



## Screening de variáveis para a produção de biomassa e ácido lático utilizando planejamento Plackett-Burman

Sandriane PIZATO<sup>[1,\*]</sup>, Christiane Saraiva OGRODOWSKI<sup>[2]</sup> e Carlos PRENTICE-HERNÁNDEZ<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup> Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal de Rio Grande – (FURG) – Escola de Química e Alimentos. *Campus* Carreiros, Avenida Itália, km 08, Caixa Postal 474 – 96201-900, Rio Grande – RS – Brasil.

<sup>[2]</sup> Professora de programa de Pós Graduação em Engenharia Química – Universidade Federal de Rio Grande – (FURG) - Escola de Química e Alimentos. *Campus* Carreiros, Avenida Itália, km 08, Caixa Postal 474 – 96201-900, Rio Grande – RS – Brasil. E-mail: [christianeogrodowski@furg.br](mailto:christianeogrodowski@furg.br)

<sup>[3]</sup> Professor do programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal de Rio Grande – (FURG) - Escola de Química e Alimentos. *Campus* Carreiros, Avenida Itália, km 08, Caixa Postal 474 – 96201-900, Rio Grande – RS – Brasil. E-mail: [dqmprent@furg.br](mailto:dqmprent@furg.br)

INFORMAÇÕES	RESUMO
<b>Recebido em:</b> 06/05/2015	A produção de ácido lático por fermentação tem aumentado nos últimos anos. As bactérias lácticas são micro-organismos que requerem nutrientes complexos. Este trabalho teve como objetivo realizar um <i>screening</i> para avaliar as variáveis mais significativas no meio de cultivo para produção de biomassa e ácido lático utilizando planejamento Plackett-Burman. Dez (10) bactérias ácido lácticas foram utilizadas. Primeiramente foi avaliada a produção de biomassa em caldo MRS (Mann, Rogosa e Sharpe). Para verificar a produção de biomassa, fator de conversão e $\mu_{max}$ , alíquotas foram retiradas de 4 em 4 h. Um planejamento Plackett-Burman com doze (12) ensaios e com três (3) repetições no ponto central foi avaliado para verificar a influência ou a não influência de sete (7) variáveis estudadas. Os micro-organismos <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Weissella viridescens</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Bifidobacterium longum</i> produziram maior biomassa em relação aos outros micro-organismos estudados. Então esses micro-organismos foram utilizados para fazer o planejamento Plackett-Burman. Ao serem avaliados os efeitos os únicos micro-organismos que obtiveram efeitos significativos, foram os <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e os <i>Lactobacillus acidophilus</i> . As variáveis significativas neste estudo foram somente temperatura e concentração de nitrogênio. Com isso, pode-se concluir que o <i>screening</i> das variáveis utilizando planejamento Plackett-Burman provou ser útil na seleção de variáveis e que as variáveis temperatura e concentração de nitrogênio mostraram-se mais significativas quando se deseja estudar produção de biomassa e ácido lático em bactérias ácido lácticas.
<b>Aceito em:</b> 14/09/2015	
<b>Publicado em:</b> 27/09/2015	
<b>Document Object Identifier</b>	
10.18607/jbfs.v2i3.38	
<b>Termos de indexação:</b>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ,	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
Biomassa	
Ácido lático	
*Autor para correspondência	
<a href="mailto:sandrianepizato@yahoo.com.br">sandrianepizato@yahoo.com.br</a>	

### Screening variables for the production of biomass and lactic acid using Plackett-Burman design

**ABSTRACT-** Production of acid lactic increased in the last years. Lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms that require complex nutrients. This study aimed to carry out a *screening* to evaluate the influence of culture medium components on the biomass and lactic acid production using a Plackett-Burman design. Ten (10) lactic acid bacteria were used. Firstly, 48 h biomass production in MRS (Mann, Rogosa & Sharpe) broth was evaluated. To verify the production of biomass conversion factor and  $\mu_{max}$ , aliquots were taken every 4 h. A Plackett-Burman design with 12 trials with 3 repetitions at the center point was evaluated the influence or the absence of influence of 7 variables. The microorganisms *Lactobacillus rhamnosus*, *Weissella viridescens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* showed high biomass production in relation the others microorganisms studied. Therefore, these bacteria were used to make the Plackett-Burman design. The microorganisms that showed significant effects on the responses were *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus*. The variables that showed significant differences in this study were temperature and nitrogen concentration. Thus, it can be concluded that the statistical *screening* of the medium components by Plackett-Burman design proved to be useful on the selection of variables, and the variables of temperature and nitrogen concentration proved to be more influential when studying the production of biomass and lactic acid in lactic acid bacteria.

**Index terms:** *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, Biomass, Lactic acid.



**Copyright:** © 2015 JBFS all rights. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Financiamento:** Os autores reportam que houve suporte e auxílio financeiro da CAPES para a realização da pesquisa.

**Conflito de interesse:** Os autores declaram que não há conflito de interesse.

**Como referir esse documento (ABNT):**

PIZATO, S.; OGRODOWSKI, C. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. *Screening* de variáveis para a produção de biomassa e ácido lático utilizando planejamento Plackett-Burman. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.2, n.3, p.117-128, jul./set., 2015. <http://dx.doi.org/10.18607/jbfs.v2i3.38>

## INTRODUÇÃO

Bactérias produtoras de ácido lático frequentemente denominadas de Bactérias Lácticas (BLs) são representadas pelos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. As bactérias lácticas são caracterizadas basicamente por serem Gram positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos. Podem ter formas de bastão ou cocos [1].

O ácido lático (ácido 2-hidróxiopropanóico) é um ácido orgânico versátil, natural que pode ser produzido por síntese química ou por fermentação microbiana, é multifuncional possuindo uma ampla gama de aplicações. Aproximadamente 90% do total de ácido lático mundial é produzido por fermentação microbiana [2]. A síntese química de ácido lático sempre resulta numa mistura racêmica (DL-ácido lático). A produção biotecnológica de ácido lático oferece também outras vantagens comparadas com a síntese química, tais como o baixo custo de substratos (carboidratos renováveis), menores temperaturas de processo, menor consumo de energia e a possibilidade da obtenção de D- ou L- ácido lático opticamente puro ou uma mistura em diferentes proporções dos dois isômeros dependendo da cepa microbiana, do substrato e das condições de crescimento utilizadas [3].

As bactérias lácticas são micro-organismos exigentes e requerem nutrientes complexos devido a sua capacidade limitada para sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos [4].

A produtividade de metabólitos microbianos pode ser aumentada manipulando os requisitos nutricionais, parâmetros físicos e constituição genética da cepa produtora [5]. Desenvolvimento de meio econômico requer seleção de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e identificação das fontes de elementos. Exigências nutricionais podem ser manipuladas por métodos convencionais ou estatísticos. O método convencional envolve mudar um independente variável de cada vez, mantendo os outros a nível fixo. No entanto, o método estatístico oferece várias vantagens sobre o método convencional de ser rápido e confiável, reduz o número total de experimentos resultando em economia de tempo, produtos químicos e mão de obra [6]. Inicial triagem dos ingredientes é feita para compreender o significado do seu efeito sobre a formação do produto e, em seguida alguns melhores ingredientes são selecionados para uma maior produção do composto desejável [7].

Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar um *screening* para avaliar as variáveis mais

significativas no meio de cultivo para a produção de biomassa e ácido lático utilizando planejamento Plackett-Burman.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Microorganismos e manutenção*

Foram utilizadas dez (10) espécies de bactérias ácido lácticas sendo elas: *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442, *Weissella viridescens* NRRL B-1951, *Lactobacillus oneococcus oeni* NRRL B-3472, *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917, *Bifidobacterium longum* NRRL B-41409, *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958, *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431, *Lactobacillus casei* subespécie *casei* NRRL B-1922, *Carnobacterium maltaromaticum* NRRL B-14852 e *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, adquiridas da Coleção de Culturas ARS (NRRL), do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA). Esses microrganismos chegaram até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) liofilizados, dentro de ampolas. Essas bactérias foram ativadas em caldo MRS (*Mann, Rogosa e Sharpe*) em  $37 \pm 1$  °C/24 h em *shaker* (150 RPM).

Para a manutenção das cepas microbianas, deste caldo foram feitas estrias em placas de *Petri* estéreis contendo Agar MRS cuja em sua formulação havia: peptona (10,0 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5,0 g.L<sup>-1</sup>), extrato de carne (10,0 g.L<sup>-1</sup>), glicose (20,0 g.L<sup>-1</sup>), monooleato de sorbitan (1,0 mL.L<sup>-1</sup>), fosfato de dipotássio (2,0 g.L<sup>-1</sup>), acetato de sódio (2,0 g.L<sup>-1</sup>), citrato triamônico (2,0 g.L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,20 g.L<sup>-1</sup>) e sulfato de manganês (0,05 g.L<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas em estufa estática (Fanem, São Paulo, Brasil)  $37 \pm 1$  °C por 48 h, e a seguir as mesmas foram armazenadas em refrigerador a  $4 \pm 1$  °C [8]. Foram realizados repiques mensais com o intuito de garantir a viabilidade da cultura e garantir o mesmo nível de atividade celular.

### *Curva de crescimento microbiano para produção de biomassa*

Para a produção da biomassa, o caldo MRS foi enriquecido com mais 20% de glicose, a fim de fornecer mais energia para o crescimento dos dez (10) micro-organismos estudados. Em seguida o meio foi colocado em *Erlemmeyer* e autoclavado a 121 °C por 15 min. Esperou-se esfriar. Para cada 400 mL de caldo foram colocados seis (6) alçadas de células (do crescimento realizado em placas) de cada micro-organismo estudado [9]. Em seguida colocou-se em incubadora refrigerada (Tecnal, Rio

de Janeiro, Brasil) com movimento rotatório a  $37 \pm 1$  °C, 150 RPM, por um período de 48 h.

Com o intuito de verificar qual micro-organismo obtinha maior produtividade celular, foram feitas curvas de crescimento celular e de densidade ótica (DO) durante o período de 48 h de cultivo, onde foram retiradas alíquotas de 10 mL do caldo que estava sendo cultivado em frascos *Erlemmeyer* de 500 mL em incubadora de agitação rotatória (RPM) (Cientec, modelo CT-712 RNT) à 37 °C em intervalos de 4 h sendo, transferidas para tubos *Falcon* (previamente secos a 105 °C/24 h). Estes foram centrifugados em centrífuga (Hanil, modelo Supra 22K) 14.308 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as células recuperadas por centrifugação foram ressuspensas no mesmo volume (10 mL) de água destilada. Este procedimento foi realizado por três (3) vezes nas mesmas condições [10]. Essas repetidas lavagens foram realizadas com o intuito de remover lipídios, carboidratos, entre outras substâncias a fim dos mesmos não interferirem na massa final da massa celular (biomassa). Após serem realizadas essas repetidas lavagens os tubos *Falcon* foram secos em estufa 105 °C/ 24 h, até peso constante. A concentração de biomassa foi expressa em g/L. Em paralelo foi retirado em um tubo *Falcon* 5 mL do caldo que estava sendo cultivado para a realização da leitura de densidade ótica (DO). Este foi realizado em espectrofotômetro (Shimadzu, Kyoto, Japão) previamente estabilizado em 600 nm, sendo, quando necessário, multiplicado o valor encontrado nas diluições feitas para ficar na faixa entre 0,2 e 1.

Foram construídos gráficos de biomassa x tempo x DO para verificação do crescimento celular de cada micro-organismo estudado. Com estas curvas foi possível calcular os parâmetros cinéticos de crescimento para os micro-organismos avaliados.

### Estudo da cinética de crescimento

#### a) Conversão da densidade ótica em massa seca

O Fator de conversão (FC) foi estimado através da correlação linear de *Pearson* ( $R^2$ ) entre as medidas de DO (600 nm) das suspensões preparadas a partir do caldo fermentado e suas respectivas massa secas (g/L) [11].

#### b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ )

As velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{max}$  h<sup>-1</sup>) foram determinadas através

da construção do gráfico  $\ln X/X_0$  em função do tempo, obtendo-se o valor de  $\mu_{max}$  pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento, conforme a Equação 1 [12]:

$$\ln (X/X_0) = \mu_{max} \cdot t \quad \text{eq. (1)}$$

#### c) Produtividade máxima de biomassa

A biomassa foi analisada também quanto ao parâmetro de produtividade ( $X_{max}$  (g/L/h), sendo que esta foi calculada pela maior concentração de biomassa obtida em 48 h de fermentação para todos os micro-organismos analisados [13].

### Screening de variáveis

Após a realização das curvas de crescimento celular, e a verificação dos parâmetros cinéticos, os micro-organismos que mais se destacaram (*Lactobacillus rhamnosus*; *Weissella viridescens*; *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus plantarum* e *Bifidobacterium longum*) foram utilizados para a realização do *screening* de variáveis para a obtenção de maior produção de biomassa e ácido lático. Para a realização do *screening* foi utilizado um planejamento experimental Plackett-Burman. Os ensaios foram realizados em frascos *Erlemmeyer* de 500 mL, em incubadora refrigerada com agitação rotatória (Tecnal, modelo TE-420, Rio de Janeiro, Brasil), em diferentes condições de cultivo.

### Preparo do pré inóculo e inóculo

Para o preparo do pré inóculo, o caldo MRS também foi enriquecido com 20% de glicose, autoclavado a 121 °C por 15 min. Esperou-se esfriar (aproximadamente 30 °C) e para cada 400 mL de caldo foram colocados seis (6) alçadas de células (do crescimento realizado em placas) de cada micro-organismo estudado [9]. Em seguida, colocou-se os *Erlemmeyers* em incubadora (Tecnal, modelo TE-420, Rio de Janeiro, Brasil) com movimento rotatório a  $37 \pm 1$  °C, 150 RPM, até ser encontrado a mesma leitura de densidade ótica encontrada anteriormente na obtenção das curvas de crescimento.

Após o período de crescimento de cada micro-organismo selecionado pela maior produção de biomassa, foram colocados 10% do volume deste pré inóculo em frascos *Erlemmeyers* de 500 mL contendo 400 mL caldo MRS com os valores das variáveis estudadas nos experimentos Plackett-Burman. Todos os experimentos foram preparados utilizando água destilada.

Com os resultados do Plackett-Burman foram determinados os efeitos significativos e não significativos que influenciaram a produção de biomassa e a concentração de ácido lático.

A matriz do delineamento Plackett-Burman utilizada (valores reais e codificados) está apresentada na [Tabela 1](#).

**Matriz de delineamento experimental Plackett-Burman**

**Tabela 1.** Matriz Plackett-Burman (valores reais e codificados) para *Lactobacillus acidophilus*, *rhamnosus*, *plantarum*, *Weissella viridescens* e *Bifidobacterium longum*.

Ensaio	Variáveis						
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	40(+)	100(-)	5,5(-)	7,5(+)	20(-)	10(-)	3,5(+)
2	40(+)	200(+)	7,5(+)	5,0(-)	20(-)	10(-)	1,5(-)
3	30(-)	200(+)	5,5(-)	7,5(+)	50(+)	10(-)	1,5(-)
4	40(+)	100(-)	7,5(+)	7,5(+)	20(-)	20(+)	1,5(-)
5	40(+)	200(+)	7,5(+)	5,0(-)	50(+)	20(+)	3,5(+)
6	40(+)	200(+)	5,5(-)	7,5(+)	20(+)	20(+)	1,5(-)
7	30(-)	200(+)	7,5(+)	7,5(+)	20(-)	20(+)	3,5(+)
8	30(-)	100(-)	7,5(+)	7,5(+)	50(+)	10(-)	3,5(+)
9	30(-)	100(-)	7,5(+)	5,0(-)	50(+)	20(+)	1,5(-)
10	40(+)	100(-)	5,5(-)	5,0(-)	50(+)	20(+)	3,5(+)
11	30(-)	200(+)	5,5(-)	5,0(-)	20(-)	20(+)	3,5(+)
12	30(-)	100(-)	5,5(-)	5,0(-)	20(-)	10(-)	1,5(-)
13	35(0)	150(0)	6,5(0)	6,25(0)	35(0)	15(0)	2,5(0)
14	35(0)	150(0)	6,5(0)	6,25(0)	35(0)	15(0)	2,5(0)
15	35(0)	150(0)	6,5(0)	6,25(0)	35(0)	15(0)	2,5(0)

Onde: X<sub>1</sub> Temperatura; X<sub>2</sub> agitação (RPM); X<sub>3</sub> pH; X<sub>4</sub> Tween-80(g/L); X<sub>5</sub> concentração de carbono (g/L); X<sub>6</sub> concentração de nitrogênio (g/L); X<sub>7</sub> concentração de fosfato de potássio (g/L).

Para determinar quais as variáveis obtiveram maior efeito na produção de biomassa e ácido lático, um delineamento experimental Plackett-Burman foi realizado, utilizando o programa Statistica 7.0, onde se realizou um (1) planejamento para ambos os micro-organismos selecionados previamente.

No planejamento foi realizado quinze (15) experimentos com três (3) repetições no ponto central, a fim de fixar os melhores parâmetros e avaliar quais as melhores condições. Foram utilizadas sete (7) variáveis entre elas estão: temperatura, agitação (RPM), pH, Tween-80 (g/L) (Synth); concentração de carbono (g/L); concentração de nitrogênio (g/L); concentração de fosfato de potássio (g/L) (Synth). Como fonte de carbono foi utilizada glicose (P.A) (Synth), e como

fonte de nitrogênio foi utilizado extrato de levedura (Himedia).

Como variáveis respostas foram avaliadas a produção de ácido lático e produção de biomassa em 48 h de fermentação.

**Quantificação do ácido lático**

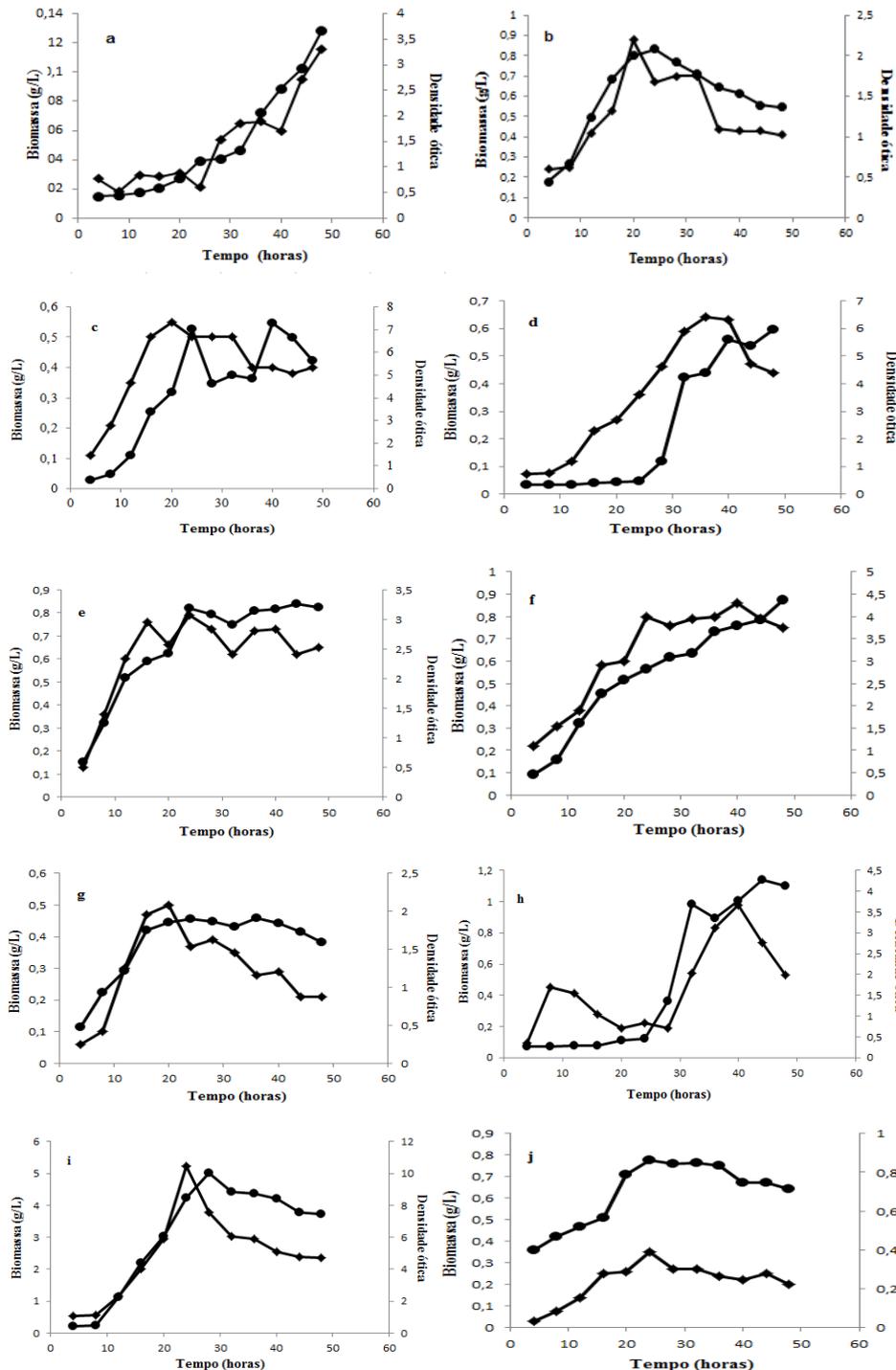
Inicialmente foi realizada uma centrifugação em centrífuga (Hanil, modelo Supra 22 K, Incheon–Coreia do Sul) do caldo fermentado (após 48 horas) de cada ensaio do planejamento por 14.308 x g/30 minutos. Em seguida o sobrenadante foi filtrado em membrana (*Millipore*) hidrofílica de 0,22µm. Logo, o filtrado foi diluído em água ultra pura por 3 vezes e passados para *vials*. Estes *vials* foram sonificados em banho ultrassônico (Unique, UltraCleaner 800, São Paulo, Brasil). Após, os mesmos foram colocados para ser quantificados por cromatografia.

A metodologia utilizada para a detecção do ácido láctico foi seguida da descrita por Oliveira, Buzato e Haully [14]. O cromatógrafo líquido (Shimadzu, Kyoto, Japão) possuía detector UV (ultravioleta) com comprimento de onda de 210 nm. A coluna utilizada foi Aminex HPX - 87H (300 x 7,8 mm) (Bio Rad, California, Estados Unidos). Foi utilizado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005 M) como fase móvel, com um fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 35 °C.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

*Curva de crescimento microbiano para produção de biomassa*

Na Figura 1 são apresentadas as curvas de crescimento microbiano (biomassa x densidade ótica pelo tempo de produção) dos diferentes micro-organismos estudados.



Onde: **a:** *Lactobacillus sakei*; **b:** *Lactobacillus acidophilus*; **c:** *Lactobacillus plantarum*; **e:** *Weissella viridescens*; **f:** *Bifidobacterium longum*; **g:** *Lactobacillus pediococcus acidulactici*; **h:** *Carnobacterium maltaromaticum*; **i:** *Lactobacillus rhamnosus*; **j:** *Lactobacillus oneococcus oeni*; ● densidade ótica; ◆ biomassa.

**Figura 1.** Screening microbiano para produção de biomassa por diferentes micro-organismos.

Estas curvas mostram a produtividade máxima de biomassa alcançada pelos micro-

organismos avaliados em 48 h de crescimento em caldo MRS. Dos micro-organismos que obtiveram maior produção de biomassa em 48 h de cultivo

estão *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus rhamnosus*. Esses dados podem ser comprovados através dos parâmetros cinéticos que também foram avaliados neste estudo.

### Parâmetros cinéticos de crescimento dos diferentes micro-organismos estudados

Foram avaliados os parâmetros cinéticos de crescimento para os dez (10) micro-organismos estudados. A Tabela 2 apresenta os valores de fatores de conversão,  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ), e produtividade ( $\text{g/L}$ ) para cada micro-organismo avaliado.

**Tabela 2.** Determinação dos valores cinéticos obtidos para cada micro-organismo avaliado.

Micro-organismos	FC	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$X_{\max}$ (g/L)
<i>Lactobacillus sakei</i>	0,028±0,005 <sup>e</sup>	0,056±0,012 <sup>bcd</sup>	0,095±0,001 <sup>i</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,236±0,007 <sup>ab</sup>	0,080±0,021 <sup>ab</sup>	0,870±0,003 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus casei</i>	0,0213±0,003 <sup>e</sup>	0,080±0,018 <sup>ab</sup>	0,550±0,004 <sup>g</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,156±0,010 <sup>cde</sup>	0,077±0,008 <sup>abc</sup>	0,940±0,003 <sup>b</sup>
<i>Weissella viridescens</i>	0,221±0,037 <sup>bc</sup>	0,018±0,005 <sup>e</sup>	0,890±0,005 <sup>c</sup>
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,181±0,025 <sup>bc</sup>	0,019±0,012 <sup>e</sup>	0,860±0,005 <sup>de</sup>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,185±0,016 <sup>bcd</sup>	0,046±0,005 <sup>cde</sup>	0,50±0,012 <sup>h</sup>
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	0,124±0,007 <sup>bcd</sup>	0,094±0,003 <sup>a</sup>	0,850±0,003 <sup>e</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,335±0,065 <sup>a</sup>	0,108±0,03 <sup>a</sup>	5,240±0,007 <sup>a</sup>
<i>Oneococcus oeni</i>	0,062±0,043 <sup>de</sup>	0,041±0,002 <sup>de</sup>	0,780±0,005 <sup>f</sup>

Onde: FC – Fator de conversão de densidade óptica (600 nm) em biomassa;  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) – Velocidade específica máxima de crescimento;  $X_{\max}$  (g/L<sup>-1</sup>): concentração máxima de biomassa.

Pode-se observar que em relação ao parâmetro fator de conversão (FC) de densidade óptica (600 nm) em biomassa que os valores ficaram próximos para a maioria dos micro-organismos estudados, sendo que o *Lactobacillus rhamnosus* apresentou maior fator de conversão (0,335) em relação aos outros micro-organismos seguido pelo *Lactobacillus acidophilus* (0,236).

Em relação a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$   $\text{h}^{-1}$ ) podemos observar que o micro-organismos *L. rhamnosus* apresentou maior velocidade de crescimento (0,108  $\text{h}^{-1}$ ) do que os outros micro-organismos estudados, demonstrando que seu crescimento por hora foi maior. Oliveira [15] quando trabalhou com fermentação em batelada também com o *L. rhamnosus*, porém utilizando lactose como fonte de carbono, encontrou uma velocidade específica de crescimento de 0,19  $\text{h}^{-1}$  este valor está um pouco acima do encontrado neste trabalho para o mesmo micro-organismo, podendo esse fato estar relacionado com a fonte de nutriente utilizada, sendo que no presente trabalho a fonte de carbono utilizada para a verificação da velocidade máxima de crescimento foi a glicose.

Silveira [16] avaliou a velocidade específica máxima de crescimento para o *L. casei* utilizando suco de caju clarificado contendo 60 g/L de açúcares redutores a uma temperatura de 37 °C encontrou um  $\mu_{\max}$  de 0,32 ( $\text{h}^{-1}$ ). Este valor foi acima do encontrado no presente trabalho (0,08  $\text{h}^{-1}$ ). Isso pode estar relacionado ao substrato fornecido para o crescimento deste micro-organismo, sendo que neste estudo foi utilizado somente o caldo MRS enriquecido com 20% de glicose.

Resultados inferiores de velocidade específica máxima de crescimento foram relatados neste trabalho para o *L. acidophilus*, quando comparado com o trabalho de Figueiredo e Passos [17]. Estes autores encontraram um  $\mu_{\max}$  de 0,92  $\text{h}^{-1}$  quando trabalharam com o caldo MRS, já no presente trabalho utilizando o mesmo micro-organismo e o mesmo substrato foi encontrado um  $\mu_{\max}$  de 0,08  $\text{h}^{-1}$ .

Para a concentração máxima de biomassa ( $X_{\max}$  g/L) foram encontrados valores elevados somente para o *L. rhamnosus* (5,24 g/L), sendo este valor atingido em 28 horas de cultivo [18] encontrou uma concentração máxima de biomassa

de 1,61 g/L que foi atingida em 54 horas de fermentação quando trabalhou com o *Lactobacillus pentosus*. Neste trabalho a menor concentração máxima de biomassa foi encontrada para o *L. sakei* (0,095 g/L).

Observando a **Tabela 2** podemos verificar que os micro-organismos que apresentaram maior produção de biomassa, maior velocidade específica máxima de crescimento e maior fator de conversão de densidade óptica (600 nm) em biomassa em caldo MRS foram *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *W. viridescens*, *B. longum* e *L. rhamnosus*.

Após a identificação dos micro-organismos que produziram maior concentração de biomassa e melhores parâmetros cinéticos de crescimento, foi realizado um planejamento Plackett-Burman, e deste foram avaliados como respostas produção de biomassa e concentração de ácido lático.

**Curva padrão para a determinação de ácido lático**

Antes de serem feitas as leituras para a determinação de ácido lático por cromatografia, uma curva padrão de ácido lático foi construída. Como padrão foi utilizado ácido L (+) - lático puro (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Foram feitas diluições com concentrações de 10 a 70 g/L de ácido lático.

A equação gerada foi de  $Y = 6,89143E10^{-7}X - 0,239071$ . O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) encontrado foi de 0,9995.

**Produção de biomassa e ácido lático**

Na **Tabela 3** são apresentados os valores encontrados para produção de biomassa e ácido lático em um período de 48 h cultivo.

**Tabela 3.** Respostas obtidas utilizando planejamento Plackett-Burman para produção de biomassa e ácido lático após 48 h de cultivo

Experimentos	Biomassa (g/L)	Ácido lático (g/L)	Biomassa (g/L)	Ácido lático (g/L)	Biomassa (g/L)
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	<i>W. viridescens</i>
1	0,150±0,007	2,000±0,001	0,009±0,001	3,240±0,001	0,120±0,012
2	0,430±0,002	14,200±0,009	0,007±0,001	3,540±0,001	0,400±0,014
3	0,180±0,05	20,600±0,012	0,020±0,001	0,040±0,001	0,560±0,001
4	0,350±0,002	17,600±0,015	0,057±0,002	8,460±0,026	0,400±0,001
5	0,130±0,001	26,200±0,017	0,018±0,002	9,820±0,012	0,400±0,005
6	0,440±0,001	19,100±0,016	0,009±0,001	3,360±0,002	0,100±0,003
7	0,570±0,003	15,900±0,018	0,070±0,001	9,100±0,010	0,340±0,001
8	0,200±0,007	22,200±0,001	0,050±0,010	7,800±0,001	0,470±0,001
9	0,600±0,001	15,100±0,003	0,076±0,012	4,160±0,001	0,320±0,001
10	0,610±0,004	8,220±0,004	0,090±0,001	5,670±0,002	0,160±0,002
11	0,330±0,002	14,300±0,008	0,040±0,001	3,880±0,005	0,400±0,002
12	0,300±0,002	13,300±0,001	0,100±0,001	5,240±0,001	0,420±0,003
13	1,300±0,015	29,100±0,013	0,110±0,016	7,680±0,005	0,440±0,015
14	1,380±0,017	25,000±0,022	0,150±0,025	7,640±0,002	0,420±0,015
15	1,370±0,015	26,000±0,017	0,120±0,020	5,960±0,034	0,440±0,012

“Continua”

**Tabela 3.** Conclusão

Experimentos	Ácido lático (g/L)	Biomassa (g/L)	Ácido lático (g/L)	Biomassa (g/L)	Ácido lático (g/L)
	<i>W. viridescens</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. lantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
1	2,660±0,001	0,150±0,001	15,36±0,015	0,060±0,001	0,120±0,001
2	11,68±0,001	0,550±0,007	12,07±0,012	0,100±0,001	2,780±0,001
3	2,460±0,001	0,300±0,002	20,42±0,002	0,150±0,001	2,730±0,001
4	8,380±0,005	0,380±0,006	18,30±0,003	0,320±0,005	4,420±0,001
5	5,800±0,004	0,650±0,012	30,56±0,010	0,300±0,001	5,520±0,002
6	9,400±0,012	0,800±0,012	14,82±0,018	0,048±0,002	0,060±0,007
7	11,26±0,015	0,860±0,002	18,16±0,016	0,140±0,012	1,440±±0,001
8	10,12±0,015	1,930±0,002	21,54±0,017	0,360±0,001	5,140±0,004
9	12,20±0,016	0,680±0,003	32,26±0,010	0,160±0,001	4,920±0,012
10	3,580±0,012	0,870±0,005	27,16±0,002	0,060±0,001	0,740±0,010
11	2,680±0,002	0,480±0,006	15,62±0,001	0,150±0,007	1,180±0,010
12	4,640±0,004	1,200±0,002	18,86±0,001	0,250±0,015	2,280±0,014
13	12,74±0,045	1,620±0,045	19,86±0,018	0,430±0,032	5,360±0,045
14	9,100±0,032	1,420±0,056	23,07±0,015	0,470±0,47	5,920±0,062
15	8,400±0,034	1,440±0,038	24,05±0,042	0,370±0,044	8,000±0,032

Os autores Pritchard e Coolbear [19] afirmam que a síntese do ácido lático por processo fermentativo é associada ao crescimento celular, isto é, não há formação de produto se o meio não possuir uma concentração adequada de nitrogênio para promover este crescimento. Isso pode ser confirmado pela Tabela 3, pois, na maioria das vezes, quanto maior a concentração de biomassa produzida pelos micro-organismos, maior a produção de ácido lático.

Pode se observar na Tabela 3 que a produção de biomassa e ácido lático variou para *L. acidophilus*. Hwang e colaboradores [20] encontraram uma produção de biomassa de 1,3 g/L para *L. acidophilus*, quando utilizaram glicose como fonte de carbono. Esses mesmos autores encontraram uma produção de biomassa de 0,11 g/L para *L. acidophilus* quando utilizaram extrato de carne como fonte de nitrogênio. Para a produção de ácido lático foi observada uma maior produção no experimento 13 (29,10 g/L) e menor produção de ácido lático para *L. acidophilus* foi observado no experimento 1, em que obteve apenas 2,0 g/L.

*B. longum* apresentou uma produção máxima de biomassa no experimento 14. A menor produção de biomassa seca para este micro-organismo foi no experimento 2, em que obteve 0,007 g/L. A produção de ácido lático para *B. longum* também foi baixa, sendo que o máximo de ácido lático alcançado por este micro-organismo foi de 9,82 g/L (experimento 5). O experimento que obteve menor crescimento de ácido lático para este micro-organismo foi o experimento 3 (0,04 g/L).

Observando a Tabela 3, pode se verificar que a produção máxima de biomassa seca para *W. viridescens* foi de 0,56 g/L.

*L. rhamnosus* obteve maior produção de biomassa e também maior produção de ácido lático quando comparados com os outros micro-organismos estudados, sendo que o melhor experimento para a produção de biomassa seca foi o experimento 8 com produção de 1,93 g/L. Já para a produção de ácido lático, o melhor experimento foi o 9, com produção de 32,26 g/L. Estudo

realizado por Wang [21], foi encontrado 175,4 g/L de ácido láctico na fermentação em batelada, quando trabalharam com pó de mandioca, onde neste pó havia uma concentração total de açúcar de 222,5 g/L.

*L. plantarum* apresentou uma produção máxima de biomassa seca quando utilizado extrato de levedura como fonte de nitrogênio de 0,47 g/L (experimento 14) em 48 horas de fermentação e uma produção mínima de biomassa seca de 0,048 g/L (experimento 6). Em relação à produção de ácido láctico, *L. plantarum* apresentou como máximo 5,92 g/L de ácido láctico. Essa produção máxima foi observada no experimento 14. Panda e Ray [22] encontraram uma produtividade de ácido láctico para *L. plantarum* de 23,86 g/L quando utilizaram como fonte de carbono, farinha de batata doce (55 g) e uma produção de biomassa de 0,2 g/L.

Em algumas respostas a reprodutibilidade dos pontos centrais demonstraram não ser boa, podendo ser atribuída a erros na execução ou injúrias do próprio micro-organismo.

Essa diferença entre maior ou menor produção tanto de ácido láctico como de biomassa encontrado para esses micro-organismos estudados pode estar relacionada com os nutrientes utilizados na composição do meio ou até mesmo na concentração destes nutrientes sendo mais fáceis ou mais difíceis de serem assimilados pelos micro-organismos.

### Screening de variáveis na produção de biomassa e ácido láctico

Os efeitos foram selecionados para verificar quais dos componentes foram mais significativos nas respostas avaliadas.

Após ter sido realizada a produção de ácido láctico e biomassa pelo planejamento Plackett-Burman, foi verificado quais variáveis apresentaram maior efeito sobre a produção de biomassa e ácido láctico (*screening*) para os cinco (5) micro-organismos selecionados.

Foi estabelecida uma probabilidade máxima de erro no teste de 5%, desta forma, os parâmetros com valor de  $p < 0,05$  foram considerados como significativos. Os dados foram analisados em erro puro.

A Tabela 4 apresenta os efeitos encontrados no planejamento Plackett-Burman para os 5 micro-organismos selecionados.

Para *L. acidophilus* a temperatura apresentou efeito significativo negativo para a produção de ácido láctico. A variação de temperatura de 30 °C (nível -1) para 40 °C (nível +1) resultou em um efeito negativo para a produção de ácido láctico. Os outros parâmetros estudados não apresentaram efeito significativo para a produção de ácido láctico.

Ainda observando a Tabela 4, podemos perceber que somente a variável concentração de nitrogênio teve efeito significativo em relação à produção de biomassa.

**Tabela 4.** Efeitos encontrados no planejamento Plackett-Burman para produção de biomassa e concentração de ácido láctico

Bactérias ácido lácticas	Variáveis	Biomassa (g/L)			Concentração de Ácido láctico (g/L)		
		Efeito	Erro padrão	P-valor	Efeito	Erro padrão	P-valor
	Temperatura	-0,0062	0,0255	0,8302	-5,541	1,2589	0,0479
	RPM	-0,0271	0,0255	0,4006	5,1482	1,2589	0,0549
	pH	-0,0795	0,0255	0,0897	-0,2015	1,2589	0,8874
<i>Lactobacillus Acidophilus</i>	Tween-80	-0,0326	0,0279	0,3636	-3,8205	1,3745	0,1087
	Concentração de Carbono	-0,0004	0,0255	0,988	-1,4584	1,2589	0,3663
	Concentração de Nitrogênio	0,2462	0,0255	0,0106	1,1649	1,2589	0,4524
	Fosfato de potássio	-0,0462	0,0255	0,2125	-4,0449	1,2589	0,0847

“Continua”

**Tabela 4.** Conclusão

Bactérias ácido lácticas	Variáveis	Biomassa (g/L)			Concentração de Ácido láctico (g/L)		
		Efeito	Erro padrão	P-valor	Efeito	Erro padrão	P-valor
<i>Bifidobacterium longum</i>	Temperatura	-0,0253	0,0122	0,1733	0,1978	0,5764	0,7641
	RPM	-0,0386	0,0122	0,0872	-0,3578	0,5764	0,598
	pH	-0,017	0,0122	0,2976	-0,4988	0,5764	0,478
	Tween-80	-0,0136	0,0133	0,4137	2,6831	0,6293	0,0508
	Concentração de Carbono	-0,0056	0,0122	0,6913	0,0121	0,5764	0,985
	Concentração de Nitrogênio	0,0207	0,0122	0,232	1,2721	0,5764	0,158
	Fosfato de potássio	0,0036	0,0122	0,7955	2,0044	0,5764	0,0736
<i>Weisella viridescens</i>	Temperatura	-0,1644	0,0646	0,1261	-1,273	1,3681	0,45
	RPM	0,061	0,0646	0,4446	1,247	1,3681	0,4581
	pH	-0,0277	0,0646	0,7097	-0,347	1,3681	0,8233
	Tween-80	0,0564	0,0706	0,5079	5,783	1,4937	0,0606
	Concentração de Carbono	-0,0022	0,0646	0,9752	1,34	1,3681	0,4304
	Concentração de Nitrogênio	-0,0989	0,0646	0,2657	2,653	1,3681	0,1919
	Fosfato de potássio	-0,061	0,0646	0,4446	-3,073	1,3681	0,1536
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Temperatura	-0,3358	0,0714	0,0423	-5,6774	1,2868	0,0477
	RPM	-0,2674	0,0714	0,0644	-0,7259	1,2868	0,6294
	pH	0,0041	0,0714	0,9589	-4,9007	1,2868	0,0625
	Tween-80	-0,0349	0,0779	0,698	3,4743	1,4049	0,1319
	Concentração de Carbono	0,2625	0,0714	0,0667	0,3107	1,2868	0,8316
	Concentração de Nitrogênio	-0,1241	0,0714	0,2243	8,8307	1,2868	0,0205
	Fosfato de potássio	0,1774	0,0714	0,1309	3,6992	1,2868	0,1027
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Temperatura	-0,0628	0,0295	0,1671	-1,0824	0,8167	0,3161
	RPM	-0,0444	0,0295	0,2714	-0,2441	0,8167	0,7931
	pH	0,0004	0,0295	0,989	-0,9924	0,8167	0,3482
	Tween-80	0,0552	0,0322	0,2289	2,4449	0,8917	0,1112
	Concentração de Carbono	0,0188	0,0295	0,5883	1,5558	0,8167	0,197
	Concentração de Nitrogênio	-0,0477	0,0295	0,2472	-0,5608	0,8167	0,5632
	Fosfato de potássio	-0,0022	0,0295	0,9471	-0,9158	0,8167	0,3787

Números em negrito significam que as variáveis foram significativas ao nível de significância de 95% para produção de biomassa e/ou ácido láctico. Onde: RPM: rotação por minuto.

Não foram observados efeitos significativos tanto para a produção de biomassa quanto para ácido láctico no caso do *B. longum*. Estudo realizado

por Guilherme, Pinto e Rodrigues [23] também mostraram que o uso de extrato de levedura como

fonte de nitrogênio não apresentou influência significativa na produção de ácido láctico.

Em relação a *W. viridescens* pode se verificar que nenhuma das variáveis estudadas apresentou efeito significativo para a produção de biomassa e ácido láctico.

Para o *L. rhamnosus* foi observado que a temperatura apresentou influência significativa ao nível de confiança de 95%, tanto para a produção de biomassa quanto para a produção de ácido láctico. Para a produção de ácido láctico e biomassa, a variável temperatura apresentou efeito negativo, o que significa que quando a mesma diminui do nível +1 (40 °C) para o -1 (30 °C) ocorreu um aumento na concentração de ácido láctico e biomassa. Trabalho realizado por Coelho [24] demonstrou que as variáveis que obtiveram maior efeito significativo na produção de ácido láctico foram Tween-80, água de maceração do milho e sulfato de magnésio. Ambas as variáveis apresentaram efeito positivo. Naveena e colaboradores [7], relataram em seu trabalho que o Tween-80 foi um componente significativo para a produção de ácido láctico. Já neste trabalho este componente não apresentou influência na produção de ácido láctico e produção de biomassa.

Outra variável que apresentou efeito significativo para o *L. rhamnosus* foi a concentração de nitrogênio. Esse efeito somente foi observado para a produção de ácido láctico. Houve um aumento na produção de ácido láctico quando o nível passou de -1 (20 g/L) para +1 (50 g/L).

Para o *L. plantarum* não foi observado influência significativa a um nível de confiança de

95%, tanto para a produção de biomassa quanto para a produção de ácido láctico.

## CONCLUSÃO

Os *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *W. viridescens*, *B. longum* e *L. rhamnosus* produziram maiores concentrações de biomassa, maior fator de conversão e uma velocidade máxima específica de crescimento maior em caldo MRS com extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono após 48 h.

Com o uso do planejamento Plackett-Burman foi possível fazer um *screening* das variáveis que foram as mais significativas (temperatura e concentração de nitrogênio) para o processo de produção de biomassa e de ácido láctico para os micro-organismos escolhidos.

O *screening* estatístico das variáveis do meio de cultivo usando planejamento Plackett-Burman é considerado útil na seleção significativa de componentes ao usar extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

1. Condução e avaliação dos experimentos, análises estatísticas e elaboração do artigo:

Sandriane Pizato

2. Planejamento, orientação e revisão final do artigo:

Christiane Saraiva Ogrodowski e Carlos Prentice-Hernández

## REFERÊNCIAS

- [1]. CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p. 281-370, 2002.
- [2]. NOLASCO-HIPOLITO, C.; MATSUNAKA, T.; KOBAYASHI, G.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L-(+)- lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. **Journal Bioscience Bioenergy**, v.93, n.3, p. 281-287, 2002.
- [3]. DUMBREPATIL, A.; ADSUL, M.; CHAUDHARI, S.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.1, p. 333-335, 2008.
- [4]. FITZPATRICK, J.J.; KEEFFE, U.O. Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. **Process Biochemistry**, v.37, n.2, p.183-186, 2001.
- [5]. CHAUHAN, K.; TRIVEDI, U.; PATEL, C. Statistical *Screening* of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, v.98, n.1, p.98-103, 2007.
- [6]. CARVALHO, C.M.L.; SERRALHEIRO, M. L.M.; CABRAL, J.M.S.; AIREBARROS, M.R. Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. **Enzyme Microbiology Technology**, v.27, n.2, p.117-123, 1997.
- [7]. NAVEENA, B.J.; ALTAF, M.D.; BHADRIAH, K.; REDDY, G. Selection of

- medium components by Plackett–Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV-6 in SSF using wheat bran. **BioResearch Technology**, v.96, n.4, p.485-490, 2005.
- [8]. NEVES, A. L. P. **Uso de enzimas na extração de polihidroxialcanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator***. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2009.
- [9]. LUVIELMO, M.M.; VENDRUSCOLO, C.T.; SCAMPARINI, A.R.P. Selection among strains of *Xanthomonas campestris* for xanthan gum production. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.2, p.161-172, 2007.
- [10]. HUIJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y.; LEISOLA, M. Optimization of media and cultivation conditions for L(+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, n.1, p.126-130, 2001.
- [11]. MARTHOS, B.V. **Influências de diferentes meios de cultura em cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 para produção de polissacarídeo capsular**. 2012. 110f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2012.
- [12]. STROPPA, C.T.; ALVES, J.G.L.F.; FIGUEIREDO, A.L.F.; CASTRO, C.C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1978-1983, 2009.
- [13]. GERN, R.M.M. **Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso**. 2005. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2005.
- [14]. OLIVEIRA, A.R.; BUZATO, J.B.; HAULY, M.C.O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melão de cana-de-açúcar suplementado. **Semina: Ciências Agrárias**, v.26, p.53-60, 2005.
- [15]. OLIVEIRA, P.M. **Produção de l-(+)-ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* através de batelada alimentada**. 2011. 44f. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2011.
- [16]. SILVEIRA, S.M. **Utilização do suco de caju clarificado para produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442**. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2009.
- [17]. FIGUEIREDO, H.M.; PASSOS, F.J.V. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20. **Sitientibus**, v.1, p.37-50, 2003.
- [18]. XAVIER, M.C.A. **Bioconversão de xilose em ácido láctico**. 2011. 126f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2011.
- [19]. PRITCHARD, G.; COOLBEAR, T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.179-206, 1993.
- [20]. HWANG, C.F.; LIN, C.K.; YAN, S.Y.; CHANG, R.H.; TSEN, H.Y. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain *Lactobacillus acidophilus* DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.3, p. 248-256, 2015.
- [21]. WANG, L.; ZHAO, B.; LIU, B.; YANG, C.; YU, B.; LI, Q.; MA, C.; XU, P.; MA, Y. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. **BioResearch Technology**, v.20, p.895-901, 2010.
- [22]. PANDA, S.H.; RAY, R.C. Direct conversion of raw starch to lactic acid by *Lacto-bacillus plantarum* MTCC 1407 in semi-solid fermentation using sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) flour. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.67, p.531-537, 2008.
- [23]. 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**, v.29, p.738-747, 2009.
- [24]. COELHO, L.F. **Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico**. 2011. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Paulista, Rio Claro, 2011.