	19,80
11	5	35	21,15

A identificação dos parâmetros significativos foi realizada por meio de análises estatísticas. Pela Tabela 4, de coeficientes de regressão, permite-se afirmar que apenas o termo linear do EL apresentou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para o aumento da produção de ácidos orgânicos totais.

Tabela 4 Coeficientes de regressão para produção de ácidos totais

Fonte de variação	Regressão	Erro Padrão	p-valor
<i>Média/Interação</i>	20,850	0,397	0,000
(1) Extrato de levedura (% m/v) (L)	3,352	0,243	0,000
Extrato de levedura (% m/v) (Q)	0,084	0,291	0,783
(2) Polpa de batata (% v/v) (L)	0,420	0,243	0,145
Polpa de batata (% v/v) (Q)	0,348	0,291	0,284
1L por 2L	-0,150	0,344	0,681

A partir desses resultados, foi originada análise de variância (ANAVA). Onde é possível observar que o F_{calc} da regressão (38,8) é maior que o tabelado, a 5 % de significância, sendo, portanto o ajuste da regressão bom (Tabela 5).

Tabela 5 Análise de variância para produção de ácidos totais

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F_{calc}	$F_{\text{tab}}(5\%)$
Regressão	91,797	5	18,359	38,835	5,050
Erro	2,363	5	0,472		
Total SS	94,160	10			$r^2: 0,98$

^{SQ} Soma dos quadrados; ^{gl} Graus de liberdade; ^{QM} Quadrado médio.

O modelo ajustado ($r^2: 0,98$) em variáveis codificadas é representado pela Equação 3, onde PAC é produção de ácidos totais.

$$\text{PAC} = 20,85 + 3,352 * x_1 + 0,084 * x_1^2 + 0,42 * x_2 + 0,348 * x_2^2 - 0,15 * x_1 * x_2 \quad (3)$$

Os efeitos das variáveis independentes e das suas interações na formação dos ácidos podem ser visualizados por meio da análise das superfícies de resposta (Figura 3), construídas a partir da Equação 3.

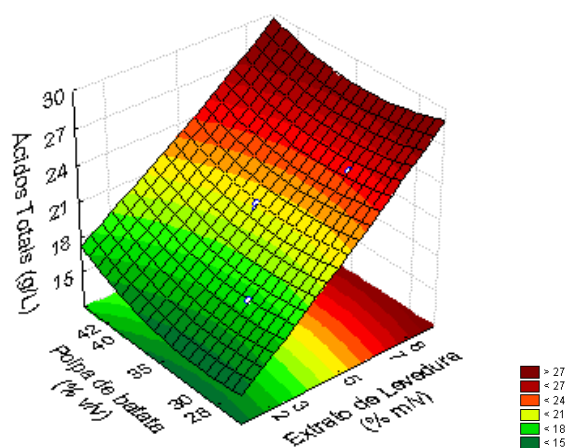


Figura 3 Superfície de resposta para a produção de ácidos totais como uma função das variáveis: concentração de polpa de batata e de extrato de levedura

A produção máxima de ácidos se deu na maior concentração de extrato de levedura (8 %). Na Figura 3, fica evidente o efeito não significativo da porcentagem de polpa de batata sobre a produção de ácidos.

3.2.3 Consumo de açúcares redutores

Durante as 72 h de fermentação, o consumo de AR demonstrou comportamento semelhante entre os ensaios (Figura 4). Variando de 29,88 g/L a 18,75 g/L, e a quantidade média no meio de fermentação ao final do processo foi de 14,14 g/L. O ensaio 6 apresentou a menor quantidade final de AR (7,65 g/L).

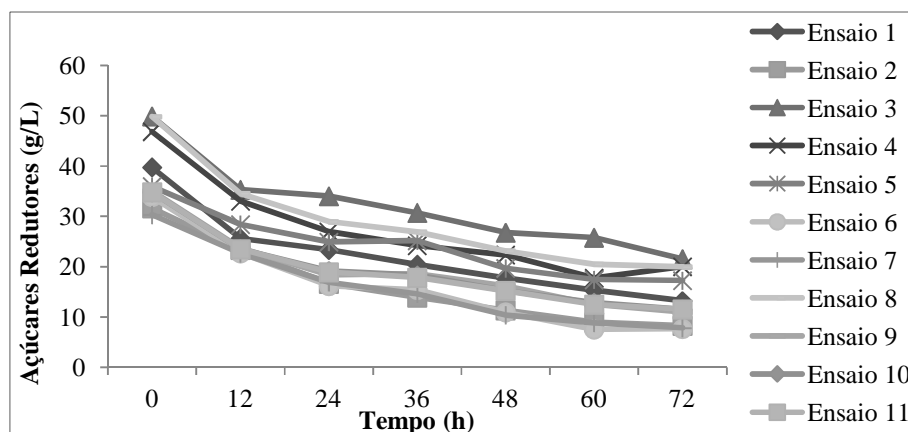


Figura 4 Cinética do consumo de açúcares redutores durante a fermentação com *L. rhamnosus*, conforme planejamento experimental

Ao final do processo fermentativo, o maior consumo de AR se deu nos ensaios 8 (29,88 g/L) e 3 (28,36 g/L) e apesar destes apresentarem maior concentração de polpa de batata no meio, essa característica não se mostrou estatisticamente significativa ($p > 0,05$), Tabela 6.

Tabela 6 Coeficientes de regressão para o consumo de açúcares redutores

Fonte de variação	Regressão	Erro Padrão	p-valor
<i>Média/Interação</i>	23,528	1,642	0,000
(1) Extrato de levedura (% m/v) (L)	0,725	1,007	0,503
Extrato de levedura (% m/v) (Q)	-0,040	1,201	0,974
(2) Polpa de batata (% v/v) (L)	1,976	1,006	0,107
Polpa de batata (% v/v) (Q)	1,820	1,201	0,190
1L por 2L	0,426	1,422	0,776

3.2.4 Produção e rendimento de ácido láctico

A matriz com os resultados obtidos para as variáveis dependentes de rendimento do AL em relação ao consumo de AR (Y_p/s) e produção de AL para cada ensaio realizado é apresentada na Tabela 7.

Alguns cromatogramas oriundos das análises de CLAE, para quantificação do AL produzido, estão dispostos em APENDICE D.

Tabela 7 Matriz de planejamento com os ensaios e as variáveis respostas para rendimento e produção de ácido láctico

Ensaio	Extrato de levedura		Polpa de batata		Rendimento (g AL /g AR)	Produção (g/L)
	Cod.	Real ¹	Cod.	Real ²		
1	-1	3	-1	30	0,66	17,40
2	1	7	-1	30	1,02	23,83
3	-1	3	1	40	0,75	18,16
4	1	7	1	40	0,80	21,51
5	-1,41	2	0	35	0,86	16,08
6	1,41	8	0	35	0,95	24,91
7	0	5	-1,41	28	0,93	21,02
8	0	5	1,41	42	0,76	22,66
9	0	5	0	35	0,90	21,64
10	0	5	0	35	0,91	21,08
11	0	5	0	35	0,91	21,15

Foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 0,05 (5 %). A produção de AL foi calculada, considerando a diferença entre a concentração final e inicial de cada ensaio proposto pelo planejamento experimental.

De acordo com os resultados estatísticos apresentados na Tabela 8, apenas o termo linear da concentração de EL apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a produção de AL ($p < 0,05$), onde o termo linear está associado à letra L.

A ANAVA (Tabela 9) mostra que o F_{calc} (14,04) foi maior que o F_{tab} (5,05), ao nível de significância de 5 %. O coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,93 e o fato da regressão ser estatisticamente significativa ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$) permite afirmar que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais.

Tabela 8 Coeficientes de regressão para produção de ácido láctico

Fonte de variação	Regressão	Erro padrão	p-valor
<i>Média/Interação</i>	21,293	0,564	0,000
(1) Extrato de levedura (% m/v) (L)	2,787	0,346	0,000
Extrato de levedura (% m/v) (Q)	-0,638	0,413	0,183
(2) Polpa de batata (% v/v) (L)	0,093	0,346	0,800
Polpa de batata (% v/v) (Q)	0,037	0,413	0,931
1L por 2L	-0,773	0,488	0,175

Tabela 9 Análise de variância para produção de ácido láctico

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F _{calc}	F _{tab} (5 %)
Regressão	67,01	5	13,40	14,04	5,05
Erro	4,77	5	0,95		
Total SQ	71,78	10			r ² : 0,93

^{SQ} Soma dos quadrados; ^{gl} Graus de liberdade; ^{QM} Quadrado médio

O modelo de ajuste com as variáveis codificadas para a produção de ácido láctico (PAL) em g/L, é apresentado na Equação 4.

$$\text{PAL} = 21,293 + 2,787 \cdot x_1 - 0,638 \cdot x_1^2 + 0,093 \cdot x_2 + 0,037 \cdot x_2^2 - 0,773 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (4)$$

Os efeitos das variáveis independentes na formação do produto podem ser visualizados por meio da análise da superfície de resposta (Figura 5), construída a partir da Equação 4.

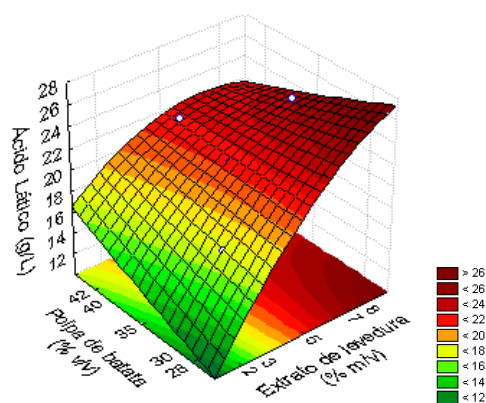


Figura 5 Superfície de resposta para produção de ácido láctico como uma função das variáveis: concentração de polpa de batata e de extrato de levedura

A superfície de resposta mostra que apesar da boa produção de AL obtida, o ponto de ótimo não foi alcançado com o planejamento experimental e que o aumento da concentração de EL eleva a produção do ácido, sugerindo que o aumento da concentração de EL pode favorecer uma maior produção de AL.

O EL é amplamente utilizado em processos fermentativos, a fim de proporcionar melhores condições de fermentação (NANCIB et al., 2001), uma vez que o enriquecimento do meio com essa fonte de nitrogênio aumenta significativamente a produção de ácido láctico (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

A maior produção alcançada no presente estudo foi de 24,9 g/L (ensaio 6), onde o meio foi adicionado de 35 % de polpa de batata hidrolisada e 8 % de extrato de levedura, como mostra a Figura 6.

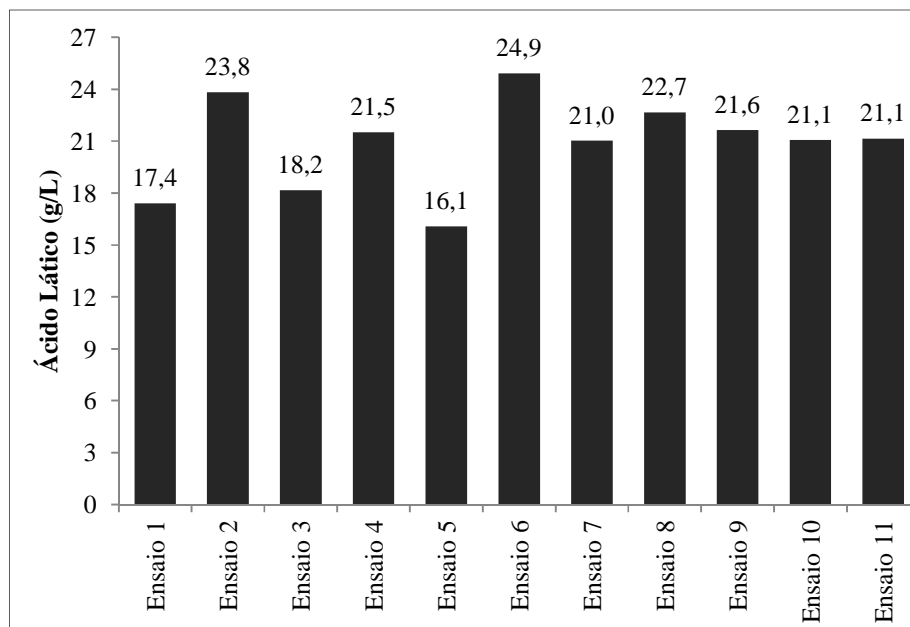


Figura 6 Produção de ácido lático de acordo com os ensaios do planejamento experimental

As análises de coeficientes de regressão para rendimento de AL mostram que apenas o termo linear da concentração de EL apresentou efeito significativo sobre essa variável dependente (Tabela 10). O mesmo ocorreu quando se avaliou a produção de AL.

Tabela 10 Coeficientes de regressão para rendimento de ácido lático

Fonte de variação	Regressão	Erro Padrão	p-valor
<i>Média/Interação</i>	<i>0,905</i>	<i>0,037</i>	<i>0,000</i>
(1) Extrato de levedura (% m/v) (L)	0,068	0,023	0,031
Extrato de levedura (% m/v) (Q)	-0,017	0,027	0,555
(2) Polpa de batata (% v/v) (L)	-0,047	0,023	0,098
Polpa de batata (% v/v) (Q)	-0,046	0,027	0,153
1L por 2L	-0,080	0,032	0,058

Mesmo o coeficiente de determinação apresentando um valor relativamente alto (r^2 : 0,81), a ANAVA (Tabela 11) mostra que o F_{calc} (4,37) da regressão não foi maior do que o F_{tab} (5,05), indicando que o ajuste da regressão não foi bom, nível de significância a 5%. Portanto, não foi gerada a superfície de resposta.

Tabela 11 Análise de variância para rendimento de ácido láctico

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F_{calc}	F_{tab} (5%)
Regressão	0,092	5	0,018	4,372	5,05
Erro	0,021	5	0,004		
Total SQ	0,113	10			r^2 : 0,81

^{SQ} Soma dos quadrados; ^{gl} Graus de liberdade; ^{QM} Quadrado médio.

É frequente a utilização de uma fonte de nitrogênio em meios fermentativos. Li et al. (2010), investigaram novas fontes de carbono e nitrogênio para a produção econômica de AL por *L. rhamnosus* e relataram a importância do EL no aumento da produção, cerca de 20g/L de AL foi produzido a mais quando o meio foi acrescido de 2,5g/L de extrato de levedura. Zhang e Jin (2009) concluíram que a suplementação do meio de fermentativo com EL não beneficia apenas as fermentações com bactérias, mas também quando são utilizados fungos.

Apesar do crescente interesse da indústria e da comunidade científica na produção sustentável de AL, não foi encontrado nenhum estudo que se igualasse às condições do processo fermentativo adotadas por este estudo (Tabela 12).

Tabela 12 Comparação de estudos que relatam a produção de L(+) ácido lático a partir de diferentes substratos amiláceos e condições de fermentação

Microrganismo	Fonte de carbono + fonte de nitrogênio	AL (g/L)	Rendimento (g/L)	Produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹)	Referências
<i>L. rhamnosus</i>	Polpa de batata (35%) + EL (8%)	24,9	0,95	0,35	<i>Este trabalho</i>
<i>L. rhamnosus</i>	Pó de mandioca (275 g/L) + EL (5g/L)	175,4	0,71 g/g	1,8	Wang et al., (2010)
<i>L. amylovorus</i>	Amido de batata (1 %) + EL (30g/L)	4,2	NI	0,12	Xiaodong; Xuan; Rakshit, (1997)
<i>S. bovis</i>	Amido de milho cru (20 g/L)	14,7	0,88	0,15	Narita; Nakahara; Fukuda, (2004)
<i>E. faecium</i>	Amido solúvel de batata (20 g/L)	14,3	0,69	0,59	Shibata et al., (2007)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Amido de batata (20 g/L)	19,74	0,91	0,41	Ping et al., (2005)
<i>L. amylophilus</i>	Amido de LV (0,8 %) + EL (1%)	4,69	0,92	0,1	Altaf; Naveena; Reddy, (2007)
<i>L. amylophilus</i>	Amido solúvel (1 %) + LV (2%) e células de levedura (1%)	12,2	0,92	NI	Altaf; Naveena, (2005)
<i>E. faecalis</i>	Amido de batata (100 g/L) + AMM (30 g/L) e EL (1 g/L)	98,8	0,95	1,9	Wee; Reddy; Ryu, (2008)
<i>L. delbrueckii</i>	Amido de batata (10 g/L)	7,2	0,7	0,3	Anuradha; Suresh; Venkatesh, (1999)

^{AL} Ácido lático; ^{NI} Não Informado; ^{EL} Extrato de levedura; ^{LV} Lentilha vermelha; ^{AMM} Água de maceração de milho;

Entre os estudos citados na Tabela 12, aquele que mais se assemelha aos parâmetros utilizados pelo presente trabalho é o publicado por Wang et al. (2010), que produziram 175,4g/L de AL ao utilizar o mesmo microrganismo e fonte de nitrogênio desta pesquisa. Porém, os autores utilizaram pó de mandioca como substrato e em uma concentração superior a aqui empregada. Os autores utilizaram, ainda, de temperatura diferente, fermentação descontínua com sacarificação simultânea do meio e controle de pH.

Wee, Reddy e Ryu (2008) produziram 98,8 g/L de ácido lático em meio contendo batata e água de maceração de milho, com o mesmo rendimento obtido pelo presente estudo (0,95 gAL/gAR). Na Tabela 12, mostra-se, ainda, diversos autores que utilizaram produtos excedentes da agroindústria como fonte de nitrogênio e obtiveram produção próxima a 24g/L.

Assim, com base em resultados obtidos em outros pesquisas, pode-se afirmar que a produção obtida no presente estudo corrobora com aqueles já encontrados anteriormente. É importante ressaltar que conforme o microrganismo utilizado e as condições a que são submetidos à produção de ácido lático pode chegar a valores superiores aos aqui apresentados. Um exemplo disso são os inúmeros trabalhos existentes (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; DATTA; HENRY, 2006; GUYOT; MORLON-GUYOT, 2001; MARTINEZ et al., 2013) relatando os mais diversos métodos, concentrações e rendimento de ácido lático.

A grande frequência de utilização de espécies do gênero *Lactobacillus* (Tabela 12) é justificada pelas altas taxas de crescimento e rendimento de produto (PING et al., 2005).

3.2.5 Identificação do isômero produzido

O kit enzimático utilizado para a identificação do isômero produzido mostrou haver produção do isômero L em todas as amostras analisadas. Resultados estes que corroboram com estudos anteriores (LIMA et al., 2010; WANG et al., 2010; YU et al., 2008) que afirmam a produção apenas de L(+) ácido láctico por *L. rhamnosus*.

Na Tabela 13, apresentam-se as concentrações de L(+) ácido láctico produzido pelos ensaios do planejamento experimental.

Tabela 13 Análise da produção de L(+) ácido láctico por *L. rhamnosus* em ensaios conforme planejamento experimental

Ensaio	Extrato de levedura (% m/v)	Polpa de batata (% m/v)	Produção de L(+) ácido láctico (g/L)
1	3	30	14,87
2	7	30	18,13
3	3	40	15,06
4	7	40	18,20
5	2	35	12,91
6	8	35	20,57
7	5	28	17,14
8	5	42	16,12
9	5	35	18,29
10	5	35	18,13
11	5	35	17,33

É essencial se ter claro que a pureza óptica do AL é determinante para o setor a que esse produto se destina. Sendo este comercialmente disponível em diferentes ‘graus de qualidade’. Aqueles com pureza entre 20 e 50% é denominado AL de grau técnico, os acima de 80% são os de grau alimentar e os acima de 90 % são os de grau farmacêutico e plástico (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008).

A obtenção do AL por via fermentativa apresenta a vantagem de produzir um ácido opticamente puro e a não adição de substâncias para controle

do pH durante a fermentação garante facilidade aos processos de recuperação e purificação do ácido (JOHN; NAMPOOTHIRI, 2008; MARTINEZ et al., 2013).

3.2.6 Validação do modelo

Com base nos valores apresentados na Tabela 13, foi feita a validação do modelo para produção de L(+) ácido láctico (Tabela 14).

Tabela 14 Validação do modelo de produção de L(+) ácido láctico

Ensaio	Extrato de levedura		Polpa de batata		Produção experimental (g/L)	Produção prevista (g/L)	Erro Relativo (%)
	Cod.	Real ¹	Cod.	Real ²			
1	0,5	6	-1	30	16,08	18,33	13,99
2	0,5	6	1	40	16,72	18,00	7,66

¹ Valores expressos em % m/v; ² Valores expressos em % v/v; ^{Cod.} Valores codificados

Na Tabela 14, pode-se observar que o erro relativo médio de 10 % indica que os resultados obtidos nos ensaios de validação foram satisfatórios em relação à produção de L(+) ácido láctico.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram produzidos 25 g/L de L(+)ácido láctico em meio com 35 % (v/v) de polpa de batata hidrolisada e 8 % (m/v) de extrato de levedura. Verificou-se ainda que as bactérias lácticas aumentaram, em média, de 1 ciclo logarítmico (de 10^7 para 10^8 UFC.mL⁻¹) ao longo da fermentação e que o pH ao final do processo estabilizou-se entre 3 e 4. Comprovou-se que o ácido láctico produzido por *L. rhamnosus* é o isômero ótico L(+) ácido láctico, monômero utilizado na produção de plástico biodegradável polilactato (PLA).

Concluiu-se ainda que a metodologia utilizada para análises qualitativas e quantitativas mostrou-se satisfatória para a determinação da produção de AL e do isômero produzido. A metodologia de superfície de resposta associada ao planejamento experimental fatorial de experimentos também mostrou ser um método eficaz para verificar a influência dos parâmetros fermentativos no processo de fermentação.

REFERÊNCIAS

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, Nov. 2013.

ALTAF, M.; NAVEENA, B. J. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amyolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v. 43, n. 3, p. 235–239, 2005.

ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; REDDY, G. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 498–503, Feb. 2007.

ANURADHA, R.; SURESH, A. K.; VENKATESH, K. V. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 3-4, p. 367–375, Nov. 1999.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19. th. ed. Chicago: Pharmabooks, 2012.

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, July 2006.

EVANGELISTA, R. M. et al. Qualidade nutricional e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46. n. 8, p. 953–960, 2011.

GONÇALVES, L. M. D. et al. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, n. 3, p. 346–350, Sept. 1997.

GUYOT, J. P.; MORLON-GUYOT, J. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32 T , an amyolytic *Lactobacillus* isolated from sour starch cassava fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 217–225, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3105–3109, Dec. 2008.

LI, Z. et al. Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 138–142, Mar. 2010.

LIMA, C. J. B. et al. L(+) Lactic acid production by new *Lactobacillus rhamnosus* B103. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 64–69, 2010.

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, Mar. 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosaiicyiic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, Mar. 1959.

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, June 2001.

NARITA, J.; NAKAHARA, S.; FUKUDA, H. Efficient production of L(+) lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 97, n. 6, p. 423–425, 2004.

OLIVEIRA, R. F. et al. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melão da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, p. 34–40, June 2009.

PING, L. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 265–276, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SHIBATA, K. et al. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 1-2, p. 149–155, July 2007.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 245–264, 2008.

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

WANG, L. et al. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 20, p. 7895–7901, Oct. 2010.

WEE, Y.; REDDY, L. V. A.; RYU, H. 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 Biotecnology**, Oxford, v. 83, n. 10, p. 1387–1393, Oct. 2008.

ZAMBOLIM, L. **Produção integrada da batata**. Viçosa: Editora da UFV, 2011.

ZHANG, Z.; JIN, B. L(+) lactic acid production using sugarcane molasses and waste potato starch: an alternative approach. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 31, n. 2, p. 372–380, 2009.

YÁÑEZ, R. et al. The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 4, p. 356–361, Apr. 2008.

YU, L. et al. 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**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 496–502, May 2008.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Após a análise dos resultados, pode-se concluir que o processo fermentativo, assim como, as metodologias analíticas empregadas no decorrer deste trabalho foram adequadas e apresentaram como resultado uma boa produção de AL. Tais resultados sugerem a viabilidade do processo, uma vez que o rendimento obtido se apresentou muito próximo das literaturas consultadas.

O presente estudo enriquece não só o âmbito social/ambiental como também o acadêmico, uma vez que é o primeiro trabalho que investiga a produção de L(+) ácido lático, utilizando como substrato fermentativo uma cultura produzida em grande escala, nacionalmente, o que garante certa vantagem na produção desse ácido orgânico pelo Estado de Minas Gerais, já que o Estado mineiro é o maior produtor nacional de batata.

Considerando a quantidade de matéria-prima empregada nesse processo, pode se afirmar ainda que o emprego de batata como substrato fermentativo, na obtenção de AL, trata-se de uma atraente alternativa para a redução desse produto em excesso no mercado e de baixo valor agregado na sua cadeia produtiva.

Durante a execução de um processo fermentativo, inúmeros parâmetros podem ser alterados a fim de aumentar a produtividade do ácido de interesse. Contudo, é importante avaliar individualmente cada situação, uma vez que a combinação de elementos como microrganismos, substratos fermentativos e problemas de aspectos ambientais, com métodos que aumentem as concentrações, os rendimentos e produtividades desse ácido podem levar também a elevação dos custos de produção.

Nesse contexto, visando à produção do L(+) ácido lático por *L. rhamnosus* em substratos fermentativos à base de batata e enriquecido com uma

fonte de nitrogênio, este estudo sugere a avaliação de combinações de outros elementos que possam vir a influenciar o processo fermentativo, como o controle de pH, modo de fermentação e outros, desde que estes não onerem maiores custos de produção do ácido de interesse. Com tais alterações no processo fermentativo, espera-se que haja conseqüentemente maior difusão no mercado dos produtos que possuem esse ácido como principal matéria-prima, como os biopolímeros.

Ainda do contexto de valorização das questões ambientais e visando ao enriquecimento do meio de fermentação, sugere-se que estudos futuros considerem a suplementação dos meios fermentativos com outros recursos em excesso no mercado, como os subprodutos da agroindústria. Enfim, quando se trata de processo fermentativo inúmeros parâmetros podem ser alterados, desde que atendam a requisitos de viabilidade econômica, como dito anteriormente.

Sugere-se ainda a otimização do meio fermentativo, a fim de melhorar a produção de ácido láctico e o emprego de batata em estado de decomposição para avaliar a influência desse fator no rendimento e produção de AL, bem como ampliar as alternativas de uso do substrato.

APENDICE A - Curvas de crescimento de bactérias lácticas

Todas as curvas de crescimento foram realizadas em triplicata e seguiram a mesma metodologia. A ativação da cultura se deu pela transferência da cultura estoque em glicerol (1 mL) para um tubo de ensaio contendo 10mL de caldo MRS estéril (121°C/15min). Após 24 h a 37 °C 1 % do inóculo (10 mL) foi adicionado a 100 mL de caldo MRS estéril, dando início à curva de crescimento (Figura 1A).

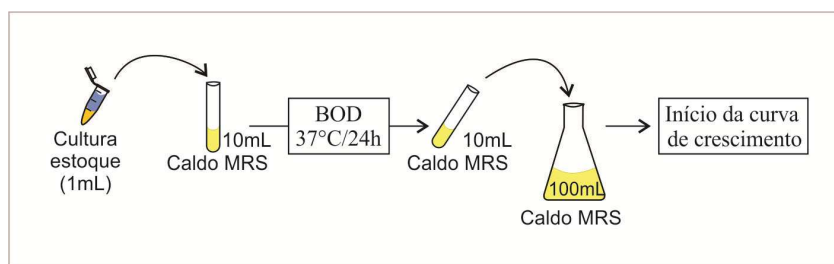


Figura 1A Esquema de início da curva de crescimento

Posteriormente, amostras foram retiradas a cada 2 h nas 4 primeiras horas e depois a cada 1 h, até a estabilização dos valores de absorbância. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (FEMTO 700S Soft., Brasil) com comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}). caldo MRS estéril foi utilizado como amostra branca do equipamento.

A determinação da viabilidade celular foi realizada por plaqueamento em profundidade (“pour plate”) com adição de sobre camada, visando à criação de atmosfera de 15 % de CO_2 e incubadas a 37 °C/72 h (TEBALDI *et al.*, 2007). Antes do plaqueamento as amostras foram diluídas em água peptonada (1 g de peptona bacteriológica/L de água destilada) e as diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram utilizadas. Testes de identificação de gram e catalase foram realizados a fim de confirmar a pureza das colônias.

A partir dos dados obtidos pelas curvas de crescimento, foram construídos gráficos que ilustram a correlação entre absorvância e a contagem de colônias viáveis (Figura 2A, 3A, 4A, 5A e 6A).

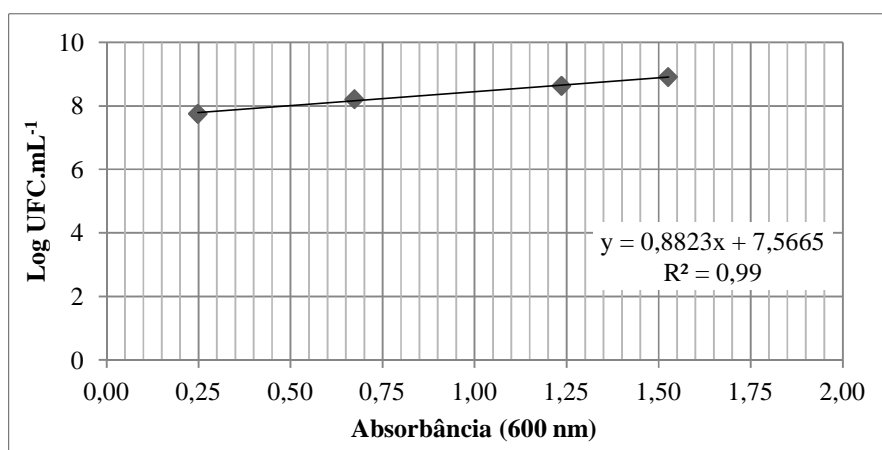


Figura 2A Correlação entre absorvância e a viabilidade celular na curva de crescimento de *E. faecalis*

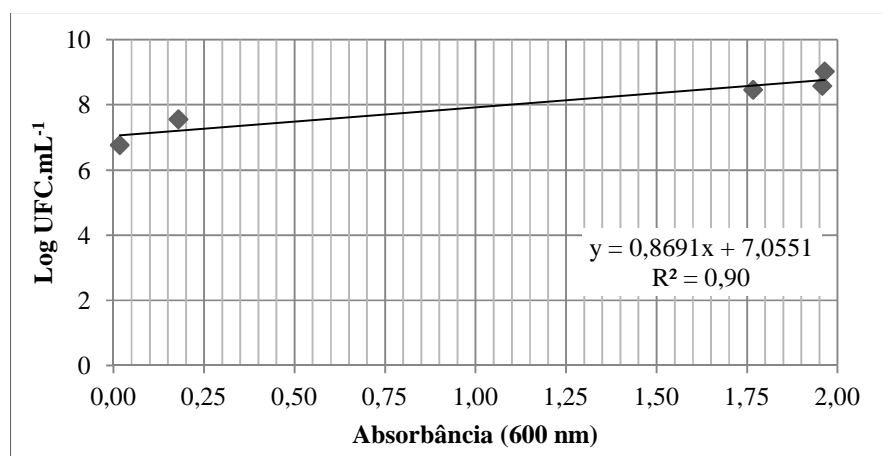


Figura 3A Correlação entre absorvância e a viabilidade celular na curva de crescimento de *E. durans*.

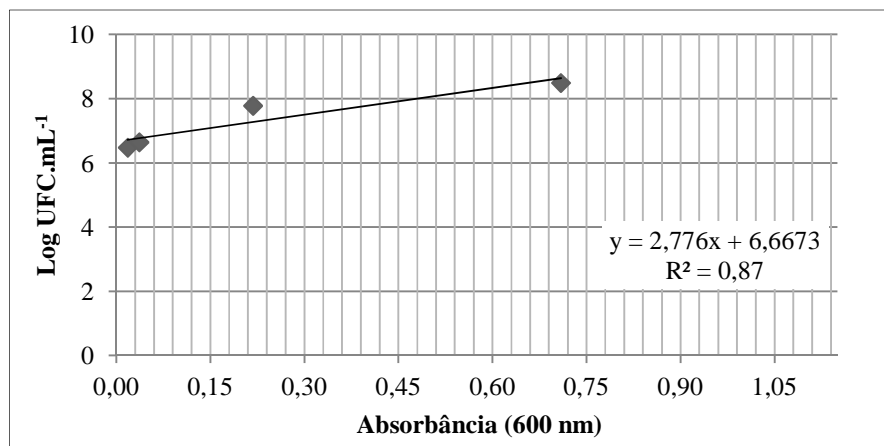


Figura 4A Correlação entre absorvância e a viabilidade celular na curva de crescimento de *S. mutans*

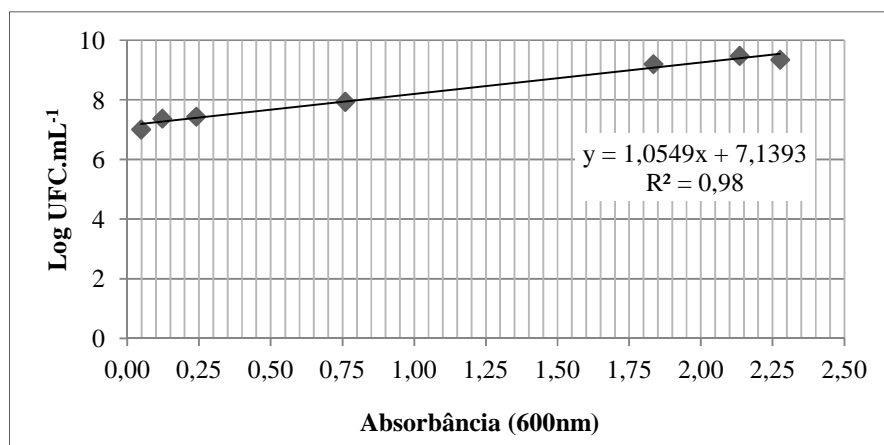


Figura 5A Correlação entre absorvância e a viabilidade celular na curva de crescimento de *L. plantarum*

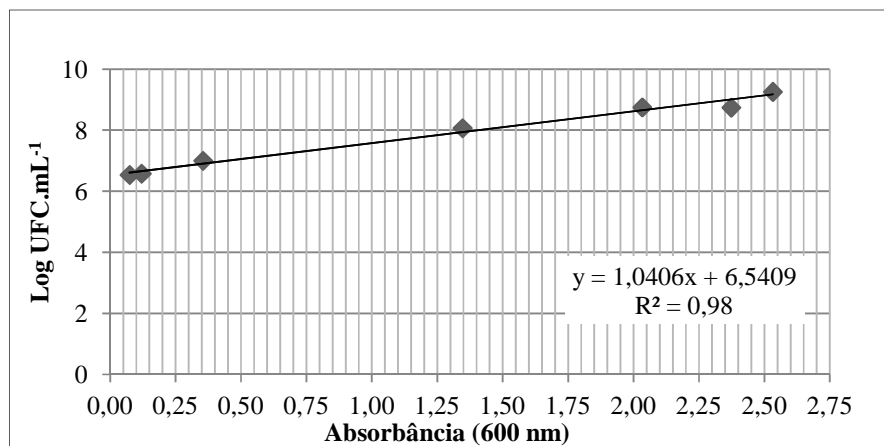


Figura 6A Correlação entre absorvância e a viabilidade celular na curva de crescimento de *L. rhamnosus*

A cinética da absorvância e o crescimento de células durante as curvas de crescimento de *E. faecalis* (Figura 7A), *E. durans* (Figura 8A), *S.mutans* (Figura 9A), *L. plantarum* (Figura 10A), e *L. rhamnosus* (Figura 11A), são apresentados a seguir:

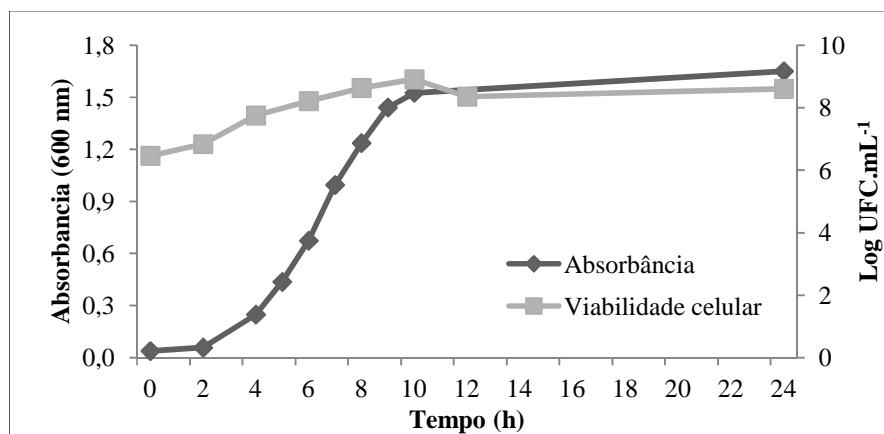
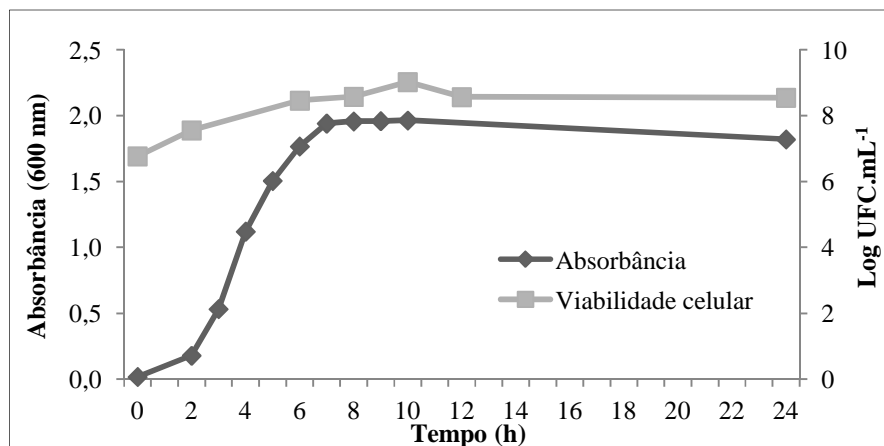
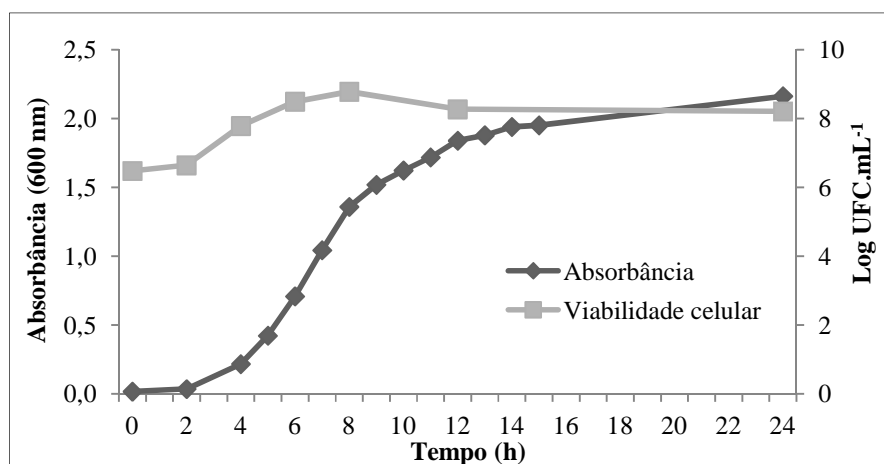


Figura 7A Cinética da absorvância e do crescimento celular de *E. faecalis*

Figura 8A Cinética da absorvância e do crescimento celular de *E. durans*Figura 9A Cinética da absorvância e do crescimento celular de *S. mutans*

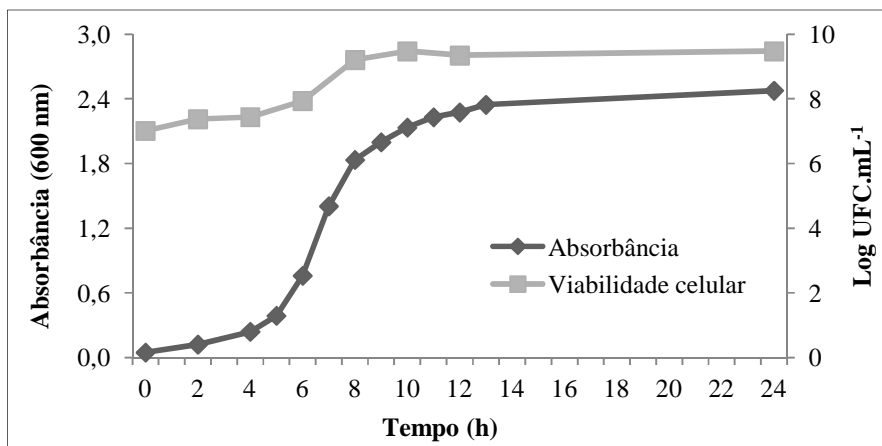


Figura 10A Cinética da absorvância e do crescimento celular de *L. plantarum*

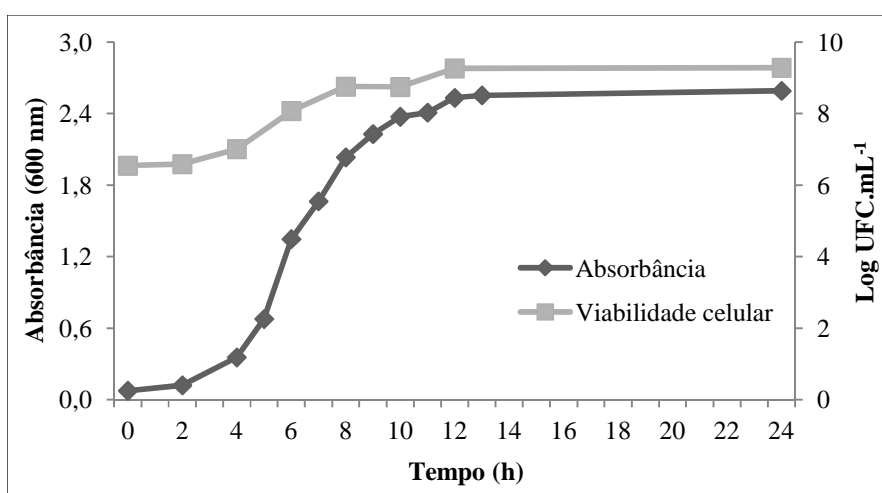


Figura 11A Cinética da absorvância e do crescimento celular de *L. rhamnosus*

APENDICE B – Curva de calibração do ácido láctico utilizado nas análises de CLAE

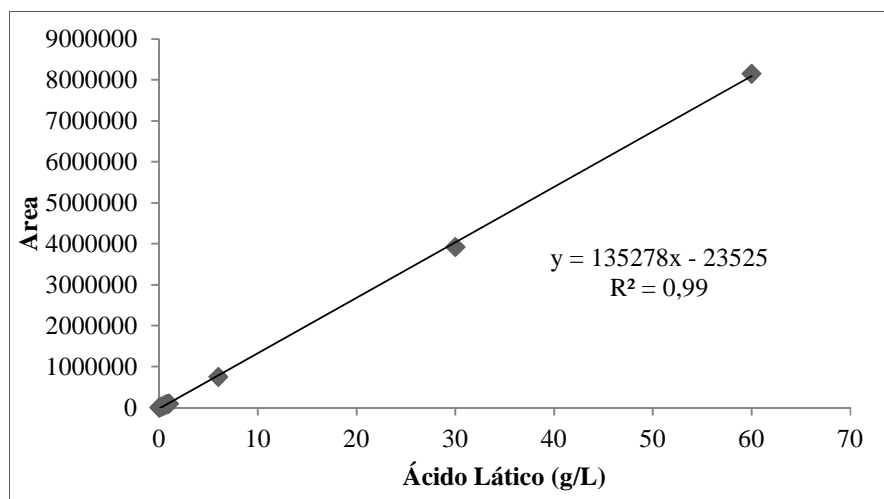


Figura 12A Curva de calibração de ácido láctico para análises de CLAE.

A concentração de ácido láctico é dada pela Equação 1:

$$\text{Concentração de ácido láctico (g.L)} = (\text{área encontrada} + 23525) / 135278 \quad (1)$$

APENDICE C - Curva padrão de glicose para análise de AR

Na Figura 13A, mostram-se as concentrações de glicose utilizadas para a confecção da curva de padrão da glicose e suas respectivas absorvâncias, correlacionando à absorvância da amostra com sua concentração de glicose, conforme o método de DNS.

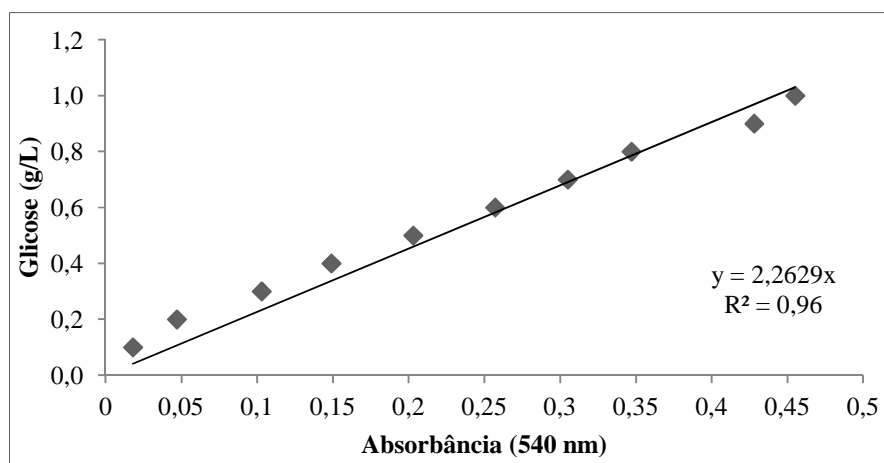


Figura 13A Correlação da absorvância com a concentração de glicose

A concentração de glicose é dada pela Equação 2:

$$\text{Concentração de glicose (g.L)} = (2,2629 \times \text{Absorvância encontrada}) \quad (2)$$

APENDICE D – Cromatogramas das análises de CLAE para quantificação do ácido láctico produzido

