



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ENG07053 – TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM

ENGENHARIA QUÍMICA



Produção biotecnológica de ácido láctico a partir de diferentes fontes de carbono

Autor: Otávio Lüdtke Lauffer

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Misturini Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre, junho de 2019.

Sumário

1	Introdução.....	1
2	Revisão Bibliográfica.....	2
2.1	Ácido Lático.....	2
2.1.1	Aplicações do ácido lático.....	3
2.1.2	Produção do ácido lático.....	4
2.2	Microrganismos produtores de ácido lático.....	6
2.3	Substratos utilizados na produção.....	9
2.4	Condições de operação.....	10
2.4.1	Efeito do pH.....	10
2.4.2	Efeito da temperatura.....	12
2.4.3	Efeito da aeração.....	13
2.4.4	Efeito da fonte de carbono.....	14
2.4.5	Efeito da fonte de nitrogênio.....	14
3	Materiais e métodos.....	16
3.1	Microrganismos.....	16
3.2	Seleção de lactobacilos produtores de ácido lático.....	16
3.3	Planejamento experimental.....	17
3.4	Ensaio de fermentação.....	18
3.5	Metodologia analítica.....	19
3.5.1	Formação de produtos e consumo de açúcares.....	19
3.5.2	Crescimento celular.....	20
3.5.3	Medida de pH.....	20
3.5.4	Cálculos.....	20
4	Resultados e discussão.....	22
4.1	Escolha do microrganismo.....	22
4.2	Planejamento experimental.....	23
4.3	Cinética.....	24
5	Conclusões e trabalhos futuros.....	31
6	Referências.....	32

Agradecimentos

À minha família, em especial a meus pais, Luiz Antônio e Eliane, e a meus irmãos, Matheus e Luísa, por todo amor, educação, apoio e incentivo.

À minha orientadora Daniele Misturini Rossi pelos ensinamentos, confiança e ajuda.

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub pela oportunidade de frequentar seu laboratório, onde pude também realizar esse trabalho.

A todos meus colegas e amigos do BiotecLab pela disponibilidade de sempre me auxiliarem quando necessário.

À UFRGS pela oportunidade de receber um ensino de qualidade.

A todos professores que contribuíram com minha formação acadêmica, em especial aos do Departamento de Engenharia Química.

A todos que contribuíram, cada um à sua maneira, para que esse objetivo fosse alcançado.

Resumo

O ácido 2-hidroxiopropanoico (ácido lático) possui aplicações na indústria alimentícia, sendo utilizado como conservante e acidulante; na indústria farmacêutica e cosmética, na formulação de loções e pomadas; e na indústria química, como matéria-prima na fabricação do ácido polilático (PLA), um biopolímero substituto de polímeros de origem fóssil.

O ácido lático pode ser produzido por síntese química, mas a via fermentativa tem recebido muita atenção por ser uma forma de produção menos poluente e não dependente de matérias-primas de origem fóssil, além de ser uma maneira de melhor gerir os resíduos da atividade agrícola, já que eles podem servir como fonte de carbono na produção biotecnológica.

Nesse contexto, é importante a otimização da produção do ácido lático a partir de resíduos por via fermentativa. Assim sendo, esse trabalho visa avaliar o potencial produtivo de ácido lático de diferentes linhagens de lactobacilos, avaliando os parâmetros cinéticos de crescimento celular com meio sintético e hidrolisado de casca de soja.

Na primeira etapa do trabalho, selecionou-se o melhor microrganismo produtor de ácido lático dentre 5 cepas disponíveis, considerando-se o consumo dos três açúcares: glicose, xilose e arabinose e avaliando-se o rendimento do produto. *Lactobacillus* sp. destacou-se consumindo 83,09 %; 85,08 % e 11,15 % de glicose, xilose e arabinose, respectivamente, com um rendimento de 0,72 g.g⁻¹.

Após, o microrganismo selecionado foi cultivado em meio MRS em diferentes condições de temperatura e agitação com o objetivo de se determinar a melhor condição de operação para produção de ácido lático, utilizando um planejamento central composto 2² totalizando 10 experimentos. Porém, a variação explicada pelo modelo foi de apenas 66%, com isso, os dados obtidos no planejamento não foram considerados para as etapas posteriores do trabalho.

Na última parte, foi feita uma comparação cinética do meio MRS com o hidrolisado de casca de soja avaliando-se o crescimento celular, variação de pH, consumo de açúcares e produção de ácido lático. Foi observado que no meio MRS, a concentração máxima de ácido lático foi de 6,05 g.L⁻¹, com essa concentração atingida em 10 horas e no hidrolisado, a concentração máxima foi de 3,98 g.L⁻¹, com essa concentração sendo atingida em 32 horas.

Lista de Figuras

Figura 1. Estereoisômeros do ácido lático.....	2
Figura 2. Exemplos de produtos que podem ser feitos a partir do ácido lático	3
Figura 3. Rotas de produção do PLA.....	4
Figura 4. Processo convencional de manufatura do ácido lático a partir de carboidrato	6
Figura 5. Rotas metabólicas homofermentativa e heterofermentativa. P: fosfato; ADP: adenosina 5'-difosfato; ATP: adenosina 5'-trifosfato; NAD ⁺ : nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida); (1): lactato desidrogenase; (2): álcool desidrogenase.....	8
Figura 6. Diagrama de Pareto.....	24
Figura 7. Cinética de consumo de açúcares e produção de ácido lático em meio MRS modificado, à temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm com <i>Lactobacillus</i> sp. (-■-) glicose, (-◆-) xilose, (-▼-) arabinose, (-▲-) ácido lático, (-►-) pH.....	25
Figura 8. Cinética de consumo de açúcares em meio MRS modificado, à temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm com <i>Lactobacillus</i> sp. (-■-) glicose, (-◆-) xilose, (-▼-) arabinose, (-▲-) pH, (-►-) DO.....	26
Figura 9. Cinética de produção do ácido lático em hidrolisado de casca de soja, à temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm com <i>Lactobacillus</i> sp. (-■-) glicose, (-◆-) xilose, (-▼-) arabinose, (-▲-) ácido lático, (-►-) pH.....	28
Figura 10. Curvas de contorno em função da temperatura e agitação para a produção de ácido lático.....	40
Figura 11. Superfície de resposta em função da temperatura e agitação para a produção de ácido lático.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de substratos utilizados na produção de ácido lático.....	10
Tabela 2. pH ótimo para a produção de ácido lático de acordo com o material e o microrganismo utilizado.....	11
Tabela 3. Temperatura ótima de crescimento de microrganismos de acordo com o material a ser fermentado.....	13
Tabela 4. Formulação do meio MRS.....	16
Tabela 5. Formulação do meio MRS modificado.....	17
Tabela 6. Valores utilizados no DCCR para produção de ácido lático.....	18
Tabela 7. Formulação do meio MRS modificado utilizado no planejamento experimental.....	18
Tabela 8. Parâmetros cinéticos do ensaio fermentativo em meio MRS modificado, com Y_{PS} sendo calculado após 48 horas de fermentação.....	22
Tabela 9. Planejamento experimental, valores codificados e originais das variáveis de estudo (temperatura e agitação) e concentração final de ácido lático.....	23
Tabela 10. Composição de açúcares inicial do meio MRS modificado.....	25
Tabela 11. Composição de açúcares inicial do hidrolisado de casca de soja.....	27
Tabela 12. Composição parcial de diferentes hidrolisados ácidos.....	27
Tabela 13. Consumo de açúcares e produção de ácidos na fermentação do meio MRS modificado e do hidrolisado de casca de soja.....	29
Tabela 14. Valores de pH, DO e concentração de ácido lático no planejamento experimental.....	39

Lista de Símbolos

L (+)	Isômero levógiro
D (-)	Isômero dextrógiro
CO ₂	Dióxido de carbono
Y _{PS}	Rendimento
Q _P	Produtividade

Lista de Abreviaturas e Siglas

pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido polilático
Desidrat.	Desidratação
Mol.	Molecular
LAB	Bactéria ácido láctica
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> (Geralmente Reconhecido como Seguro)
MRS	de Man, Rogosa e Sharpe
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HMF	Hidroximetilfurfural
NAD	Nicotinamida Adenina Nucleotídeo

1 Introdução

O ácido lático possui aplicações na indústria de alimentos (WEE et al., 2006), farmacêutica e cosmética (KRISHNA et al., 2018) e serve de matéria-prima para a produção do PLA, que é um biopolímero substituto de polímeros de origem fóssil.

Tendo em mente que a síntese química do ácido lático é custosa e poluente e pensando que os recursos fósseis são finitos, a sua produção biotecnológica é uma alternativa que vem recebendo atenção e será importante nos próximos anos, já que é uma maneira de produzir o ácido de maneira limpa a partir de matérias-primas disponíveis e baratas.

Considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo (EMBRAPA, 2019), uma grande quantidade de resíduo lignocelulósico é gerado a cada safra. Esses resíduos possuem uma grande quantidade de celulose, hemicelulose e lignina, devendo passar por um pré-tratamento com o objetivo de liberar monossacarídeos no meio, como glicose, xilose e arabinose, que podem ser mais facilmente acessados pelos microrganismos que os utilizam nos seus processos metabólicos, transformando essas fontes de carbono em ácido lático por meios fermentativos.

O objetivo geral do presente trabalho foi selecionar potenciais lactobacilos para a produção biotecnológica de ácido lático e, avaliar o consumo de diferentes açúcares no meio sintético modificado, a fim de simular as condições encontradas no hidrolisado de casca de soja. Os objetivos específicos foram:

- 1- Selecionar potenciais lactobacilos produtores de ácido lático utilizando meio sintético modificado (composto por xilose, arabinose e glicose);
- 2- Otimização da produção de ácido lático;
- 3- Estudar a cinética de fermentação, com o microrganismo selecionado, em meio sintético modificado e hidrolisado de casca de soja, a fim de verificar o consumo de açúcares nos diferentes meios testados.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Ácido Lático

O Ácido lático foi descoberto em 1780 pelo químico sueco Scheele (DATTA et al., 1995). Foi considerado um componente do leite até 1857 quando Pasteur postulou que ele era um metabólito fermentativo gerado por microrganismos. Frémy o produziu por fermentação, possibilitando o início da sua produção industrial por bioprocessos em 1881 (GHAFAR et al., 2014).

O ácido lático é um ácido orgânico fraco com pKa igual a 3,86 (EITEMAN e RAMALINGAM, 2015) com fórmula molecular $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ e com nome IUPAC ácido 2-hidroxiopropanoico, sendo classificado como um α -hidroxiácido porque possui um grupo hidroxila adjacente a um grupo carboxila (PANDEY et al., 2018). Possui massa molar igual a 90,078 g/mol (PUBCHEM, 2019), ponto de fusão de 16,8 °C (RSC, 2019) e ponto de ebulição de 122 °C (HAYNES, 2015).

Possui baixa volatilidade, sendo solúvel em água e solventes orgânicos miscíveis em água, mas insolúvel em outros solventes orgânicos. É inodoro, não-volátil e classificado como Geralmente Considerado Seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) (NARAYANAN et al., 2004).

O ácido lático possui três carbonos com um único centro quiral (OLIVEIRA et al., 2016; GHAFAR et al., 2014; EITEMAN e RAMALINGAM, 2015), existindo em dois isômeros: L e D (BOONTIM et al., 2016; WADA et al., 2013). A figura 1 mostra os estereoisômeros do ácido lático.

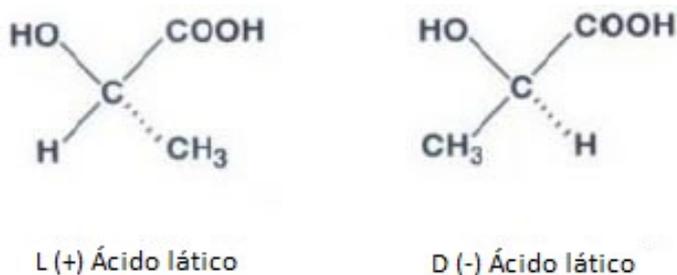


Figura 1. Estereoisômeros do ácido lático (traduzido de NARAYANAN et al., 2004).

2.1.1 Aplicações do ácido lático

Utilizado na indústria de alimentos (WEE et al., 2006), como conservante, flavorizante, acidulante e inibidor de bactérias. Devido à sua capacidade de retenção de água, é utilizado na indústria farmacêutica e cosmética em pomadas, loções, soluções anti-acne, umectantes e soluções parenterais (KRISHNA et al., 2018). A figura 2 mostra exemplos de produtos que podem ser fabricados a partir do ácido lático.

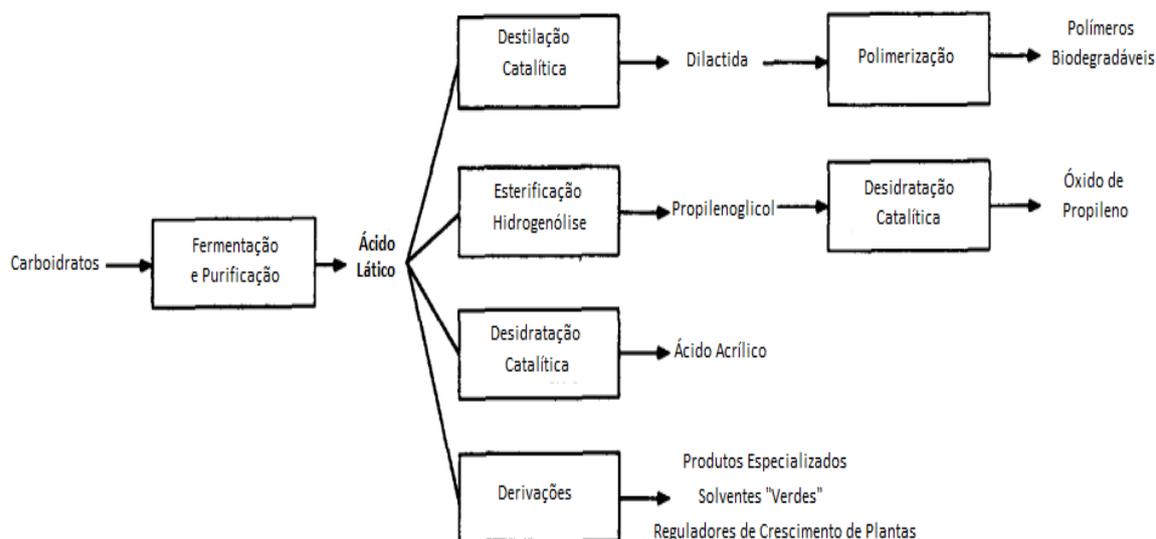


Figura 2. Exemplos de produtos que podem ser feitos a partir do ácido lático (traduzido de DATTA et al., 1995).

O ácido lático pode ser utilizado para a produção de ácido polilático (PLA) (CHAISSU et al., 2014; BOONTIM et al., 2016), um biopolímero substituto do plástico de origem fóssil (WEE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2018; BOONTIM et al., 2016; WADA et al., 2013). PLA, sendo um material bioabsorvível (BERNARDO et al., 2016), tem aplicações médicas em suturas, implantes ortopédicos e liberação controlada de drogas (OLIVEIRA et al., 2018; NARAYANAN et al., 2004). É necessário que o ácido lático tenha alta pureza ótica para obter PLA com alta resistência mecânica e ao calor (BOONTIM et al., 2016; VIDRA et al., 2017).

Há três rotas para produzir PLA: policondensação direta, polimerização em duas etapas e polimerização com abertura do anel. A policondensação direta produz PLA de baixa massa molar. A polimerização em duas etapas permite atingir massa molar mais alta, mas é limitada pela reação de equilíbrio da policondensação. Na polimerização com abertura do

anel, o ácido lático é primeiro polimerizado a um oligômero de baixa massa molar que é posteriormente depolimerizado cataliticamente a lactato através de transesterificação interna. Após, o anel de lactato abre para formar PLA de alta massa molar (HU et al., 2015). Na figura 3 estão demonstradas as rotas de produção do PLA a partir do ácido lático.

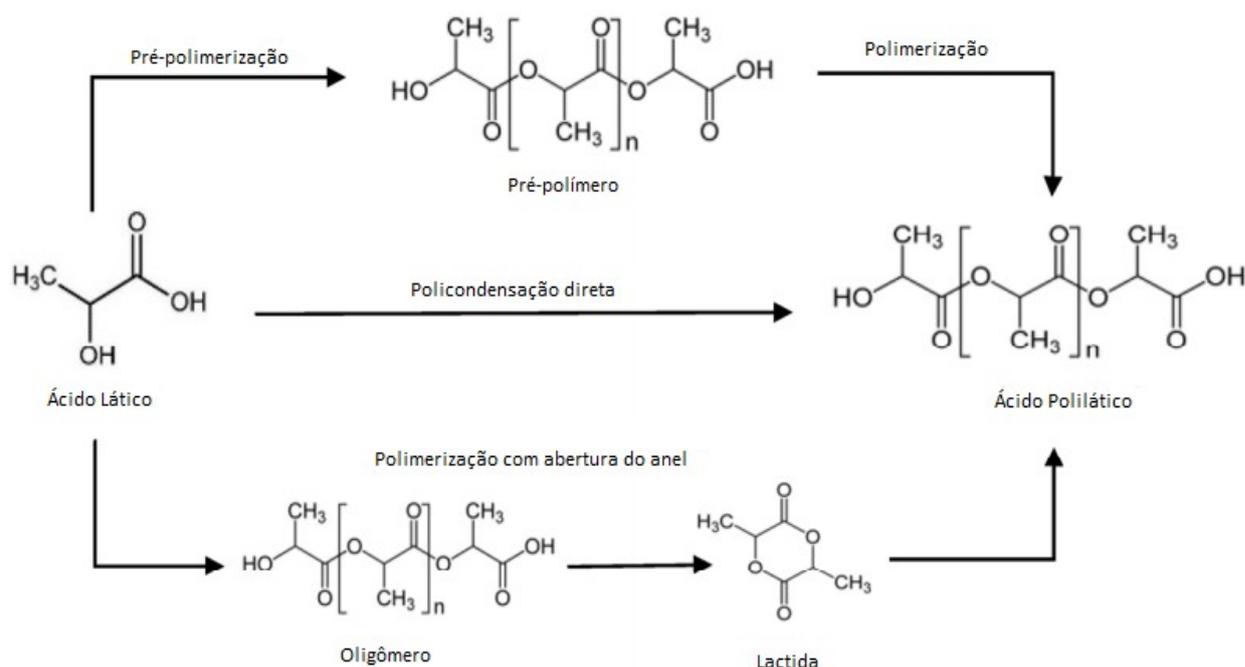


Figura 3. Rotas de produção do PLA (traduzido de HU et al., 2015).

2.1.2 Produção do ácido lático

O ácido lático pode ser produzido tanto por bioprocessos quanto por síntese química (WEE et al., 2006). A síntese química produz apenas a mistura racêmica (OLIVEIRA et al., 2016; PLEISSNER et al., 2017) e sua resolução é difícil (BOONTIM et al., 2016). O bioprocessos pode produzir o isômero L ou D puro (OLIVEIRA et al., 2016), dependendo do microrganismo escolhido (OLIVEIRA et al., 2016; BERNARDO et al., 2016; BOONTIM et al., 2016).

No método fermentativo, industrialmente, excesso de carbonato/hidróxido de cálcio é adicionado ao fermentador para manter o pH em torno de 5-6 e produzir lactato de cálcio. O caldo contendo o lactato é filtrado, evaporado e acidificado com ácido sulfúrico para

converter o lactato em ácido lático e sulfato de cálcio que é insolúvel e removido por filtração. O filtrado é purificado usando coluna de troca iônica para produzir ácido lático. Esse ácido resultante não possui alta pureza e não é estável termicamente.

Para a produção do ácido lático com a alta pureza necessária para produzir PLA, ele é esterificado com metanol ou etanol e o éster é recuperado por destilação, hidrolisado com água, evaporado e o álcool reciclado (DATTA e HENRY, 2006). Recentes avanços em tecnologias como microfiltração, ultrafiltração e eletrodialise podem contribuir com a diminuição dos custos de purificação (DATTA et al., 1995). A figura 4 mostra o processo de produção do ácido lático a partir de carboidrato.

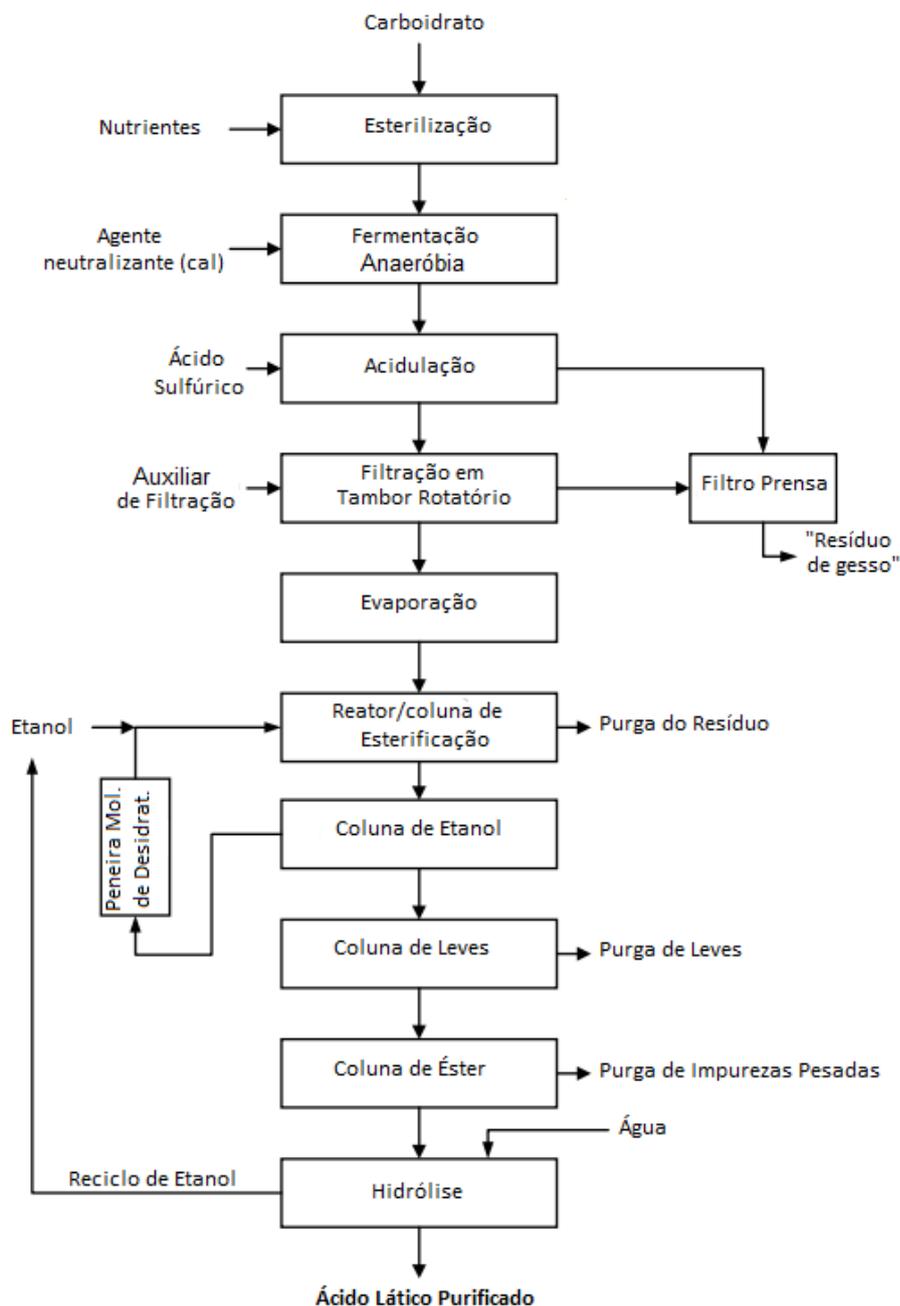


Figura 4. Processo convencional de manufatura do ácido lático a partir de carboidrato (traduzido de DATTA e HENRY, 2006).

2.2 Microrganismos produtores de ácido lático

Microrganismos produtores de ácido lático podem ser bactérias ou fungos. Dentre os fungos produtores de ácido lático encontram-se *Rhizopus*, *Monilia* e *Mucor*. Os fungos filamentosos *Rhizopus* têm a vantagem de produzir ácido lático aerobiamente, mas a taxa de

produção é baixa devido a limitações na transferência de massa. Dentre os fungos, há ainda as leveduras *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces* e *Pichia* que são geneticamente modificadas para produzir ácido láctico com alto rendimento (KRISHNA et al., 2018).

Dentre as bactérias encontram-se *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, cepas *Bacillus*, gêneros *Bifidobacterium* e outras bactérias denominadas bactérias ácido-láticas (LAB).

LAB são um grupo de bactérias anaeróbias facultativas, catalase-negativas, não móveis, não formadoras de esporos e que tem a capacidade de produzir ácido láctico como o maior ou único produto da fermentação.

Compreendem os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, assim como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella*. O gênero *Lactobacillus* é o maior deles, contendo mais de 125 espécies (TEUBER, 2008; PANESAR et al., 2007).

Os critérios usados para a escolha da LAB que será utilizada industrialmente na fermentação são a capacidade de fermentar determinada matéria-prima rápida e completamente, baixa necessidade de fontes de nitrogênio, gerar o isômero específico do ácido láctico com alto rendimento e baixa produção de biomassa e subprodutos sob condição de baixo pH e alta temperatura (ÅKERBERG et al., 1998).

As LAB podem ser divididas em homofermentativas ou heterofermentativas sendo que as homofermentativas convertem hexoses principalmente em ácido láctico e as heterofermentativas convertem hexoses em ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂ (WADA et al., 2013; MCDONALD et al., 1986).

Na via homofermentativa ocorre a glicólise, onde a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase ou glicoquinase para gerar glicose 6-fosfato, sendo essa reação dependente de ATP e Mg²⁺. Após, glicose 6-fosfato é isomerizada a frutose 6-fosfato pela enzima fosfoglicoquinase na presença de Mg²⁺. Então, frutose 6-fosfato é fosforilada por ATP para produzir frutose 1,6-bisfosfato na presença da enzima fosfofrutoquinase. A molécula de frutose 1,6-bisfosfato é dividida em gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato, sendo essa reação catalisada pela enzima frutose-bisfosfato aldolase. Após, a enzima fosfotriose isomerase catalisa a interconversão reversível de gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato. Então, gliceraldeído-3-P é convertido a piruvato pela ação subsequente de diversas

enzimas. Sob condições anaeróbias, o NADH gerado na glicólise não pode ser reoxidado pelo oxigênio, mas é reoxidado a NAD^+ pelo próprio piruvato, convertendo piruvato a lactato.

Na via heterofermentativa, glicose-6-fosfato é oxidada a ácido 6-fosfoglicônico, que é então oxidado e descarboxilado para formar pentose-fosfato. Após, pentose-fosfato é clivada a gliceraldeído-3-fosfato e acetilfosfato. Então, gliceraldeído-3-fosfato é convertido a ácido lático pelas mesmas enzimas da via Embden-Meyerhof. Esse ramo da via contém oxidação acoplada à redução enquanto 2 ATP são produzidos por fosforilação ao nível do substrato. Acetilfosfato é então reduzido em dois passos a etanol, que balanceia as duas oxidações anteriores à clivagem, mas não rende ATP. A eficiência é cerca da metade daquela da via homofermentativa. Na figura 5 estão exemplificadas as duas rotas (BIOSCIENCE NOTES, 2019).

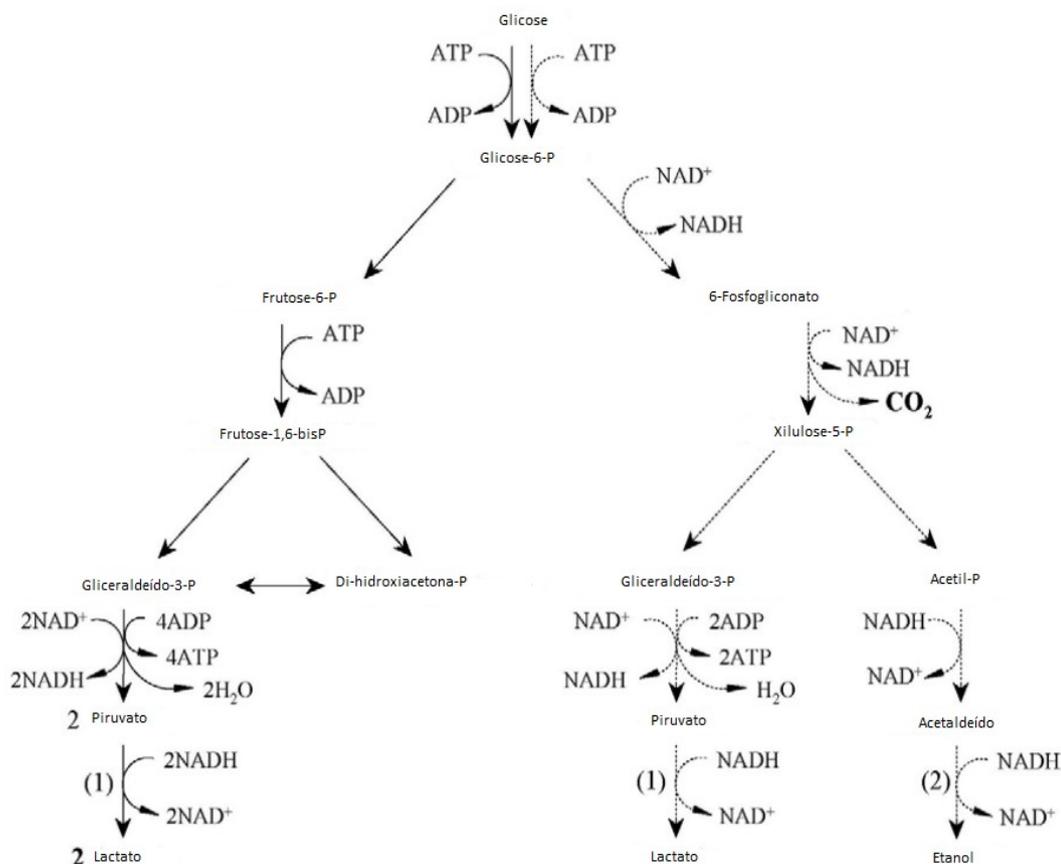


Figura 5. Rotas metabólicas homofermentativa (esquerda) e heterofermentativa (direita). P: fosfato; ADP: adenosina 5'-difosfato; ATP: adenosina 5'-trifosfato; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida); (1): lactato desidrogenase; (2): álcool desidrogenase (traduzido de WEE et al., 2006).

Dentre as bactérias homofermentativas encontram-se *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus maltaromicus*.

Dentre as bactérias heterofermentativas encontram-se *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus bifementans*, *Lactobacillus brevis* (KRISHNA et al., 2018; KÖLL-KLAIS et al., 2005; MILLER et al., 1974).

2.3 Substratos utilizados na produção

Dentre os materiais dos quais é possível produzir ácido láctico encontram-se: xarope de milho, trigo, cana-de-açúcar ou beterraba como fonte de carboidratos e milhocina, extrato de levedura e hidrolisado de soja como fonte de proteínas (DATTA et al., 1995). Também são utilizados materiais amiláceos e celulósicos, resíduos de agricultura (KRISHNA et al., 2018), melaço de cana-de-açúcar (CHAISSU et al., 2014), glicose, amido (BOMRUNGNOK et al., 2012). Na tabela 1 são dados exemplos de substratos com seus respectivos microrganismos utilizados na produção de ácido láctico.

Tabela 1. Exemplos de substratos utilizados na produção de ácido lático.

Material	Microrganismo	Referências
Amido de milho	<i>Rhizopus oryzae</i>	Yin et al., 1998
Vagem de alfarroba	<i>Rhizopus oryzae</i>	Bulut et al., 2004
Farelo de trigo	<i>Rhizopus oryzae</i>	Bulut et al., 2004
Melaço de beterraba	<i>Rhizopus oryzae</i>	Bulut et al., 2004
Farelo de trigo	<i>Lactobacillus amylophilus</i> GV6	Naveena et al., 2005
Milho	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Mercier et al., 1992
Palha de trigo	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Garde et al., 2002
Palha de trigo	<i>Lactobacillus brevis</i>	Garde et al., 2002
Bagaço de mandioca	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	John et al., 2006
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	John et al., 2006
Soja	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Kwon et al., 2000
Cevada	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Oh et al., 2005
Trigo	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Oh et al., 2005
Milho	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Oh et al., 2005
Grãos residuais de cervejaria	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Mussatto et al., 2007
Farinha de batata-doce	<i>Lactobacillus plantarum</i> MTCC 1407	Panda e Ray, 2008
Melaço de soja	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Montelongo et al., 1993
Lascas de madeira de carvalho	<i>Lactobacillus</i> sp. RKY2	Wee e Ryu, 2009
Farinha de trigo	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	Åkerberg e Zacchi, 2000
Espiga de milho	<i>Rhizopus</i> sp. MK-96-1196	Miura et al., 2004
Melaço de cana	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Farooq et al., 2012
Fécula de mandioca	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> IFO 12007	Roble et al., 2003
Leite desnatado com mel	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Chick et al., 2001
Leite desnatado com mel	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Chick et al., 2001
Leite desnatado com mel	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Chick et al., 2001
Leite desnatado com mel	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Chick et al., 2001
Maçã	<i>Lactobacillus casei</i>	Kourkoutas et al., 2005
Marmelo	<i>Lactobacillus casei</i>	Kourkoutas et al., 2005
Soro de queijo ultrafiltrado	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Roy et al., 1986
Resíduo de poda de parreira	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Fu e Mathews, 1999

2.4 Condições de operação

2.4.1 Efeito do pH

O pH é um fator que tem grande efeito sobre os microrganismos, uma vez que o crescimento celular podendo ser visto como resultado de reações enzimáticas. O centro ativo

de uma enzima contém grupos ionizáveis que devem estar na forma iônica apropriada para manter a conformação do centro ativo. O efeito do pH nas enzimas é devido à mudança no estado de ionização dos componentes do meio de acordo com a mudança do seu pH (TAN et al., 1998).

O pH ótimo para crescimento celular e rendimento de ácido lático varia, dependendo do substrato e do microrganismo utilizado. Durante a fermentação, o pH do meio vai se tornando mais baixo devido à produção de ácidos. Considerando que LAB crescem preferencialmente com pH entre 5 e 7, a acidificação excessiva do meio inibe a fermentação (MARTINEZ et al., 2013). Na tabela 2 são dados exemplos de pH otimizado de acordo com o microrganismo.

Tabela 2. pH ótimo para a produção de ácido lático de acordo com o material e o microrganismo utilizado.

Material	Microrganismo	pH ótimo	Referências
Lactose	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5-6	Fu e Mathews, 1999
Resíduo líquido de abacaxi	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	6,5	Idris e Suzana, 2006
Permeado de soro de queijo com extrato de levedura	<i>Lactobacillus helveticus</i>	5,5	Schepers et al., 2002; Norton et al., 1994
Grãos residuais de cervejaria	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	6,0	Mussatto et al., 2008
Farinho de trigo integral	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	6,0	Åkerberg et al., 1998
Soro	<i>Lactobacillus casei</i> NBIMCC 1013	6,5	Panesar et al., 2010
Soro de queijo ultrafiltrado	<i>Lactobacillus helveticus</i>	5,9	Roy et al., 1986
Soro	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	5,5	Büyükkileci e Harsa, 2004
Permeado de soro	<i>Lactobacillus casei</i>	5,5	Tuli et al., 1984
Glicose	<i>Lactobacillus casei</i>	6,0	Yoo et al., 1996

2.4.2 Efeito da temperatura

A atividade enzimática e a manutenção celular dos microrganismos é dependente da temperatura (GARG e JAIN, 1995). Em altas temperaturas há degradação celular e em baixas há redução da atividade metabólica (MACHADO, 2018). A maioria das LAB possui uma faixa característica de temperatura na qual elas podem crescer, mas elas não crescem na mesma taxa em toda essa faixa (IDRIS e SUZANA, 2006). A temperatura ótima de crescimento para a maioria das LAB fica entre 20 °C e 45 °C (MARTINEZ et al., 2013).

Åkerberg et al. (1998) estudaram a influência da temperatura na fermentação da glicose proveniente de farinha de trigo integral por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435, concluindo que em temperaturas superiores a 30 °C, aumentava a formação de subprodutos e D-(-)-ácido lático, isso pode acontecer porque as enzimas D- e L-lactato desidrogenase possuem diferentes pH ótimos (BOBILLO e MARSHALL, 1992). A tabela 3 mostra a temperatura ótima de crescimento de microrganismo de acordo com o material a ser fermentado.

Tabela 3. Temperatura ótima de crescimento de microrganismos de acordo com o material a ser fermentado.

Material	Microrganismo	Temperatura ótima (°C)	Referências
Resíduo líquido de abacaxi	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	37	Idris e Suzana, 2006
Farinha de trigo integral	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	33,5	Åkerberg et al., 1998
Glicose	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	37	Hujanen e Linko, 1996
Glicose	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> NRRL B-445	37	Hujanen e Linko, 1996
Bagaço de mandioca	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	37	John et al., 2006
Amido	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	28-35	Yumoto e Ikeda, 1995
Amido de cevada	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	37	Linko e Javanainen, 1996
Fécula de sagu	<i>Enterococcus faecium</i>	30	Shibata et al., 2007
Amido de batata	<i>Rhizopus oryzae</i> 2062	30	Huang et al., 2005
Amido de batata	<i>Rhizopus arrhizus</i> 36017	30	Huang et al., 2005

2.4.3 Efeito da aeração

Sendo a fermentação um processo anaeróbico, é de se esperar que a produção de ácido láctico seja maior em condições de ausência de oxigênio.

Em fermentação batelada de lactose usando *Lactobacillus plantarum*, uma bactéria anaeróbia facultativa, a fermentação anaeróbia resultou em rendimento de ácido láctico de 2,3 vezes o rendimento para fermentação aeróbia (FU e MATHEWS, 1999).

Rogers e Whittier (1928), estudando o efeito da aeração na fermentação do leite, concluíram que em uma cultura mantida a pH constante, a aeração aumenta a população bacteriana, aumentando o tempo da fermentação de maneira correspondente, com isso

podendo se dever à oxidação ou volatilização de compostos inibitórios ou ao aumento do suprimento de oxigênio.

Bobillo e Marshall (1991), no estudo da fermentação de polpa de azeitona por *Lactobacillus plantarum* H4 em condições anaeróbias e aeróbias, concluíram que na fermentação anaeróbia o principal ácido produzido foi o lático (83,6%), enquanto na aeróbia, foi o acético (59,6%). Em culturas aeradas, após a exaustão da glicose, há um aumento na quantidade de ácido acético. Murphy et al. (1985) sugeriram que isso pode ser explicado por um caminho dependente do oxigênio que gera ácido acético às custas do ácido lático acumulado no meio.

2.4.4 Efeito da fonte de carbono

Na produção de ácido lático por LAB, a fermentação é facilitada quando um açúcar puro é fermentado, mas isso não é viável economicamente, então são utilizados como substratos resíduos madeireiros e de agricultura.

A biomassa lignocelulósica utilizada como substrato consiste principalmente de glicose, galactose, manose, xilose e arabinose e precisa ser hidrolisada a monômeros para ser fermentável (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Após testes com diferentes LAB, Boontim et al. (2016) chegaram à conclusão que a glicose é a melhor fonte de carbono para a produção de ácido lático em relação à frutose, lactose, manose, sacarose e xilose. Também investigaram a influência da concentração de glicose chegando ao valor de 2% como melhor resultado.

2.4.5 Efeito da fonte de nitrogênio

A adição de nutrientes em concentrações mais altas geralmente tem efeito positivo sobre a produção de ácido lático (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000). Boontim et al. (2016) concluíram que o aumento de 1 para 2% na concentração de extrato de carne no meio MRS não influenciou na produção de ácido lático.

Hujanen e Linko (1996), na fermentação de meio de cultivo por *Lactobacillus casei*, estudando a substituição do extrato de levedura como fonte de nitrogênio por diversos outros materiais, concluíram que a produção de ácido láctico é muito influenciada pela concentração inicial de nitrogênio. Materiais baratos, subprodutos industriais como malte germinado (resíduo de cervejaria) e extrato de capim (resíduo do processo de ensilagem) mostraram-se boas fontes de nitrogênio. Hidrolisado de caseína como única fonte não mostrou bons resultados.

3 Materiais e métodos

3.1 Microrganismos

Neste estudo, cinco linhagens de lactobacilos foram testadas para a produção de ácido lático em meio sintético MRS. Os estoques de microrganismos foram mantidos em meio MRS com 50 % de glicerol, em *freezer* a -20 °C no Labio, situado no departamento de Engenharia Química da UFRGS. As cinco linhagens testadas foram obtidas do Banco de cepas do BiotecLab, situado no ICTA, UFRGS. Estas linhagens eram: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus maltaromicus*. As linhagens foram cultivadas em meio MRS a 37 °C, 150 rpm, durante 24 horas. Após foram repicadas para placas contendo meio MRS sólido e mantidas sob refrigeração para posterior uso. A tabela 4 apresenta o meio MRS usado. Ao meio MRS sólido foi adicionado 15 g.L⁻¹ de ágar.

Tabela 4. Formulação do meio MRS.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Glicose	20
Acetato de sódio	5
Polissorbato 80	1
Fosfato de potássio	2
Citrato de amônio	2
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de Manganês	0,05

3.2 Seleção de lactobacilos produtores de ácido lático

A fim de avaliar o consumo de açúcares e a produção de ácido lático, foi realizada uma seleção com os cinco microrganismos citados no item 3.1. O meio MRS foi modificado com o intuito de simular os açúcares presentes em hidrolisado ácido de soja, ao qual será feita posterior comparação, com a linhagem selecionada nesta seção. Os ensaios de fermentação foram realizados em agitador orbital em Erlenmeyers de 125 mL, com volume útil de meio

fermentativo de 60 mL. Quanto à oxigenação dos meios de cultura, os Erlenmeyers foram vedados com buchas de algodão permeáveis ao oxigênio, simulando uma condição de microaerofilia, com agitação de 150 rpm e temperatura de 37 °C. O meio MRS modificado utilizado está apresentado na tabela 5. Os ensaios foram realizados em simplificada.

Tabela 5. Formulação do meio MRS modificado.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Peptona	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Glicose	5
Xilose	7,5
Arabinose	7,5
Acetato de sódio	5
Polissorbato 80	1
Fosfato de potássio	2
Citrato de amônio	2
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de Manganês	0,05

O inóculo foi realizado com os microrganismos citados no item 3.1, os quais cresceram *overnight* em meio de cultura líquido (MRS). Após este período foi medida a densidade óptica a 600 nm e foi realizada a padronização do inóculo para densidade óptica igual a 1,0. Utilizou-se volume de inóculo igual a 5 % do volume do meio de fermentação. A biorreação foi monitorada por 48 horas, com amostras sendo coletadas nos tempos 0 h, 12 h e 24 h para posterior análise de açúcares e medida da densidade óptica e pH.

3.3 Planejamento experimental

Após a seleção do microrganismo, com o objetivo de otimizar a produção de ácido láctico, foi feito um estudo através do delineamento central composto rotacional (DCCR), com 10 ensaios. O esquema utilizado foi um fatorial completo 2² com 4 pontos axiais e 2 pontos centrais. A tabela 6 mostra as variáveis reais e codificadas usadas no planejamento.

Tabela 6. Valores utilizados no DCCR para produção de ácido lático.

Variável	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Temperatura (°C)	30	31	34	36	38
Agitação (rpm)	100	115	150	185	200

Os experimentos foram feitos em triplicata em Erlenmeyers de 125 mL contendo 60 mL de volume total, com meio MRS modificado conforme descrito na tabela 7, 5% de inóculo em volume e mantidos em agitador orbital por 24 horas. Devido à falta de reagente, a concentração de arabinose foi diminuída.

Tabela 7. Formulação do meio MRS modificado utilizado no planejamento experimental.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Glicose	5
Xilose	7,5
Arabinose	4,5
Acetato de sódio	5
Polissorbato 80	1
Fosfato de potássio	2
Citrato de amônio	2
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de Manganês	0,05

3.4 Ensaios de fermentação

Os ensaios de fermentação foram realizados em agitador orbital em Erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de meio fermentativo de 125 mL, simulando uma condição de microaerofilia. Os Erlenmeyers foram vedados com buchas de algodão permeáveis ao oxigênio, com agitação de 150 rpm visando a transferência de oxigênio para os meios de cultura. Avaliou-se a fermentação do ensaio com meio MRS modificado e com hidrolisado de casca de soja separadamente com o lactobacilo selecionado no item 3.2, à temperatura de 37 °C. Ambos os ensaios foram realizados em duplicata. O hidrolisado foi obtido por doação do BiotecLab, no ICTA, UFRGS.

O inóculo foi realizado com o microrganismo selecionado no item 3.2, o qual cresceu *overnight* em meio de cultura MRS líquido. Após, o meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos, a 4 °C e 3000 ×g, retirando o sobrenadante que possivelmente continha produtos de fermentação. As células centrifugadas foram ressuspensas (diluídas) em solução salina (0,9% m/V) estéril e após nova centrifugação, foram ressuspensas em meio de cultura estéril (MRS), para ajustar a densidade ótica (DO) igual a 1, e inoculadas nos Erlenmeyers contendo os hidrolisados e o meio MRS modificado. Utilizou-se volume de inóculo igual a 5 % do volume do meio de fermentação. A biorreação foi monitorada pela retirada de uma alíquota de 5 ml a cada 4 horas nas primeiras 12 horas de cultivo e após, o mesmo volume foi retirado em diferentes intervalos até atingir o tempo final de cultivo que foi de 30 horas para o meio MRS modificado e 48 para o meio com hidrolisado.

3.5 Metodologia analítica

3.5.1 Formação de produtos e consumo de açúcares

A concentração de produtos de fermentação (ácido láctico e ácido acético) e açúcares foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando o equipamento da marca *Shimadzu* equipado com detector de índice de refração (RID-10A). A coluna utilizada foi Aminex HPX-87H (300×7,8 mm, Bio-Rad, EUA) e como fase móvel foi utilizada uma solução de H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹. Para a quantificação do consumo de açúcares e dos produtos utilizou-se as condições de 45 °C e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

As amostras coletadas do meio de fermentação foram preparadas para cromatografia por centrifugação a 4 °C e 3000 ×g por 15 minutos, a fim de precipitar as células em suspensão, procedendo-se então a filtração da porção sobrenadante em filtro *Holder* (para amostras contendo hidrolisado) com membranas de acetato de celulose (porosidade de 0,22 µm; Sartorius, Alemanha). Para todas as análises por HPLC, padrões de ácido láctico, ácido acético, glicose, xilose e arabinose, com pureza de cromatografia (superior a 99,5 %) foram utilizados.

3.5.2 Crescimento celular

As concentrações celulares foram determinadas pela medida da densidade óptica em espectrofotômetro (T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments, Inglaterra) no comprimento de onda de 600 nm. Para controle (branco) foi utilizada uma amostra de meio MRS modificado estéril. Nos casos em que a densidade óptica ultrapassou o valor 1,0, as amostras foram diluídas com meio MRS estéril e o valor da densidade óptica multiplicado pelo fator de diluição correspondente a fim de manter a linearidade.

3.5.3 Medida de pH

Cada amostra teve seu pH medido em pHmetro (DM-22, Digimed, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de pH igual a 4,0; 7,0 e 10.

3.5.4 Cálculos

A conversão de ácido lático foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$Y_{PS} = P / (S_0 - S) \quad (1)$$

Sendo:

Y_{PS} a conversão de substrato em produto (rendimento), em g.g^{-1} ;

P a quantidade de ácido lático produzido ao fim da fermentação, em g.L^{-1} ;

S_0 a concentração de açúcares no início da fermentação, em g.L^{-1} ;

S a concentração de açúcares ao fim da fermentação, em g.L^{-1} .

Para o cálculo da produtividade, foi utilizada a Equação 2:

$$Q_P = P / t \quad (2)$$

Sendo:

Q_P a produtividade, em $g.(L.h)^{-1}$;

t o tempo de fermentação, em h.

4 Resultados e discussão

4.1 Escolha do microrganismo

No primeiro ensaio fermentativo, o objetivo foi escolher o microrganismo melhor produtor de ácido lático dentre as 5 cepas estudadas, levando em consideração o consumo dos três açúcares e o rendimento de ácido lático. O meio utilizado foi o MRS modificado e o tempo de fermentação foi de 48 horas.

Os resultados são mostrados na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos do ensaio fermentativo em meio MRS modificado, com Y_{PS} sendo calculado após 48 horas de fermentação.

Microrganismo	Glicose consumida (%)	Xilose consumida (%)	Arabinose consumida (%)	Ácido lático máx. (g.L ⁻¹)	Ácido acético máx. (g.L ⁻¹)	Y_{PS} (g.L ⁻¹)
<i>L. plantarum</i>	89,44	0,00	4,94	7,05	4,35	1,23
<i>L. delbrueckii</i>	100	0,00	0,35	6,68	4,49	1,38
<i>L. sp.</i>	83,09	85,08	11,15	6,98	6,28	0,72
<i>L. salivarius</i>	100	85,62	10,91	2,58	9,01	0,20
<i>L. maltaromicus</i>	100	12,63	7,41	6,08	4,33	0,86

Analisando os resultados do ensaio de fermentação para as 5 cepas, conclui-se que *L. delbrueckii*, *L. salivarius* e *L. maltaromicus* utilizaram toda a glicose em 48 horas, mas *L. delbrueckii* não consumiu xilose e *L. maltaromicus* consumiu pouco. É importante destacar que *L. salivarius* consumiu toda a glicose em 48 horas e teve um grande consumo de xilose e um consumo razoável de arabinose. *L. sp.*, apesar de não ter consumido toda a glicose, também consumiu a maior parte da xilose e teve um consumo razoável de arabinose. *L. plantarum* e *L. delbrueckii*, apesar de apresentarem os melhores rendimentos, consumiram basicamente glicose.

Levando em conta que *L. sp.* e *L. salivarius* consumiram a maior parte da xilose e um pouco de arabinose, e comparando o rendimento de ácido lático para esses dois microrganismos, nota-se que *L. sp.* possui um rendimento maior que *L. salivarius*, que apresentou uma grande produção de ácido acético. Esse baixo rendimento pode ser explicado pela exaustão da glicose no meio de cultura. No curso da fermentação, o ácido lático vai acumulando no meio enquanto a glicose vai sendo consumida e quando ela é exaurida, a concentração de ácido lático vai diminuindo e a de ácido acético vai aumentando junto com

um aumento no pH e na biomassa, indicando que a conversão de ácido lático em acético fornece a energia necessária para a multiplicação celular (MURPHY et al., 1985).

Considerando que o hidrolisado de casca de soja possui uma quantidade considerável de xilose e arabinose, cerca de 20 g.L⁻¹ e 15 g.L⁻¹, respectivamente, *L. sp.* foi escolhido para o seguimento do trabalho, já que conseguiu utilizar boa parte da xilose e produziu ácido lático com um rendimento maior que *L. salivarius*.

4.2 Planejamento experimental

Os ensaios experimentais com os resultados para concentração de ácido lático estão apresentados na tabela 9, outros resultados encontram-se no Apêndice A. Nota-se que, de acordo com a temperatura e a agitação, a concentração de ácido lático após 24 horas variou de 6,99 g.L⁻¹ a 7,88 g.L⁻¹.

Ao fim da fermentação foram retiradas amostras de cada ensaio para se determinar a concentração de ácido lático e ácido acético, além do pH e da DO. Todos os ensaios iniciaram com pH 5,51.

Tabela 9. Planejamento experimental, valores codificados e originais das variáveis de estudo (temperatura e agitação) e concentração final de ácido lático.

Ensaio	Temperatura	Agitação	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Ácido lático (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	31	115	6,99
2	-1	+1	31	185	7,67
3	+1	-1	36	115	7,31
4	+1	+1	36	185	7,43
5	0	0	34	150	7,67
6	0	0	34	150	7,72
7	+√2	0	38	150	7,63
8	-√2	0	30	150	7,63
9	0	+√2	34	200	7,88
10	0	-√2	34	100	7,48

Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos envolvendo microrganismos, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$). Assim não foram significativos o termo quadrático da agitação e o termo linear da temperatura. Como a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo não foi boa, cerca

de 66%, conclui-se que o modelo não se ajusta bem aos dados experimentais. A figura 6 apresenta o diagrama de Pareto gerado no planejamento.

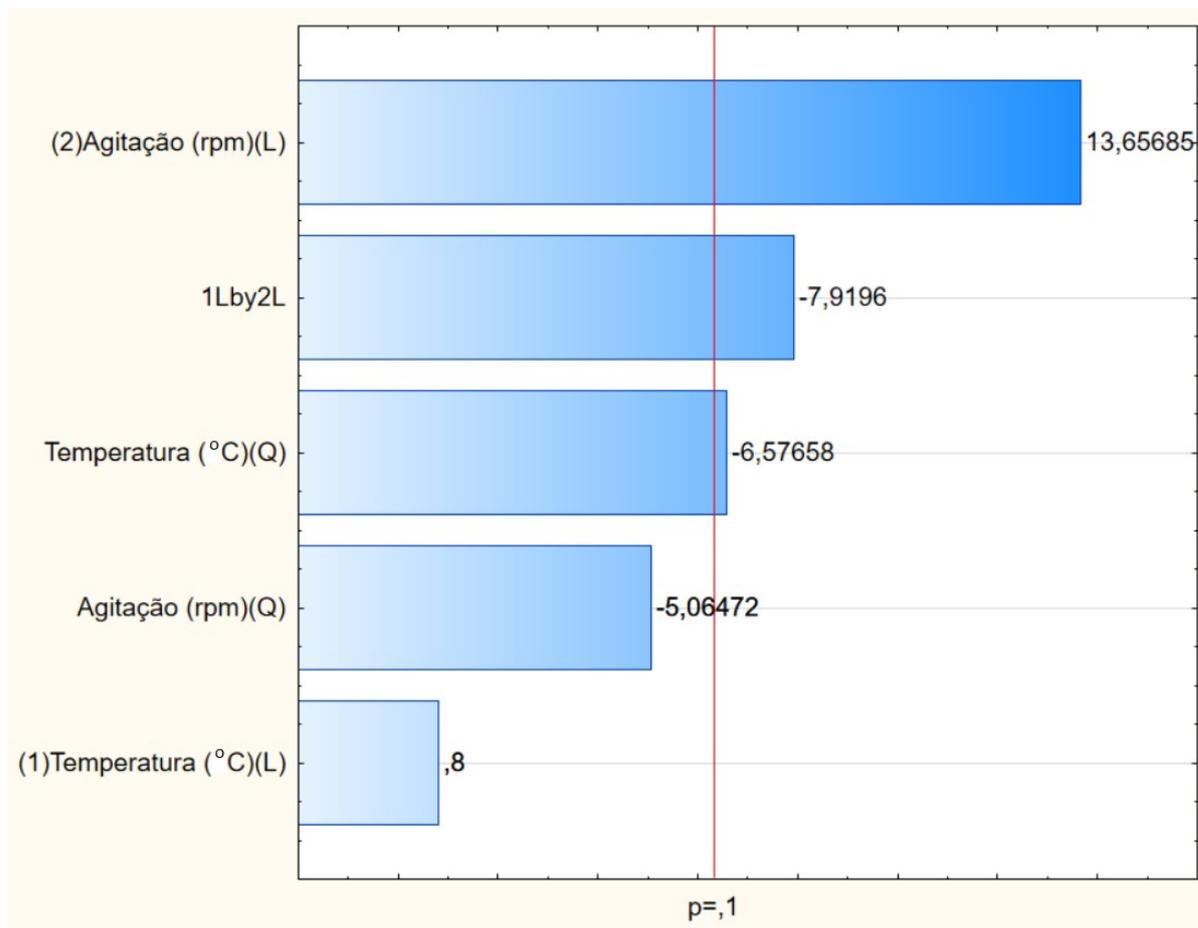


Figura 6. Diagrama de Pareto.

Não houve diferença significativa para a produção de ácido lático, sendo assim, não foi possível determinar qual a melhor condição de agitação e temperatura para otimização do processo, de modo que dados da literatura foram coletados para o prosseguimento dos experimentos.

Baseado nos trabalhos de Boontim et al. (2016), Idris e Suzana (2006) e Javanainen e Linko (1995), que otimizaram a produção de ácido lático a partir de cultivo com lactobacilos, foi escolhida a temperatura de 37 °C e a agitação de 150 rpm.

4.3 Cinética

Visando estudar o comportamento de *Lactobacillus* sp. durante o curso da

fermentação, foi feito um acompanhamento do processo, primeiro em meio sintético e após, em hidrolisado de casca de soja, com retirada de alíquotas a cada determinado tempo com o objetivo de se estabelecer os parâmetros cinéticos.

A composição de açúcares do meio MRS modificado, antes da autoclave está descrita na tabela 10.

Tabela 10. Composição de açúcares inicial do meio MRS modificado.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	5
Xilose	10
Arabinose	5

A baixa concentração de glicose no meio foi escolhida para diminuir os efeitos da repressão catabólica. As concentrações de xilose e arabinose foram escolhidas pensando na quantidade desses açúcares possivelmente presente no hidrolisado de casca de soja. A cinética dos ensaios em duplicata está apresentada nas figuras 7 e 8.

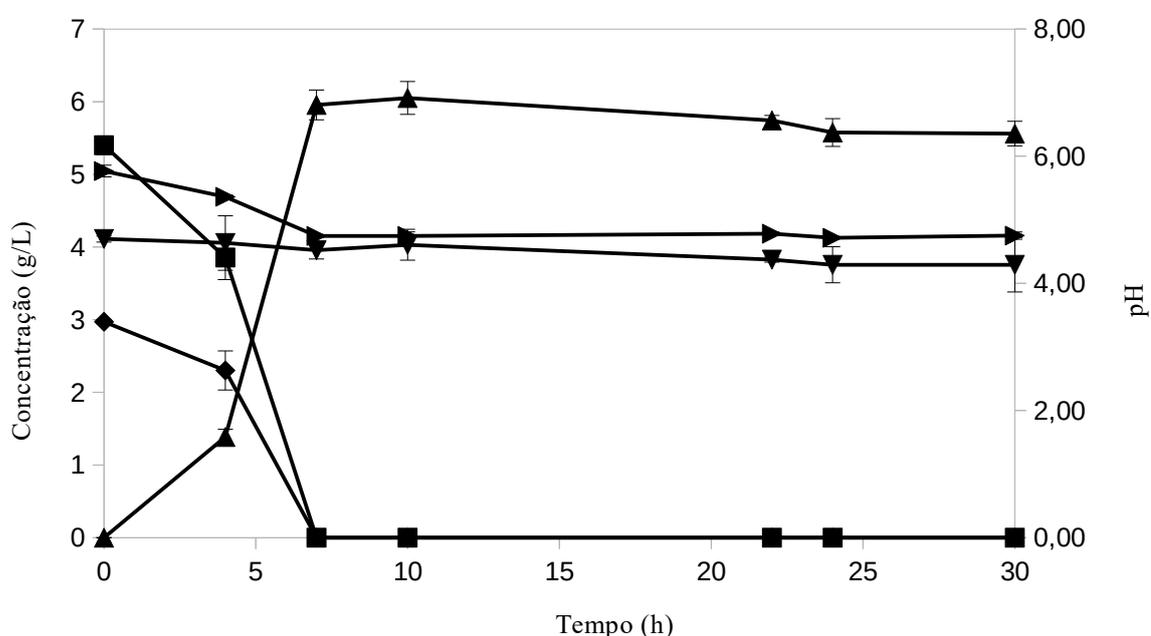


Figura 7. Cinética de consumo de açúcares e produção de ácido lático em meio MRS modificado, à temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm com *Lactobacillus* sp. (-■-) glicose, (-◆-) xilose, (-▼-) arabinose, (-▲-) ácido lático, (-▶-) pH.

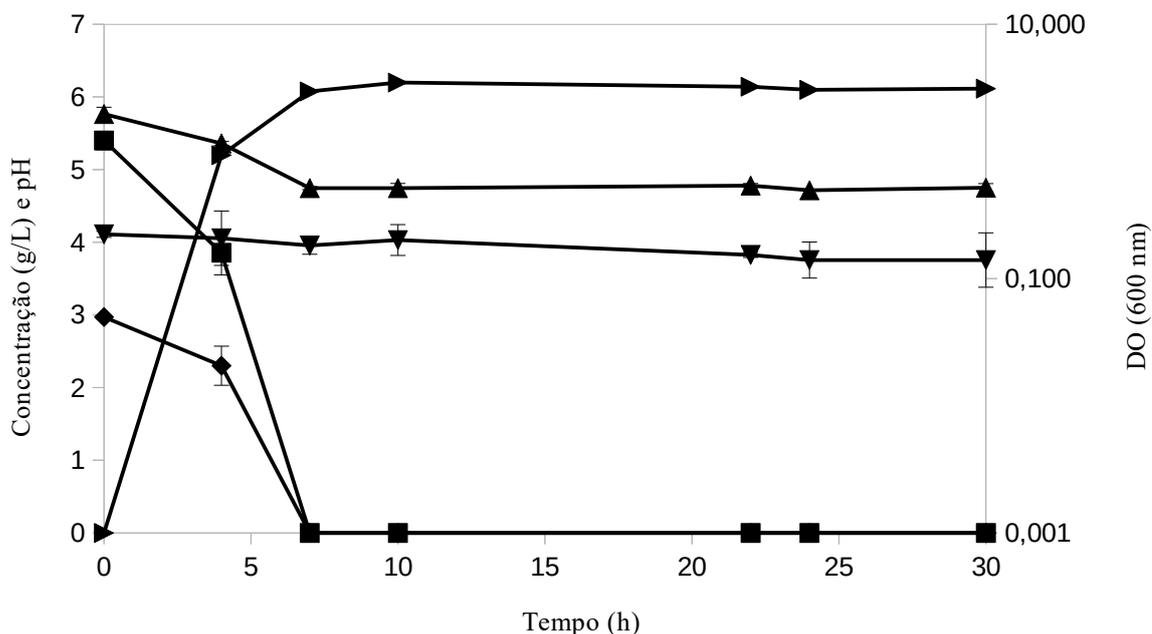


Figura 8. Cinética de consumo de açúcares em meio MRS modificado, à temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm com *Lactobacillus* sp. (-■-) glicose, (-◆-) xilose, (-▼-) arabinose, (-▲-) pH, (-►-) DO.

Analisando a cinética do meio MRS com os três açúcares, nota-se que houve erro experimental, já que no início da fermentação havia cerca de 3 gramas de xilose no meio, e não 10 gramas, como havia sido determinado. Isso pode ter acontecido devida a erro na pesagem ou falha na manipulação da amostra antes da passagem em cromatografia líquida.

Nota-se também, que em 7 horas, *Lactobacillus* sp. consumiu toda a glicose, isto ocorre porque a glicose é uma fonte de carbono facilmente acessível para o microrganismo e o meio MRS é um meio ótimo de crescimento. Merece destaque o fato de que ele foi capaz de consumir toda a xilose em 7 horas, o que é um resultado satisfatório porque no hidrolisado de casca de soja há bastante xilose. Já o consumo de arabinose foi baixo, como já havia sido observado na etapa de escolha do microrganismo. Isso pode ocorrer devido à repressão catabólica da glicose.

A descoberta ou desenvolvimento de microrganismos capazes de utilizar simultaneamente os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos têm sido um desafio nos últimos anos, devido a problemas relacionados à repressão catabólica da glicose e/ou xilose. Xia et al. (2012), utilizou uma cepa de *Escherichia coli* geneticamente modificada que foi capaz de metabolizar glicose, xilose e arabinose provenientes de hidrolisado lignocelulósico de maneira simultânea.

Para se determinar a composição inicial do hidrolisado de casca de soja, foram coletadas duas amostras do meio e as concentrações de açúcares foram determinadas em HPLC. Os resultados estão demonstrados na tabela 11.

Tabela 11. Composição de açúcares inicial do hidrolisado de casca de soja.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	6,51 ± 0,08
Xilose	21,27 ± 0,22
Arabinose	15,63 ± 0,02

O aperfeiçoamento do processo de fermentação da arabinose é importante, já que este açúcar está presente em grande quantidade em diferentes hidrolisados ácidos, como o de palha de arroz e casca de soja. Na tabela 12 constam as concentrações referentes à glicose, xilose e arabinose em variados tipos de hidrolisados ácidos.

Tabela 12. Composição parcial de diferentes hidrolisados ácidos.

Hidrolisado ácido	Glicose (g.L⁻¹)	Xilose (g.L⁻¹)	Arabinose (g.L⁻¹)	Referências
Eucalipto	0,63	12,34	0,84	Villarreal et al., 2006
Bagaço de cana-de-açúcar	107,3	62,9	4,2	Zha et al., 2012
Serragem de carvalho	90,9	42,3	1,8	Zha et al., 2012
Palha de arroz	15,5	84,3	17,1	Huang et al., 2009
Casca de soja	1,52	28,57	27,3	Schirmer-Michel et al., 2008

A avaliação dos parâmetros cinéticos da fermentação do hidrolisado de casca de soja foi feita de maneira similar àquela da fermentação do meio sintético. Os resultados encontram-se na figura 9.

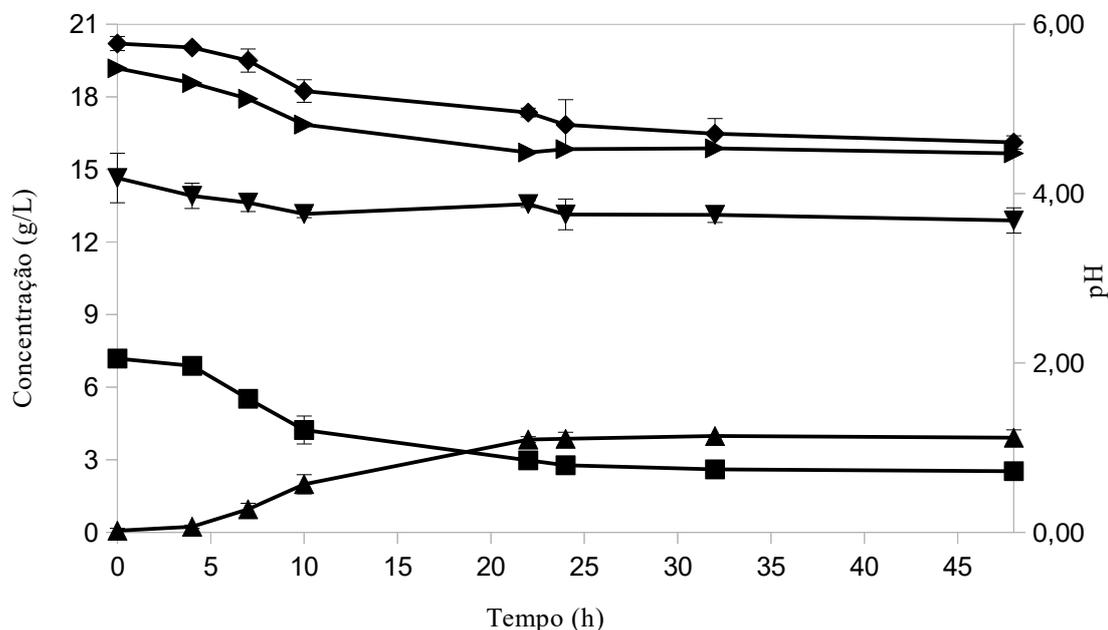


Figura 9. Cinética de produção do ácido lático em hidrolisado de casca de soja, à temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm com *Lactobacillus* sp. (-■-) glicose, (-◆-) xilose, (-▼-) arabinose, (-▲-) ácido lático, (-►-) pH.

No hidrolisado de casca de soja, a DO não foi medida porque a grande turbidez do meio causada pela presença de vários compostos presentes nele após o processo de hidrólise dificulta essa determinação.

Analisando a cinética, nota-se que o consumo dos três açúcares por *Lactobacillus* sp. ocorreu de maneira parecida, ao contrário do meio sintético, onde toda a glicose e xilose foram consumidas, mas a concentração de arabinose pouco variou. Isso pode ser explicado pela baixa repressão catabólica da glicose, já que ela estava presente no meio em concentração bem mais baixa do que xilose e arabinose. Nota-se também que o consumo dos açúcares ocorreu de forma muito mais lenta do que no meio MRS modificado, isso pode se dever à grande pressão osmótica do meio e à presença de compostos inibitórios.

Durante o processo de hidrólise de resíduos lignocelulósicos, muitos compostos inibitórios do crescimento bacteriano podem se formar, como ácidos, furfural, HMF e compostos fenólicos. A formação desses compostos está relacionada com a temperatura e o tempo da hidrólise, além da concentração de ácido utilizada (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000).

No início dos dois cultivos, o pH foi mantido em 6,5. Após a autoclave, há uma redução nesse valor. No progresso da fermentação, é possível observar uma diminuição do valor do pH. Esse fato é condizente com a produção de ácido lático e acético.

Observando-se os valores de pH e DO, nota-se também que a fermentação cessa em 7 horas no meio MRS e em 22 horas no hidrolisado, ou seja, esse é o tempo que leva para o cultivo atingir o estado estacionário. Esses resultados coincidem com a concentração de ácido lático, que se mantém constante a partir desses mesmos pontos.

Na tabela 13 há uma comparação entre os parâmetros cinéticos da fermentação do meio MRS e do hidrolisado.

Tabela 13. Consumo de açúcares e produção de ácidos na fermentação do meio MRS modificado e do hidrolisado de casca de soja.

Meio de cultivo	Glicose consumida (%)	Xilose consumida (%)	Arabinose consumida (%)	Ácido lático máx. (g.L ⁻¹)	Ácido acético máx.(g.L ⁻¹)	Y _{PS} (g.g ⁻¹)	Q _P [g.(L.h) ⁻¹]
MRS modificado	100,00	100,00	8,64	6,05	1,85	0,64	0,19
Hidrolisado de casca de soja	64,79	20,24	11,98	3,98	1,70	0,06	0,08

No hidrolisado, o consumo de glicose e xilose foi menor, mas o de arabinose foi maior em comparação ao meio sintético, isso pode se dever à maior concentração de arabinose em relação à glicose no hidrolisado, diminuindo assim, os efeitos da repressão catabólica.

Os menores valores de rendimento e produtividade do hidrolisado em relação ao meio sintético também podem ser explicados devido à presença de compostos inibitórios no meio, provenientes do processo de hidrólise. Esses efeitos de inibição podem ser contornados com a escolha adequada do microrganismo e do substrato a serem utilizados na fermentação, além do uso de um processo de hidrólise e pós-tratamento do hidrolisado que gere a menor quantidade possível desses compostos.

Garde et al., utilizando *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus brevis*, demonstrou que não houve inibição na produção de ácido lático na fermentação da xilose adicionada a hidrolisado de palha de trigo que foi tratado por oxidação úmida.

Em linhas gerais, a fermentação do hidrolisado de casca de soja resultou em concentração razoável de ácido lático ao fim do processo, apesar do maior tempo necessário para consumo dos açúcares em relação ao meio MRS modificado.

5 Conclusões e trabalhos futuros

Lactobacillus sp. mostrou-se capaz de produzir ácido láctico a partir do meio MRS, consumindo totalmente glicose e xilose e parcialmente arabinose com bons valores de rendimento e de maneira rápida. Também foi capaz de produzir ácido láctico a partir do hidrolisado de casca de soja, consumindo parcialmente tanto glicose quanto xilose e arabinose, mas de maneira mais lenta e com menor rendimento e produtividade.

A comprovação de que *Lactobacillus* sp. é capaz de metabolizar de maneira eficaz a xilose é importante quando se pensa na utilização desse microrganismo na fermentação de resíduos agrícolas, já que os hidrolisados provenientes desses resíduos possuem grande quantidade desse monossacarídeo.

Não houve diferença significativa quanto à produção de ácido láctico nas faixas de temperatura e agitação estudadas no planejamento.

Para projetos futuros, é necessário conhecer melhor o mecanismo de repressão catabólica da arabinose por parte da glicose e da xilose, para que o processo seja melhorado quanto ao consumo da arabinose, já que ela está presente em grande concentração nos resíduos lignocelulósicos. Sugere-se a detoxificação do meio, além da realização de experimentos com o uso de métodos contínuos, como batelada alimentada e biorreatores, já que nesses métodos, as condições de operação são controladas e pode-se controlar o processo de maneira a aumentar a produção de ácido láctico. Com relação ao planejamento experimental seria interessante utilizar uma faixa maior de temperatura no planejamento, a fim de avaliar melhor a interação entre as variáveis.

6 Referências

AGLIARDI, C. B., Produção Biotecnológica de 2,3-Butanodiol a partir de diferentes fontes de carbono. **Trabalho de Diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2018.

ÅKERBERG, C. et al., Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 682-690, 1998.

ÅKERBERG, C. e ZACCHI, G. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 119-126, 2000.

BERNARDO, M. P. et al., L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 640-646, 2016.

BINOTTO, N., Seleção de potenciais microrganismos produtores de 2,3-butanodiol utilizando diferentes meios sintéticos. **Trabalho de Diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2016.

BINTSIS T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. **Journal of Bacteriology and Micology**, v. 6, n. 2, p. 89-94, 2018.

BIOSCIENCE NOTES. Glycolysis. **Bioscience Notes**. Disponível em <<http://www.biosciencenotes.com/glycolysis/>>. Acesso em 26 jun. 2019.

BIOSCIENCE NOTES. Heterolactic (Phosphoketolase) Pathway. **Bioscience Notes**. Disponível em <<http://www.biosciencenotes.com/heterolactic-phosphoketolase-pathway/>>. Acesso em 26 jun. 2019.

BOBILLO, M. e MARSHALL, V. M. Effect of acidic pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose-limited continuous culture. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 67-70, 1992.

BOBILLO, M. e MARSHALL, V. M. Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. **Food Microbiology**, v. 8, p. 153-160, 1991.

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**, v. 2, p. 97-103, 2012.

BOONTIM, N. et al. Production of L-Lactic Acid by Thermotolerant Lactic Acid Bacteria. **Chiang Mai Journal of Science**. v. 45, n. 1, p. 68-76, 2018.

BULUT, S. et al., Effect of different carbon sources on L-(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 33-37, 2004.

- BURKERT, J. F. M. et al., Comparison of lipase by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 61-67, 2005.
- BUSTOS, G. et al., Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, p. 2105-2112, 2004.
- BUYÜKKILECI, A. O. e HARSA, S. Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 1036-1040, 2004.
- CHAISU, K. et al. Optimization Lactic Acid Production from Molasses Renewable Raw Material through Response Surface Methodology with *Lactobacillus Casei* M-15. **APCBEE Procedia**. v. 8, p. 194-198, 2014.
- CHICK, H. et al., Growth and Acid Production by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Grown in Skim Milk Containing Honey. **Journal of Food and Science**, v. 66, n. 3, 2001.
- DATTA, R. et al. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Review**, v. 16, p. 221-231, 1995.
- DATTA, R. e HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1119-1129, 2006.
- EITEMAN, M. A. e RAMALINGAM, S. Microbial production of lactic acid. **Biotechnol Lett**. v. 37, p. 955-972, 2015.
- FAROOQ, U. et al., Optimization of lactic acid production from cheap raw material: sugarcane molasses. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 1, p. 333-338, 2012.
- FU, W. e MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 163-170, 1999.
- GARDE, A. et al., Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 217-223, 2002.
- GARG, S. K. e JAIN, A. Fermentative Production of 2,3-Butanediol: A Review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 103-109, 1995.
- GHAFFAR, T. et al., Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 222-229, 2014.
- GIRAUD. E. et al., Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 96-99, 1991.

HAYNES, W. M., CRC Handbook of Chemistry and Physics. **CRC Press LLC**. Boca Raton, v. 95, p. 3-336, 2015.

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

HUANG, C. et al., Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4535-4538, 2009.

HUANG, L. P. et al., Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 265-276, 2005.

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

HU, Y. et al., Newly Developed Techniques on Polycondensation, Ring-Opening Polymerization and Polymer Modification: Focus on Poly(Lactic Acid). **Materials**, v. 9, n. 133, 2016.

IDRIS, A. e SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1117-1123, 2006.

JAVANAINEN, P. e LINKO, Y. Lactic acid fermentation on barley flour without additional nutrients. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n.8, p. 543-548, 1995.

JOHN, R. P. et al., Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 759-763, 2006.

KRISHNA, B. S. et al., Industrial production of lactic acid and its applications. **International Journal of Biotech Research**, v. 1, 2018.

KÖLL-KLAIS, P. et al., Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 354-361, 2005.

KOURKOUTAS, Y. et al., *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 411-416, 2005.

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

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

MACHADO, J. Produção biotecnológica de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisados de casca de soja. **Trabalho de Diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2018.

MARTINEZ, F. A. C. et al., Lactic acid properties, applications and production: A preview. **Trend in Food Science & Technology**, v. 30, p. 70-83, 2013.

MCDONALD, L. C. et al., A Differential Medium for the Enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, n. 6, p. 1382-1384, 1987.

MERCIER, P. et al., Kinetics of Lactic Acid Fermentation on Glucose and Corn by *Lactobacillus amylophilus*. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 55, p. 111-121, 1992.

MILLER, A. et al., *Lactobacillus maltaromicus*, a New Species Producing a Malty Aroma. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 24, n. 3, p. 346-354, 1974.

MIURA, S. et al., Production of L-Lactic Acid from Corn cob. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 3, p. 153-157, 2004.

MONTELONGO, S. et al., *Lactobacillus salivarius* for Conversion of Soy Molasses into Lactic Acid. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 863-866, 1993.

MURPHY, M. G. et al., Oxygen dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum*. **Archives of Microbiology**, v. 141, p. 75-79, 1985.

MUSSATTO, S. I. et al., Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnol Lett**, v. 29, p. 1973-1976, 2007.

MUSSATTO, S. I. et al., Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 437-444, 2008.

NARAYANAN, N. et al., L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, 2004.

NAVEENA, B. J. et al., Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 681-690, 2005.

NORTON, S. et al., Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 457-466, 1994.

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

OLIVEIRA, R. A. et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 219-239, 2018.

OLIVEIRA, R.A. et al. High lactic acid production from molasses and hydrolyzed sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, v. 50, p. 307-312, 2016.

O'NEIL, M. J., The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. **Royal Society of Chemistry**. Cambridge, p. 990, 2013.

PALMQVIST, E. e HAHN-HÄGERDAL, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000.

PANDA, S. H. e RAY, R. C. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 531-537, 2008.

PANDEY, A. et al., Current Advances in Solid-State Fermentations. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. 2018.

PANESAR, P. S. et al., Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PANESAR, P. S. et al., Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

ROBLE, N. D. et al., L-Lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*). **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1093-1098, 2003.

RODRIGUES, M. A. e IEMMA, A. F, **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1. ed. Campinas, Casa do Pão, 2005.

ROGERS, L. A. e WHITTIER, E. O. Limiting Factors in the Lactic Acid Fermentation, **Journal of Bacteriology**, v. 16, n. 4, p. 211-229, 1928.

ROY, D. et al., Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 206-213, 1986.

SCHEPERS, A. W. et al., *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 176-186, 2002.

SCHIRMER-MICHEL, A. C. et al., Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898-2904, 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**, v. 41, p. 149-155, 2007.

TAN, Y. Et al., Modelling pH Effects on Microbial Growth: A Statistical Thermodynamic Approach. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 59, n. 6, 1998.

TEUBER, M. Lactic Acid Bacteria. **Biotechnology: Biological Fundamentals**, v. 1, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993.

TULI, A. et al., Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 164-168, 1985.

U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, **PubChem**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 30 maio 2019, 21:11.

VILLARREAL, M. L. M. et al., Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 17-24, 2006.

VIDRA, A. et al. Lactic acid production from cane molasses. **Liquid Waste Recovery**, v. 2, p. 13-13, 2017.

WADA, M. et al. Bacterium Capable of Producing Acid Lactic, and Method for Producing Acid Lactic. **United States Patent**, 2013.

WEE, Y. e RYU, H. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4262-4270, 2009.

WEE, Y. et al. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 2, n. 44, p.163-172, 2006.

XIA, T. et al., Simultaneous utilization of glucose, xylose and arabinose in the presence of acetate by a consortium of *Escherichia coli* strains. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 77, 2012.

YIN, P. et al., L(+)-Lactic Acid Production by Repeated Batch Culture of *Rhizopus oryzae* in Air-Lift Bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 96-100, 1998.

YOO, I. et al., Effect of pH on the Production of Lactic Acid and Secondary Products in Batch Cultures of *Lactobacillus casei*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 482-486, 1996.

ZHA, Y. et al., Inhibitory Compounds in Lignocellulosic Biomass Hydrolysates during Hydrolysate Fermentation Processes. **Bioprocessing & Biotechniques**, v. 2, n. 1, 2012.

ZHOU, X. et al., Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 4309-4314, 2013.

APÊNDICE A – Dados do planejamento experimental

Na tabela 14, encontram-se os valores medidos de pH, DO e concentração de ácido láctico e acético no planejamento experimental.

Tabela 14. Valores de pH, DO e concentração de ácido láctico no planejamento experimental.

Ensaio	Temperatur a (°C)	Agitação (rpm)	pH	DO	Ácido láctico (g.L⁻¹)	Ácido acético (g.L⁻¹)
1	31	115	4,26	3,820	6,99	6,94
2	31	185	4,39	1,623	7,67	6,48
3	36	115	4,31	1,784	7,31	6,79
4	36	185	4,32	3,620	7,43	6,92
5	34	150	4,39	2,075	7,67	7,01
6	34	150	4,42	2,055	7,72	7,02
7	38	150	4,30	1,784	7,63	7,06
8	30	150	4,29	1,540	7,63	6,88
9	34	200	4,27	1,780	7,88	7,31
10	34	100	4,35	1,800	7,48	6,78

Nas figuras 10 e 11 estão as curvas de contorno e a superfície de resposta em função da temperatura e agitação para a produção de ácido lático gerada no planejamento experimental.

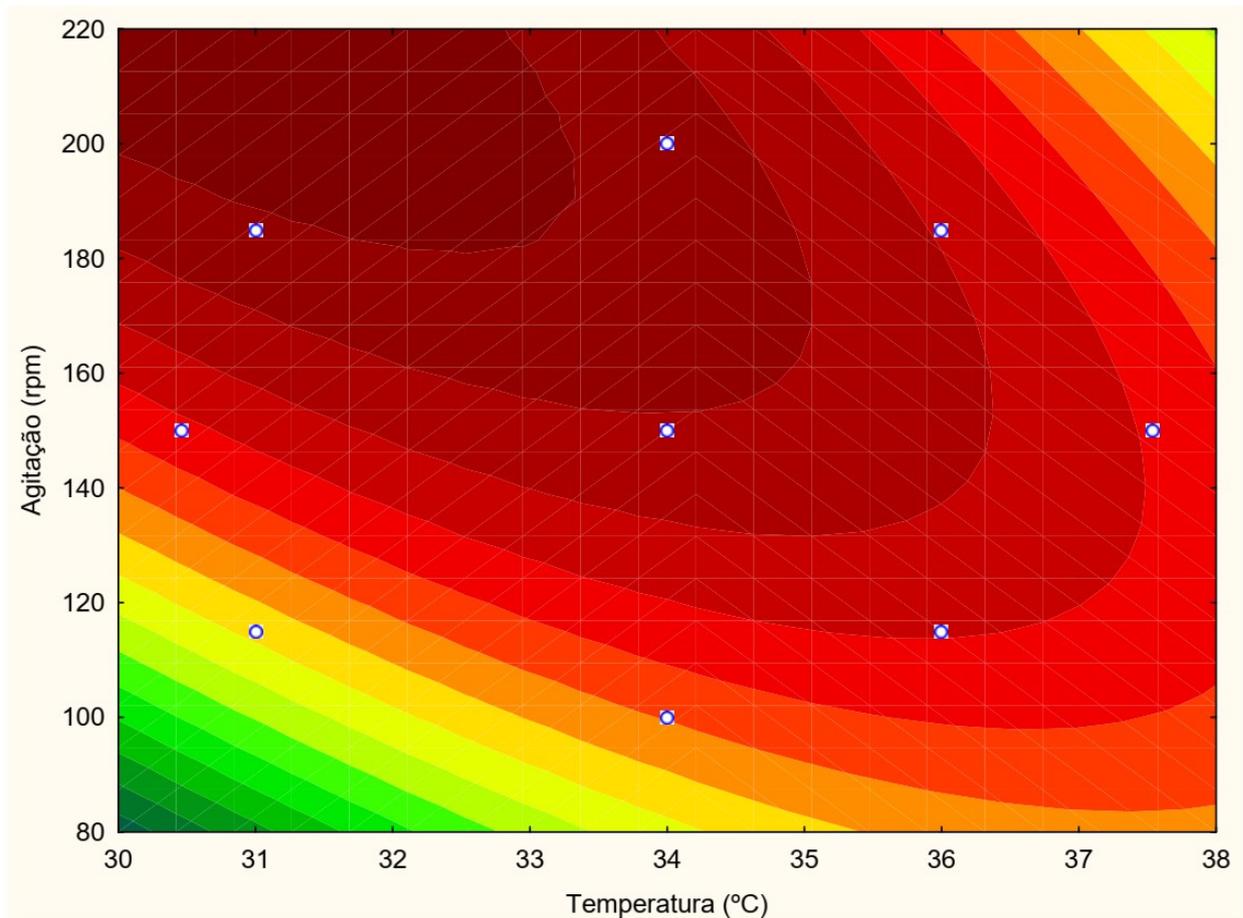


Figura 10. Curvas de contorno em função da temperatura e agitação para a produção de ácido lático.

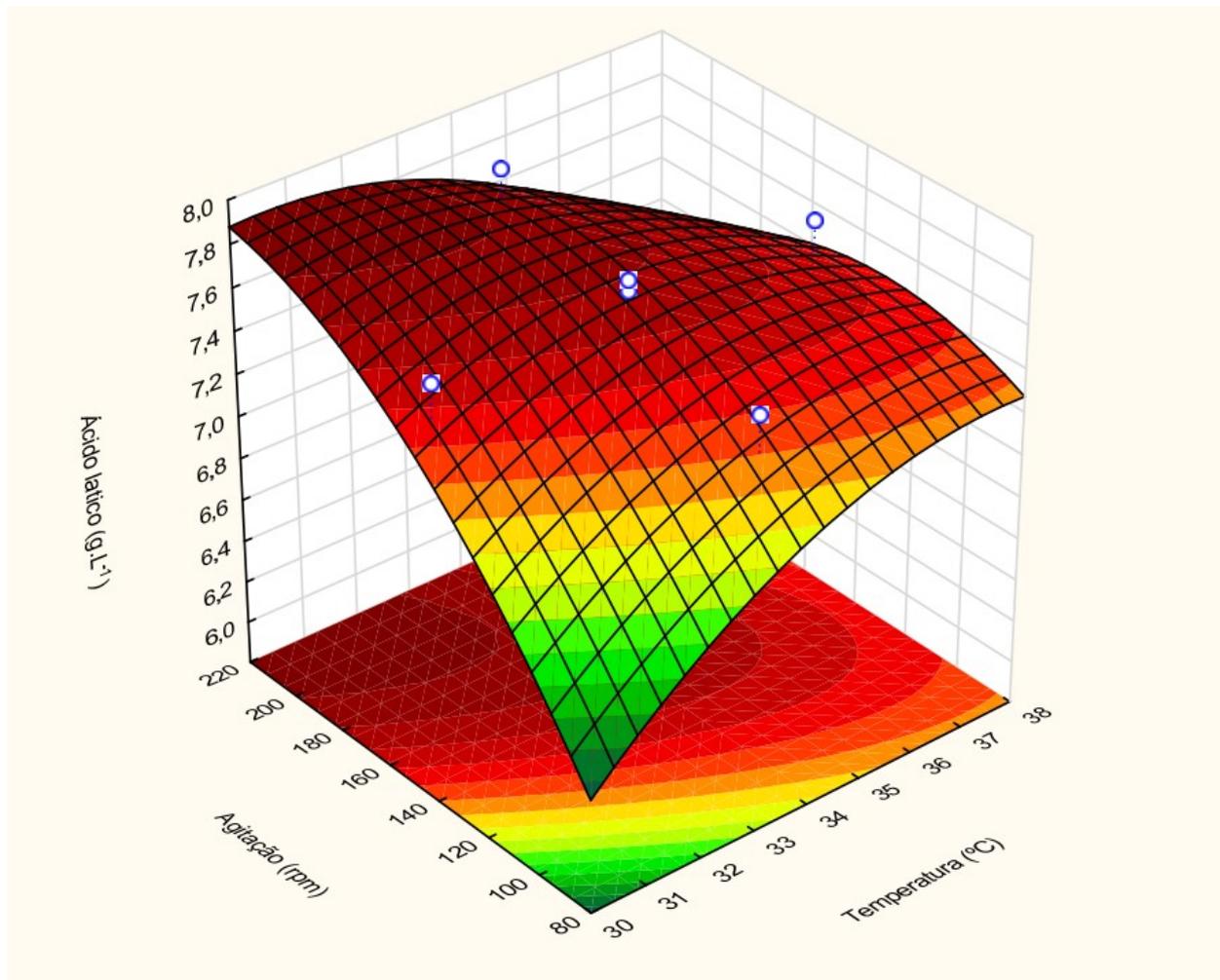


Figura 11. Superfície de resposta em função da temperatura e agitação para a produção de ácido láctico.