

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE  
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

JAQUELINE BOLDT CAPELLARI

BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO LÁCTICO POR *Lactobacillus amylovorus* A PARTIR DE  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.

JOINVILLE

2010

JAQUELINE BOLDT CAPELLARI

BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO LÁCTICO POR *Lactobacillus amylovorus* A PARTIR DE  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Engenharia de Processos, na  
Universidade da Região de Joinville.

Professora Orientadora: Ana Paula Testa  
Pezzin

Professora Co- Orientadora: Andréa L. S.  
Schneider

JOINVILLE

2010

## Termo de Aprovação

### “Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais”

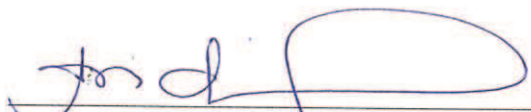
por

Jaqueline Boldt Capellari

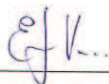
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin  
Orientadora (UNIVILLE)






Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider  
Co-Orientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck  
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

#### Banca Examinadora:

  
Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin  
Orientadora (UNIVILLE)  
Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider  
Co-Orientadora (UNIVILLE)  
Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
(UFSC)  
Prof. Dr. Ozair Souza  
(UNIVILLE)

Joinville, 29 de outubro de 2010.

***“Sucesso é a soma de pequenos esforços, repetidos o tempo todo”.***

*Robert Collier*

***Dedicatória***

*Ao meu marido **Cleber**, que me incentivou a realizar esse trabalho,  
pelo seu apoio, carinho, compreensão e paciência.*

*A minha filha, **Agdah Beatrice**, por seu sorriso de cada dia,  
que me dá força para seguir o caminho até o fim.*

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por estar sempre me guiando, e pela graça recebida de encerrar mais uma etapa na minha vida, renovando os meus caminhos para um novo amanhecer.

Aos meus pais, *Ronaldo Boldt* e *Darci Mello* por todo seu amor, incentivos e apoio nesses anos de estudos.

Ao meu irmão, *Jaison Boldt* pelo amor sincero e sua amizade eterna.

Ao meu marido *Cleber Angelo Capellari*, por ser tão prestativo, compreensivo, amoroso, confiante e por todo apoio que me deu nestes anos que estamos juntos.

À Prof<sup>a</sup> Dra. *Ana Paula Testa Pezzin*, pela orientação, amizade, carinho e incentivo durante todo trabalho realizado.

A Prof<sup>a</sup> Dra. *Andréa L.S. Schneider*, pela sua co-orientação, carinho, compreensão e pelo auxílio no dia-a-dia.

A Prof<sup>a</sup> *Gianinni Apati* por ajudar a aplicar o planejamento fatorial, pela sua amizade e carinho.

Ao Prof<sup>o</sup> *Theodoro Marcel Wagner* pelas análises de HPLC e por toda ajuda prestada.

A *Paula Bomfim* e a *Michele Formolo*, pela amizade destes anos de trabalho, pelo companheirismo nas horas fáceis e difíceis, por tudo, sem a ajuda de vocês, nada seria possível.

A *todos os amigos* do laboratório de Biotecnologia I, pela convivência, ajuda e principalmente pela amizade.

Aos *membros* da banca, por aceitarem avaliar este trabalho e me ajudarem a corrigir possíveis enganos.

## RESUMO

O ácido láctico (AL) pode ser produzido tanto pela síntese química quanto pela fermentação microbiana. Entretanto, a rota biológica é geralmente preferida por fornecer um produto opticamente puro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biossíntese de AL por *Lactobacillus amylovorus* usando diferentes fontes de carbono (FC) e nitrogênio (FN) provenientes de resíduos agroindustriais, por meio de dois Delineamentos Composto Central Rotacional (DCCR), validar os modelos e avaliar a produção de AL em escala ampliada. A determinação dos parâmetros de temperatura de incubação (25, 37 e 42 °C) e agitação (120 min<sup>-1</sup> e sem agitação) foi conduzida em ensaios preliminares. O crescimento celular, produção de AL e consumo de substrato foram realizadas por Turbidimetria e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), respectivamente. Para isto, as células foram inoculadas a uma taxa de 10 % e cultivadas em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) por 96 h. Os ensaios preliminares revelaram que as condições mais favoráveis para a produção de AL foram de 37 °C na condição estático. Para obter a máxima produção de AL foram realizados dois DCCR, variando as concentrações, as FC (melaço e amido) e FN (milhocina). Os delineamentos foram conduzidos sem agitação a 37 °C em frascos de erlenmeyer com pH em evolução espontânea. Os resultados obtidos a partir dos delineamentos investigados permitiram a escolha das melhores condições para realização do processo fermentativo. Com o uso de melaço como FC e milhocina como FN, a produção de AL variou entre 2,8 e 4,6 g L<sup>-1</sup>, sendo a condição mais favorável usando 40,0 g de melaço e 25,0 de milhocina. A produção de AL obtida com o uso de amido como FC e milhocina como FN variou entre 1,4 e 2,2 g L<sup>-1</sup>, sendo a melhor condição alcançada usando 40,0 g de amido e 40,0 g de milhocina. Por meio de cálculos que variaram as concentrações codificadas das FC e FN de -1,41 a + 1,41 foi possível validar os modelos experimentalmente nas mesmas condições experimentais dos DCCR. Como o valor obtido experimentalmente de ambos foi estatisticamente igual ao valor predito pelo modelo pode-se considerar o modelo válido para ambos os delineamentos. No ensaio em biorreator utilizando 40 g L<sup>-1</sup> de melaço e 18,6 g L<sup>-1</sup> de milhocina a 37 °C, observou-se um crescimento exponencial na produção de AL entre 16 e 48 h de cultivo, estabilizando após este período, enquanto ocorreu um decréscimo no consumo de substrato até 56 h, sendo totalmente consumido. Com este ensaio foi alcançada uma produtividade em ácido láctico de 0,11 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e o fator de conversão foi de 1,43 g g<sup>-1</sup> e produtividade máxima de 0,14 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

**Palavras - chave:** *Lactobacillus amylovorus*, ácido láctico e resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

Lactic acid (LA) can be produced either by chemical synthesis and by microbial fermentation. However, the biological route is generally preferred because it provides an optically pure product. The aim of this study was to evaluate the LA biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* using different carbon sources (CS) and nitrogen (NS) from organic industry residues, through two Central Rotational Composite Designs (CRCD), validate the models and evaluate the LA production on a large scale. The parameters of incubation temperature (25, 37 and 42 °C) and agitation (120 min<sup>-1</sup> and without agitation) was carried out in preliminary tests. Analysis of cell growth and production of AL and substrate consumption was determined by Turbidimetry and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), respectively. For this, cells were inoculated at a rate of 10% and cultured in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 100 ml MRS for 96 h. The preliminary tests showed that the most favorable conditions for the LA production were 37 °C in static condition. For maximum production of LA were carried out two RCCD, varying concentrations, CS (molasses and starch) and NS (corn steep liquor). The designs were carried out without agitation at 37 °C in Erlenmeyer flasks with pH in spontaneous evolution. The results obtained from the designs investigated allow the choice of the best conditions for performing the fermentation process. With the use of molasses as CS and corn steep liquor as NS, the production of AL ranged between 2.8 and 4,6 g.L<sup>-1</sup>, being the most favorable conditions using 40,0 of molasses and 25,0 g of milhocina. The production of LA obtained by the use of starch as CS and corn steep liquor as NS ranged between 1,4 and 2,2 g.L<sup>-1</sup>, the best condition being achieved using 40,0 g of starch and 40,0 g of corn steep liquor. By means of calculations varying the coded concentrations of CS and NS from -1,41 to +1,41 it was possible to experimentally validate the models under the same experimental conditions of the CRCD. As the value obtained experimentally for both was statistically equal to the value predicted by the model can consider the model valid for both designs. In the test bioreactor using 40 g.L<sup>-1</sup> of molasses and 18.6 g.L<sup>-1</sup> of corn steep liquor at 37 °C, was observed an exponential growth in the production of LA between 16 and 48 h of culture, stabilizing after this period, while there was a decrease in substrate consumption up to 56 h, was totally consumed. With this test was achieved in LA productivity of 0,11 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and the conversion factor was 1,43 g.g<sup>-1</sup> and maximum productivity of 0,14 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

**Key-words:** *Lactobacillus amylovorus*, lactic acid and organic industry residues.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Isômeros espaciais do ácido láctico .....	15
Figura 1.2 – Síntese química do ácido láctico através de hidrólise da lactonitrila .	17
Figura 1.3 – Tipos de processos fermentativos para a produção de ácido láctico ..	18
Figura 1.4 – Tipos de ligação entre moléculas de glicose para formação de maltose e amido .....	23
Figura 1.5 – Rotas metabólicas de fermentação da glicose pelas bactérias lácticas	28
Figura 2.1. Equipamento utilizado para o cultivo de <i>L. amylovorus</i> em frascos erlenmeyer com e sem agitação .....	33
Figura 2.2 - Biorreator utilizado no processo de cultivo de <i>Lactobacillus amylovorus</i> visando à síntese de ácido láctico .....	36
Figura 3.1 – Gráfico do perfil de crescimento do <i>Lactobacillus amylovorus</i> em diferentes condições de agitação .....	39
Figura 3.2 – Gráfico do perfil de produção de ácido láctico e consumo do substrato no cultivo de <i>Lactobacillus. amylovorus</i> em diferentes condições de agitação.....	40
Figura 3.3 – Gráfico de perfil de crescimento celular do <i>Lactobacillus amylovorus</i> , em diferentes condições de temperatura .....	41
Figura 3.4 – Gráfico da produção de ácido láctico e consumo de substrato durante cultivo de <i>Lactobacillus amylovorus</i> , em diferentes temperaturas .....	42
Figura 3.5 – Gráfico de superfície de resposta demonstrando a interação entre concentração de melaço (FC) e concentração de milhocina (FN) sobre a produção de ácido láctico .....	47
Figura 3.6 – Curvas de contorno da produção de ácido láctico, utilizando melaço como FC e milhocina com FN.....	48
Figura 3.7 – Gráfico de superfície de resposta demonstrando a interação entre concentração de amido (FC) e concentração de milhocina (FN) sobre a produção de ácido láctico .....	53
Figura 3.8 – Curvas de contorno da produção de ácido láctico, utilizando amido como FC e milhocina com FN .....	54
Figura 3.9 – Produção de AL por <i>Lactobacillus amylovorus</i> cultivado em diferentes meios .....	55
Figura 3.10 – Evolução do cultivo em batelada a 37 °C expresso em consumo de substrato, evolução espontânea de pH e produção de ácido láctico .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Produção de ácido láctico (AL) por microrganismos via fermentação líquida .....	19
Tabela 2.1 – Concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no delineamento composto central rotacional – DCCR .....	34
Tabela 2.2 – Delineamento composto central rotacional – DCCR visando a otimização de produção de ácido láctico por melaço e milhocina .....	34
Tabela 2.3 – Delineamento composto central rotacional – DCCR visando a otimização de produção de ácido láctico por amido e milhocina .....	35
Tabela 3.1 – Parâmetros de produtividade ( $Q_p$ ) e fator de conversão em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ ) em diferentes condições de agitação .....	40
Tabela 3.2 – Parâmetros de produtividade ( $Q_p$ ) e fator de conversão em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ ) em diferentes temperaturas .....	43
Tabela 3.3 – DCCR com valores da produção em ácido láctico em 84 h de fermentação utilizando melaço como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio .....	44
Tabela 3.4 – Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa sobre os parâmetros: concentração de melaço e concentração de milhocina .....	45
Tabela 3.5 – Coeficientes de regressão para resposta de produção de ácido láctico utilizando melaço como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio .....	46
Tabela 3.6 – Concentrações de AL predita pelo modelo e experimental utilizando melaço como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio .....	49
Tabela 3.7 – DCCR com valores da produção em ácido láctico em 84 h de fermentação utilizando amido como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio .....	50
Tabela 3.8 – Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa sobre os parâmetros: concentração de amido e concentração de milhocina .....	51
Tabela 3.9 – Coeficientes de regressão para resposta de produção de ácido láctico utilizando amido como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio .....	52
Tabela 3.10 – Concentrações de AL predita pelo modelo e experimental utilizando amido como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio .....	55
Tabela 3.11 – Concentração de ácido láctico ([AL]) no final da produção, produtividade em ácido láctico ( $Q_p$ ), produtividade máxima ( $Q_{máx}$ ) e fator de conversão de substrato em produto em 80 h ( $Y_{P/S}$ ) .....	57

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AL – ácido láctico

ALAB – bactérias lácticas amilolíticas

ATP –

A/O – emulsão formada por fase aquosa dispersa em uma fase orgânica

AM – amido

°C – graus Celsius

DCCR – delineamento composto central rotacional

FC – fonte de carbono

FN – fonte de nitrogênio

g.L<sup>-1</sup> – grama por litro

g.g<sup>-1</sup> – grama por grama

h – hora

HPLC – cromatografia em fase líquida

L – litro

LAB – bactérias lácticas

ME – melação

MI - milhocina

mL – mililitro

MRS – Meio de cultura Mann, Rogosa e Sharpe

PLLA – poli(L - ácido láctico)

Qp – produtividade

RMN <sup>1</sup>H – ressonância magnética nuclear de prótons

ROP – polimerização por abertura do anel do lactide

V/V – volume por volume

μL – microlitros

μm – micrometros

Yp/s – fator de conversão substrato em produto

% - por cento

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA .....	15
1.1 Ácido láctico .....	15
1.1.1 Síntese química do ácido láctico .....	16
1.1.2 Produção de ácido láctico por fermentação .....	17
1.2 Fontes de carbono .....	21
1.2.1 Melão .....	22
1.2.2 Amido .....	23
1.3 Fontes de nitrogênio .....	24
1.4 Bactérias lácticas – LAB .....	25
1.5 Bactérias lácticas amilolíticas – ALAB .....	26
1.6 Metabolismos dos carboidratos .....	27
1.7 Aplicações de ácido láctico .....	29
1.8 Poli (L-ácido láctico) – PLLA.....	30
CAPÍTULO II – METODOLOGIA .....	32
2.1 Microrganismo e manutenção .....	32
2.2 Definição dos parâmetros de cultivo .....	32
2.2.1 Definição de agitação .....	32
2.2.2 Definição da temperatura de cultivo .....	33
2.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) .....	33
2.4 Verificação do modelo em escala ampliada .....	35
2.5 Metodologia analítica .....	36
2.5.1 Determinação da biomassa .....	36
2.5.2 Determinação do ácido láctico e consumo do substrato.....	36
2.6 Metodologia de cálculo .....	37
2.6.1 Fatores de conversão ( $y_{p/s}$ ) .....	37
2.6.2 Produtividade no tempo final de produção .....	37
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	39
3.1 Ensaios para verificação da influência da agitação na produção de ácido lactico .....	39
3.2 Ensaios para verificação da influência da temperatura na produção de ácido láctico .....	41

3.3 Delineamento composto central rotacional – DCCR .....	43
3.3.1 Avaliação do meio de cultura composto de melação (AM) e milhocina (MI).	43
3.3.2 Avaliação do meio de cultura composto de amido (ME) e milhocina (MI) ..	49
3.4 Verificação do modelo em escala ampliada .....	56
CONCLUSÃO .....	59
REFERÊNCIAS .....	61
ANEXO A – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ANÁLISES EM SOBREPOSIÇÕES DO EXPERIMENTO REALIZADO EM HPLC .....	68
ANEXO B – VALORES CALCULADOS PARA A VALIDAÇÃO DO DELINEAMENTO PARA AMIDO E MILHOCINA .....	69
ANEXO C – VALORES CALCULADOS PARA A VALIDAÇÃO DO DELINEAMENTO PARA MELAÇÃO E MILHOCINA .....	70

## INTRODUÇÃO

Na última década, a produção de ácido láctico tem atraído considerável atenção, por ser matéria prima para a síntese do poli(L-ácido láctico) (PLLA), um dos polímeros biodegradáveis mais pesquisados neste período, tanto como objeto da pesquisa de base quanto na indústria química. O ácido láctico pode ser produzido por síntese química quanto por fermentação microbiana. A vantagem da biossíntese é a obtenção de um produto opticamente puro, alcançado pela seleção de cepas que produzem apenas o isômero L, enquanto a rota sintética sempre produz uma mistura racêmica de ácido láctico D, L.

Cerca de 90 % de L-ácido láctico é produzido por fermentação das bactérias lácticas (HOFVENDAHL & HAGERDAL, 2000; WANG *et al.*, 2002). No entanto, essas bactérias têm a exclusiva necessidade de minerais, vitaminas, peptídeos específicos para garantir o seu crescimento ótimo para a produção do ácido láctico (HUGENHOLTZ & KLEEREBEGEM, 1999). Os substratos para a produção do ácido láctico mais amplamente empregados como fonte de carbono são açúcares refinados, os quais são de alto custo. Entretanto, a biossíntese permite a possibilidade do uso de resíduos da agroindústria como substratos, tais como amido e outros polissacarídeos, facilmente disponíveis a partir do milho, melão de beterraba, cana de açúcar, batata e outras biomassas (GAO *et al.*, 2007).

O extrato de levedura comumente utilizado como fonte de nitrogênio, é um nutriente adequado para garantir o crescimento dessas bactérias, mas seu alto custo é uma limitação para a sua aplicação em processos industriais, portanto, é desejável encontrar alguns nutrientes que são rentáveis para serem empregados em processos industriais. Alguns nutrientes de baixo custo, tais como proteína hidrolisada de soja (HSIEG *et al.* 1999), resíduos de peixes (MARTONE *et al.*, 2005), milhocina que é a água resultante da maceração do milho (RIVAS *et al.*, 2004), subprodutos da indústria cervejeira (PAULI & FITZPATRICK, 2002) e proteínas hidrolisadas do soro de queijo (FITZPATRICK *et al.*, 2003) têm sido utilizados para a produção de ácido láctico.

Cerca de 85% da demanda de ácido láctico produzido por fermentação, está associada à indústria de alimentos, onde possui vasta aplicação, sendo utilizado como acidulante, anti-oxidante, estabilizante e como agente de limpeza. Atua como

conservante natural nos alimentos, tais como iogurte, manteiga, vegetais em conservas e dentre outros (DATTA, 1995).

Neste contexto, o **objetivo geral** deste trabalho foi estudar a biossíntese de ácido láctico por linhagens de *Lactobacillus amilolíticos* a partir de resíduos agroindustriais usando diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Sendo **os objetivos específicos**:

- Verificar a influência do amido como fonte de carbono (FC) e da milhocina como fonte de nitrogênio (FN) sobre a produção de ácido láctico por meio de um delineamento composto central rotacional;
- verificar a influência do melaço fonte de carbono (FC) e da milhocina fonte de nitrogênio (FN) sobre a produção de ácido láctico produção de ácido láctico por meio de um delineamento composto central rotacional;
- validar experimentalmente os delineamentos utilizados para a biossíntese de ácido láctico;
- verificar a aplicação do modelo em escala ampliada.

## CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Ácido láctico

Ácido láctico é o nome comum dado ao ácido 2-hidroxi-propanóico, descoberto em 1780 pelo químico sueco C. W. Sheele, que o isolou como um composto impuro a partir do leite ácido (DATTA *et al.*, 1995). Na época da descoberta, houve uma suspeita de que a substância descoberta por Scheele fosse uma mistura de compostos já conhecidos. Porém, outro químico sueco, J. Berzelius, repetiu os experimentos de Scheele e concluiu que o ácido láctico era um composto simples. Berzelius encontrou ainda o ácido láctico no leite fresco, carne bovina, no sangue e em outros fluidos de origem animal (TRINDADE, 2002).

Trata-se de um  $\alpha$ -hidroxi simples com um carbono assimétrico. Portanto, possui duas formas enantioméricas com atividade óptica. As formas dextrógira e levógira, ilustradas na Figura 1.1, são chamadas de isômeros espaciais ou estereoisômeros, pois elas diferem entre si apenas pela maneira nas quais os átomos estão dispostos no espaço, mas são idênticas no que se refere à ordenação dos átomos e às ligações atômicas presentes.

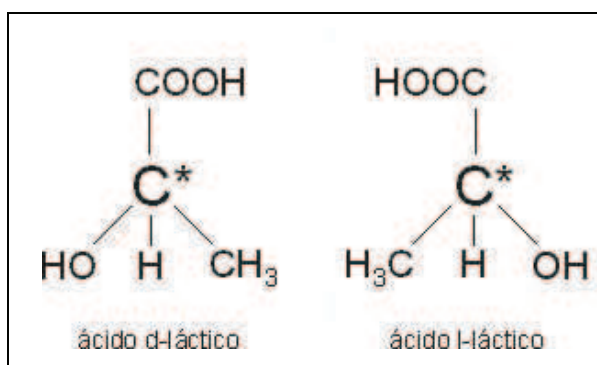


Figura 1.1 – Isômeros espaciais do ácido láctico.

O ácido láctico é o principal componente do leite ácido. No corpo humano, pode ser encontrado no sangue, músculo, pele e cabelo. A conversão metabólica do ácido L-



lático no homem é mais rápida do que a do ácido D-lático e, portanto, a forma levógira é preferida nas aplicações em alimentos e medicina (LEE *et al.*, 1998).

O ácido lático é um ácido orgânico natural que pode ser produzido por síntese química ou por fermentação. A vantagem significativa da produção biotecnológica por fermentação em vez de síntese química é de poder utilizar matéria prima de baixo custo, tais como melão, resíduo amiláceo, celulose e outros materiais ricos em carboidratos (ANURADHA *et al.*, 1999; VISHNU *et al.*, 2000). Pesquisadores buscam a redução dos custos de produção e têm desenvolvido diferentes processos, dos quais se destaca a fermentação direta, um dos processos mais rentáveis de produção de ácido lático. Na sua recente revisão, Reddy *et al.* (2008) indica bactérias lácticas amilolíticas para uma única etapa na conversão de ácido lático, na qual foi estudada a conversão direta de biomassa em ácido lático, dando especial interesse na degradação simultânea dos complexos de biomassa (sacarificação) e utilização de açúcar para a produção de ácido lático (fermentação).

Atualmente, 90% do total de ácido lático é produzido anualmente pela fermentação, sendo o restante produzido sinteticamente a partir da hidrólise da lactonitrila (NOLASCO-HIPOLITO *et al.*, 2002).

### 1.1.1 Síntese química do ácido lático

A síntese química de ácido lático baseia-se principalmente na hidrólise da lactonitrila (Figura 1.2), um derivado petroquímico, por ácidos fortes, que prevê apenas a mistura racêmica de D- e L- ácido lático. Outras possíveis rotas de síntese química de ácido lático incluem (a) oxidação de propilenoglicol, reação de acetaldeído, monóxido de carbono e água em temperaturas e pressões elevadas, (b) hidrólise de ácido 2-cloropropiônico, ácido acético, ácido nítrico e (c) oxidação de propileno, contudo nenhuma destas rotas é economicamente viável (DATTA *et al.*, 1995). Os métodos sintéticos de produção do ácido lático são geralmente mais caros que os fermentativos. A vantagem competitiva do ácido lático produzido por síntese química está nos menores custos de purificação necessários, entretanto, os custos de matéria prima são geralmente elevados.

O ácido lático produzido sinteticamente é estável termicamente e não contém quantidades residuais de carboidratos, presentes muitas vezes no ácido produzido por fermentação, que comprometem a qualidade do produto, sobretudo quando estocado por

grandes períodos (TRINDADE, 2002). No entanto, a rota química sempre leva à formação de uma mistura racêmica, na qual as concentrações das formas D- e L- são iguais.

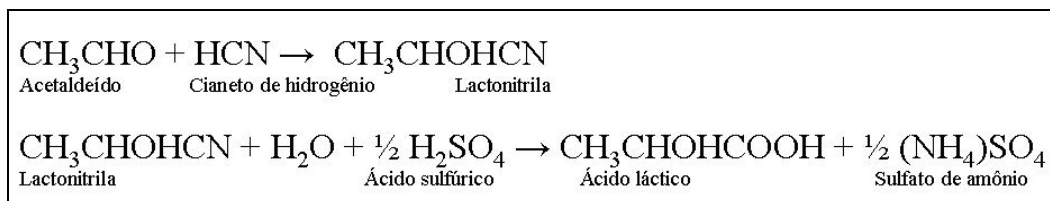


Figura 1.2 – Síntese química do ácido láctico através de hidrólise da lactonitrila. (Fonte: LEITE, 2006).

### 1.1.2 Produção de ácido láctico por fermentação

O ácido láctico também é facilmente obtido pelo processo biotecnológico, usualmente utilizando cepas de *Lactobacillus* a partir de matérias primas de baixo custo (NARAYANAN & ROYCHOUDHURY, 2004). Geralmente, o processo ocorre em duas etapas: a sacarificação, seguida pela fermentação por *Lactobacillus*. A conversão direta do amido em ácido láctico pela bactéria com a produção de ácido amilolítico e láctico pode eliminar o processo de duas etapas, tornando-o economicamente mais viável (ALTAF *et al.*, 2007).

Existem diferentes processos biotecnológicos para a produção de ácido láctico, como ilustrado na Figura 1.3. Geralmente, são utilizados açúcares hidrolisados em vez de açúcares refinados, que podem ser empregados tanto para a fermentação submersa quanto para fermentação em meio sólido (ROJAN *et al.*, 2005; JOHN *et al.*, 2006a).

A conversão de amido ou de celulose em açúcar consome energia durante a liquefação ou sacarificação e aumenta o custo de produção. Woiciechowski *et al.* (2002) estudaram a hidrólise de bagaço e amido de mandioca por hidrólise ácida e enzimática. Eles relataram que ambos os métodos eram bastante eficientes quando considerados um ou mais parâmetros, tais como, porcentagem de hidrólise, tempo, custo dos produtos químicos e o consumo de energia.

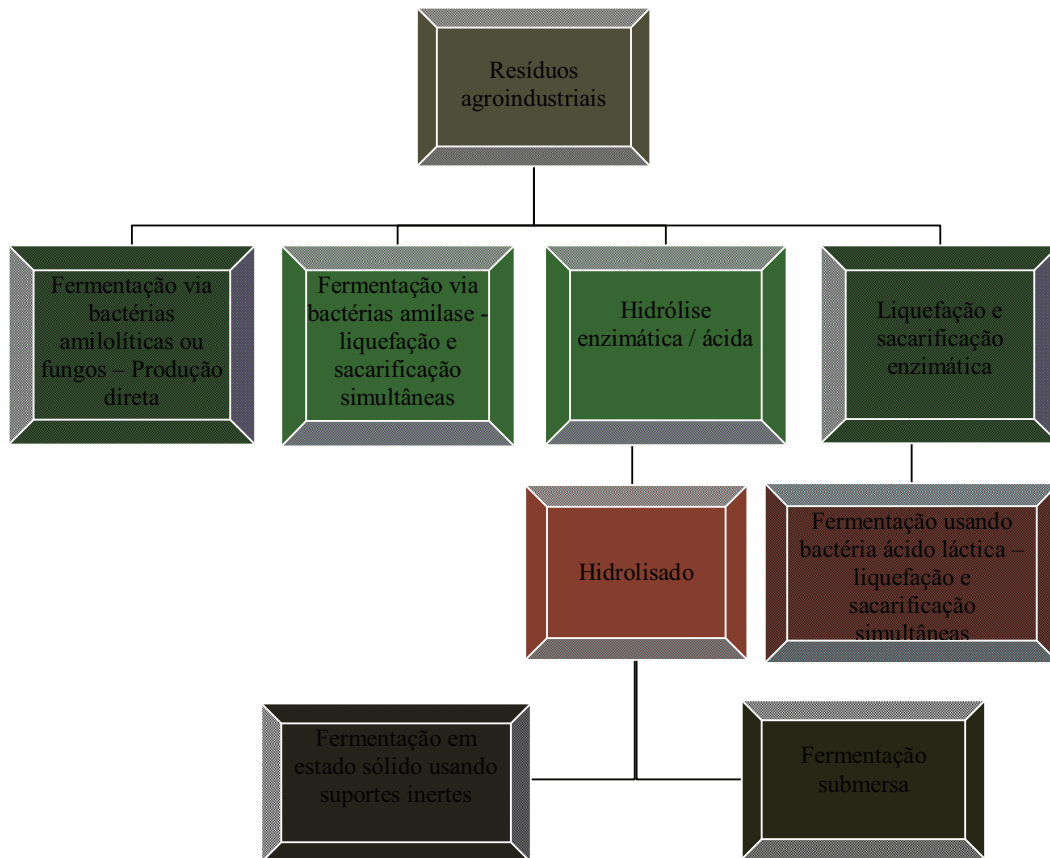


Figura 1.3 – Tipos de processos fermentativos para a produção de ácido láctico. (Fonte: adaptado de JOHN *et al.*, 2009).

A literatura mostra que *Lactobacillus amylophilus* pode fermentar diretamente amido em ácido láctico L(+) por fermentação submersa (VISHNU *et al.*, 2000). Comparando com outras espécies de *Lactobacillus* reportadas na literatura (LITCHFIELD, 1996; MERCIER *et al.*, 1992; YUMOTO & IKEDA, 1995; ZHANG & CHERYAN, 1991), *Lactobacillus amylophilus* mostrou eficiência amilolítica mais alta, o que pode levar à eliminação do passo de sacarificação do amido com alta eficiência na produtividade (NAVEENA *et al.*, 2005).

Na Tabela 1, podem ser verificados os estudos realizados por diversos pesquisadores relacionados com a produção de ácido láctico por diferentes bactérias e substratos. Observa-se que a *Streptococcus bovis*, espécie encontrada recentemente, possui um alto potencial na fabricação de ácido láctico.

Tabela 1.1 – Produção de ácido láctico (AL) por microrganismos via fermentação líquida.

<i>Microrganismo</i>	<i>Substratos</i>	<i>[AL] g L<sup>-1</sup></i>	<i>Fonte</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	Amido	14,7	NARITA <i>et al.</i> , 2004
<i>L. manihotivorans</i>	Amido e resíduos alimentares	19,5	OHKOUCHI & INOUE, 2006
<i>L. plantarum</i>	Amido mandioca	88	GIRAUD <i>et al.</i> , 1994
<i>L. amylophilus</i>	Amido liquefeito	53,4	YUMOTO & IKEDA, 1995
<i>L. plantarum</i>	Amido liquefeito	72,9	KRISHNAN <i>et al.</i> , 1998
<i>L. amylophilus</i>	Amido de milho	29	MERCIER <i>et al.</i> , 1992
<i>L. amylovorus</i>	Amido de milho	10,1	XIAODONG <i>et al.</i> , 1997
<i>L. amylovorus</i>	Amido de arroz	7,9	XIAODONG <i>et al.</i> , 1997
<i>L. amylovorus</i>	Fécula de trigo e amido de trigo	7,8	XIAODONG <i>et al.</i> , 1997
<i>L. amylovorus</i>	Mandioca	4,8	XIAODONG <i>et al.</i> , 1997
<i>L. amylovorus</i>	Fécula de batata	4,2	XIAODONG <i>et al.</i> , 1997
<i>L. rhamnosus</i>	Resíduos de peixe hidrolisado	80	GAO <i>et al.</i> , 2006
<i>L. manihotivorans</i>	Resíduos de alimentos	48,7	OHKOUCHI & INOUE, 2006

O *Streptococcus bovis* 148 utilizado por Narita *et al.* (2004) foi isolado a partir do lúmen intestinal bovino e cultivado a 37 °C. Para a fermentação foi utilizado meio de cultivo M17 e como substrato o amido de milho bruto. Os experimentos foram realizados em biorreator de 2,0 L, com volume de trabalho de 1,0 L. Após a autoclavagem do biorreator com o M17, 20 g.L<sup>-1</sup> de amido cru adicionado de NaN<sub>3</sub> e cicloheximida para evitar a contaminação do experimento. Neste estudo, os autores obtiveram uma concentração em torno de 14,7 g.L<sup>-1</sup> de ácido láctico a 37 °C após 96 h de processo.

Gao *et al.* (2006) utilizaram *Lactobacillus rhamnosus* (NBRC 3863), para a produção de ácido láctico, tendo em vista que a mesma fornece alta produtividade e rendimento na produção de ácido láctico. A fermentação foi conduzida em meio de cultivo composto por 100 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 0,1 g de NaCl, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 g de MgSO<sub>4</sub> e como substrato alternativo 17, 34, 51 ou 68 g de resíduo de peixe hidrolisado.

A temperatura mantida durante todo o processo foi de 42 °C e a frequência de rotação foi de 100 min<sup>-1</sup>. O valor de pH foi controlado em torno 6,0 pela adição de 10 % de amônia aquosa. Os resíduos de peixe continham cabeças e partes ósseas que foram picadas, suspensas em água e hidrolisadas, em seguida, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi utilizado como fonte de nutrientes para a produção de ácido láctico. Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que *Lactobacillus rhamnosus* produziu cerca de 80 g.L<sup>-1</sup> de ácido láctico em 37 h de produção utilizando 68 e 51 g L<sup>-1</sup> de resíduo de peixe, já quando utilizado 17 g.L<sup>-1</sup> de resíduos de peixe, a produção de ácido láctico foi de 75 g.L<sup>-1</sup>, porém em um tempo de 63 h.

As amostras de resíduos alimentares foram utilizadas por Ohkouchi *et al.* (2006) como substrato para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. Este cepa foi cultivada a 30 °C em meio MRS modificado contendo em 1 L de meio: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de carne, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de citrato triamoniaco, 0,02 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g de MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1 mL de tween 80 e 10 g de fonte carbono. As fermentações foram realizadas com agitação de 20 min<sup>-1</sup> sob condições micro-aeróbica, pH 5 e a 25 °C. A maior produção de ácido láctico, com meio de cultura contendo resíduos de alimentos e cerca de 60 g.L<sup>-1</sup> de açúcares totais, foi de 48,7 g.L<sup>-1</sup> e a pureza óptica do ácido láctico produzido foi em torno de 98,5 %.

O microrganismo utilizado por Giraud *et al.* (1994) foi o *Lactobacillus plantarum* A6 isolados a partir da mandioca macerada. Como substrato foi utilizado 45 g.L<sup>-1</sup> amido de mandioca e como nutrientes 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona de soja, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g.L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. O processo fermentativo foi realizado em biorreator de 2 L a 30 °C, com agitação de 300 min<sup>-1</sup> e pH ajustado em 6,0 pela adição de NaOH 5 N. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que em três dias de fermentação foram obtidas uma produção de 41 g.L<sup>-1</sup> de ácido láctico com rendimentos em produto de 91,1 %. Xiaodong *et al.* (1997) utilizaram *Lactobacillus amylovorus* para a produção de ácido láctico, utilizando vários substratos provenientes de resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Os experimentos foram realizados em frascos de 500 mL contendo 250 mL de meio, incubados a 40 °C. Quando o amido de milho foi utilizado como fonte de carbono, a produção de ácido láctico foi de 10,1 g.L<sup>-1</sup>, com o uso de amido de trigo foram obtidos 7,8 g.L<sup>-1</sup> de AL e com amido de arroz 7,9 g.L<sup>-1</sup>. Porém, quando utilizado amido proveniente de tubérculos os valores de produção foram reduzidos

consideravelmente, com amido de batata a produção foi de 4,2 g.L<sup>-1</sup> e com amido de mandioca, obteve-se 4,8 g.L<sup>-1</sup> de ácido láctico.

*Lactobacillus amylophilus* (NRRC estirpe B-4437) foi utilizado por Mercier *et al.* (1992) para aperfeiçoar a produção de ácido láctico através de 45 g.L<sup>-1</sup> de amido de milho, um substrato complexo que segundo os autores contém todos os elementos nutricionais necessários para o crescimento e metabolismo de *L. amylophilus*. Cada processo de fermentação foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 350 mL de meio, devidamente colocados em um sistema anaeróbio. O sistema anaeróbio foi incubado a 30 °C e agitação a 300 min<sup>-1</sup>, a maior concentração de ácido láctico obtida foi de 31,2 g.L<sup>-1</sup> resultando em um rendimento global de 90 % com base no total de carboidratos consumidos durante 40 h de cultivo.

Yumoto & Ikeda (1995) relataram que a produção de ácido láctico por *Lactobacillus amylophilus* diminuiu com o aumento da concentração de substrato e que exigiu mais de 150 h para produzir 30 g de ácido láctico a partir de 50 g de amido solúvel.

## 1.2 Fontes de carbono

Aproximadamente 3,5 bilhões de toneladas de resíduos agrícolas são produzidos por ano no mundo. Essas biomassas são potenciais fontes alternativas de carboidratos para fermentação são normalmente de baixo custo de aquisição em comparação aos açúcares refinados e amplamente disponíveis, o que as torna especialmente interessantes (ZHANG *et al.*, 2007). Os açúcares refinados são amplamente utilizados para produção de ácido láctico como substrato, porém são de alto custo (JOHN *et al.*, 2006). Maior atenção tem sido dada para a biomassa celulósica, principalmente aquelas oriundas de subprodutos ou de resíduos da agricultura, silvicultura, indústria ou de resíduos sólidos urbanos (PAN *et al.*, 2005). Embora os resíduos agroindustriais sejam ricos em hidratos de carbono, sua utilização é limitada devido ao baixo conteúdo de proteína e a pobre digestibilidade, decorrente da presença de resíduos celulósicos (JOHN *et al.* 2007). Alguns resíduos agrícolas que são substratos potenciais para produção de ácido láctico são: lignocelulose / hemicelulose hidrolisada (KAREL *et al.*, 1997), casca de algodão, espiga e caules de milho (VICKROY, 1985), beterraba, melão (GOKSUNGUR & GUVENC, 1999; KOTZAMANIDIS *et al.*, 2002), bagaço de cana de açúcar (XAVIER

& LONSANE, 1994), bagaço de mandioca (ROJAN *et al.*, 2005, JOHN *et al.*, 2006a, b), celulose (VENKATESH, 1997), cenoura (PANDEY *et al.*, 2001), melaço gasto em lavagem (SHARMA *et al.*, 2003), fibra de milho hidrolisado (SAHA & NAKAMURA, 2003) e farelo de trigo (JOHN *et al.*, 2006b; NAVEENA *et al.*, 2005a, b).

Em muitos casos locais, o cultivo extensivo de fontes de energia renováveis, tais como amido de batata e tapioca torna a sua utilização economicamente atraente. Normalmente, o amido deve ser previamente hidrolisado à glicose antes que possa ser fermentado.

Outra possível fonte de carbono estudada para a produção de AL tem sido o soro de queijo, que é resíduo de origem animal rico em lactose proveniente da indústria de laticínios, rico em lactose. (PAULI & FITZPATRICK, 2002; PODLECH *et al.*, 1990).

### 1.2.1 Melaço

O melaço proveniente das indústrias de açúcar também pode ser utilizado como substrato na produção fermentativa do ácido láctico. O melaço é um coproduto obtido da produção de açúcar, tanto de cana como da beterraba. Este líquido viscoso e apetecível possui qualidades nutritivas excepcionais e, além disso, é uma fonte de energia natural. Também é um aglomerante natural muito útil na produção de alimentos compostos para animais e um ingrediente muito conhecido na alimentação animal (TATE & LYLE, 2009).

As propriedades físicas e químicas do melaço são únicas e permitem o seu uso numa grande variedade de processos industriais. Também é um substrato singular para os processos de fermentação e oferece diversas vantagens, principalmente pelo controle da viscosidade e por ser uma fonte de nitrogênio para o tratamento de águas e solos (FONTES, 1989).

O melaço é a resultante da etapa de centrifugação ou de decantação, no processo de fabricação de açúcar refinado. Contém açúcares redutores e parte de sacarose não cristalizada. Como subproduto dos processos de produção de açúcar, é usado como alimento para animais e para produção de etanol e fermento, podendo ser utilizado também para a produção de ácido láctico via fermentação. O açúcar mais abundante no

melaço é a sacarose, que é responsável pela sua elevada viscosidade (HOFVENDAHL & HAN -HAGERDAL, 2000).

### 1.2.2 Amido

O amido obtido de resíduos industriais ou agrícolas é outro substrato comum para produção de ácido láctico. Ele é hidrolisado para maltose e glicose para possibilitar a fermentação. Algumas fontes empregadas para obtenção de amido para uso em fermentações são trigo, milho, mandioca, batata, arroz, centeio, sorgo e cevada. Entretanto, o amido necessita ser complementado com nutrientes para uso como substrato, que principalmente extrato de leveduras e peptona (HOFVENDAHL & HAHN-HAGERDAL, 2000).

O amido é composto principalmente de amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear constituído por aproximadamente de 6.000 unidades de glicose, conectadas por ligações  $\alpha$  (1,4) enquanto que a amilopectina é constituída de ligações  $\alpha$  (1,4) e  $\alpha$  (1,6), como demonstrado na figura 1.4.

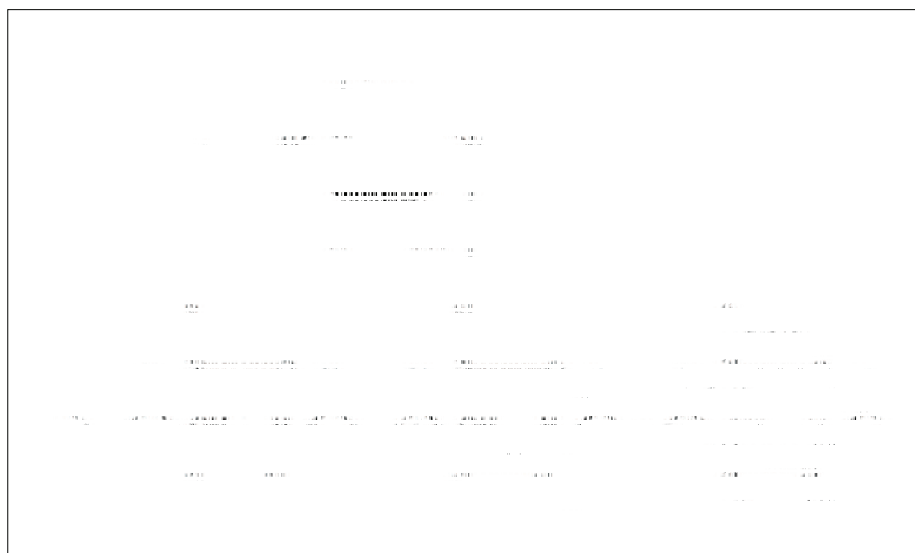


Figura 1.4 – Tipos de ligação entre moléculas de glicose para formação de maltose e amido. (Fonte: SURMELY, 2003).

A estrutura linear é fácil de ser rompida, mas a estrutura altamente ramificada da amilopectina é mais difícil de ser hidrolisada. A hidrólise do amido é sempre feita em



suspensões gelificadas pelo calor, para que as enzimas possam ser mais eficientes (SURMELY *et al.*, 2003).

Dois grupos de enzimas podem ser identificados, as de liquefação (removem a viscosidade) e as de sacarificação, que transformam a suspensão de amido liquefeito em açúcares (sacarificantes). Há poucas enzimas amilolíticas comerciais disponíveis no Brasil. Muitas são as diastases que são usadas em processos de panificação ou em rações animais (SURMELY, *et al.*, 2003).

Bactérias lácticas amilolíticas, tais como *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus* (ZHANG e CHERYAN, 1991) e *Lactobacillus plantarum* A6 (GIRAUD *et al.*, 1994) podem converter amido diretamente em ácido láctico.

### 1.3 Fontes de nitrogênio

A adição de nutrientes geralmente leva a uma melhora significativa dos processos fermentativos. Porém, alguns desses nutrientes não são economicamente viáveis, por isso ocorre uma grande busca por matérias primas provenientes de fontes renováveis e até mesmo de resíduos agroindustriais. O extrato de malte, extrato de levedura e milho são as fontes nitrogenadas mais comumente utilizadas para a produção de ácido láctico (HUJANEN & LINKO, 1996).

Pesquisas atuais estão centradas na procura efetiva de fontes de nitrogênio e novas técnicas de fermentação. Tem sido sugerida para a produção de ácido láctico a utilização de milhocina (água de maceração do milho) que é um subproduto da moagem do milho. Atualmente, a milhocina é evaporada a um xarope de 50% de sólidos e comercializada principalmente como suplemento alimentar para gados. A milhocina possui vitaminas, minerais e carboidratos eficazes para a fermentação (FORMANEK, 1998; PAREKH *et al.*, 1999).

A milhocina é a água de maceração de milho, sendo um resíduo resultante da produção do milho cultivado em grande parte do mundo. A milhocina, é uma fonte potencialmente útil de substituição de nitrogênio.

Segundo Hoch (1997), mesmo depois de todos os processos de industrialização do milho, a milhocina ainda é economicamente atrativa, e os estudos já mostraram resultados satisfatórios para o produto como meio de crescimento bacteriano, por ser uma potencial fonte de nitrogênio.

#### 1.4 Bactérias lácticas - LAB

As bactérias lácticas englobam um diverso grupo de bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos. Essas bactérias existem nas formas de cocos ou bacilos (WOOD & HOLZAPFEL, 1995).

*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* são os gêneros mais estudados entre as bactérias lácticas (AXELSSON, 2004; DAVIDSON *et al.*, 1995; ERCOLINI *et al.*, 2001; JAY, 2000; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; STILES E HOLZAPFEL, 1997). *Lactobacillus* é o maior destes gêneros, compreendendo cerca de 80 espécies reconhecidas (AXELSSON, 2004).

As bactérias lácticas são um grupo de bactérias que produzem ácido láctico como produto metabólico. As LAB têm a propriedade de produzir ácido láctico através da fermentação de carboidratos e têm sido utilizadas para fermentar alimentos há pelo menos 4.000 anos. Os *Lactobacillus* são estritamente fermentativos, aero-tolerantes ou anaeróbicos, acidófilos e com complexas exigências nutricionais como carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais, vitaminas e derivados de ácidos nucleicos (LEITE, 2006).

As bactérias lácticas podem ser divididas em dois subgrupos bioquímicos de acordo com os produtos formados a partir de glicose:

- Bactérias homofermentativas: são muito importantes na fabricação do ácido láctico.
- Bactérias heterofermentativas: a fermentação da glicose por essas bactérias resulta em vários produtos.

Os principais microrganismos empregados industrialmente para a produção do ácido láctico são as bactérias homoláticas do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus*. A espécie escolhida depende do carboidrato disponível e da temperatura a ser empregada: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus* necessitam de temperatura na faixa de 45 - 50°C; *Lactobacillus casei* e *Streptococcus lactis*, temperatura de aproximadamente 30°C, *Lactobacillus pentosis*, *Lactobacillus leishmanii*, temperatura acima de 30°C.

### 1.5 Bactérias lácticas amilolíticas - ALAB

A ocorrência das bactérias lácticas amilolíticas (ALAB), foi relatada a partir de diferentes amiláceos de alimentos tropicais, elaborados principalmente da mandioca e de cereais como o milho. ALAB foram repetidamente isoladas a partir de cereais ou alimentos fermentados tradicionais a base de mandioca (JOHANSSON *et al.*, 1995; MORLON *et al.* 1998; NWANKWO *et al.*, 1989; OLÍMPIA *et al.*, 1995; SANNI *et al.*, 2002). Devido à sua capacidade de para hidrolisar parcialmente amidos crus (RODRIGUEZ-SANOJA *et al.*, 2000), ALAB pode fermentar diferentes tipos de matérias primas amiláceas, tais como o milho (NAKAMURA, 1981), a batata (CHATTERJEE *et al.*, 1997) ou a mandioca (GIRAUD *et al.*, 1994), bem como diferentes substratos feculentos (VISHNU *et al.*, 2000, 2002; NAVEENA *et al.*, 2003, 2005a, b, c).

Cepas de *Lactobacillus plantarum* foram isoladas a partir de produtos africanos fermentados à base de mandioca (NWANKWO *et al.*, 1989) e espécies de *Lactobacillus manihotivorans* foram isoladas na Colômbia a partir de amido azedo de mandioca (MORLON - GUYOT *et al.*, 1998). Olímpia e colaboradores (1995) caracterizam cepas amilolíticas de *Lactobacillus plantarum* isoladas a partir de Burong ISDA, um alimento fermentado feito a partir de peixes e arroz nas Filipinas. Cepas de *Lactobacillus fermentum* foram isoladas do milho pela primeira vez, por Agati *et al.* (1998).

Recentemente, Sanni e colaboradores (2002) descrevem cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* encontradas em diversos alimentos fermentados da Nigéria. Seu papel ainda não foi esclarecido, visto que mono e dissacarídeos, como a glicose e sacarose, que ocorrem naturalmente nos cereais e na mandioca, são facilmente disponíveis para a fermentação de ácido láctico.

A forma como a matéria prima é processada pode determinar a composição da microbiota, e, em particular, a ocorrência de ALAB (GUYOT *et al.*, 2000). ALAB amilolíticas utilizam biomassa e féculas para converter em ácido láctico, em uma única etapa de fermentação.

*Lactobacillus amylovorus* é uma espécie de bactérias gram-positivas, em forma de bastonete isolada do trato intestinal de humanos e animais, podendo estar presente em demais regiões do corpo humano. Este microrganismo produz como produto

fermentado, o leite acidophiluse o ácido láctico. (*Lactobacillus amylovorus* Definition, 2011).

## 1.6 Metabolismo dos carboidratos

O metabolismo dos carboidratos pelas bactérias lácticas pode ser classificado como homoláctico ou heteroláctico.

- Fermentação homoláctica: Os primeiros estágios da via metabólica da fermentação láctica são os mesmos da fermentação alcoólica, ou mais especificamente a via de Embden-Meyerhof ou via glicolítica. O intermediário importante para a formação do ácido láctico é o ácido pirúvico. No final da via glicolítica, o ácido pirúvico, sob a ação da enzima lactato desidrogenase dá origem ao ácido láctico. As bactérias homofermentativas podem produzir ácido láctico a partir da glicose com rendimentos superior a 85%. O rendimento líquido energético em ATP é de 2 mols ATP/mol de glicose.
- Fermentação heteroláctica: Enquanto as bactérias homofermentativas degradam a glicose através da via glicolítica, as heterofermentativas degradam a glicose através da via oxidativa das pentoses fosfato. Os compostos intermediários importantes na via heterofermentativa são o ácido pirúvico e o aldeído acético. O rendimento líquido em ATP: é de apenas 2 mols / mol de glicose pela via heterofermentativa. O rendimento em ácido láctico das bactérias heterofermentativas é de 50% de ácido láctico.

Nas bifibactérias, a fermentação heretoláctica leva à formação somente de acetato e lactato, como pode ser visto na figura 1.5 (LEITE, 2006).

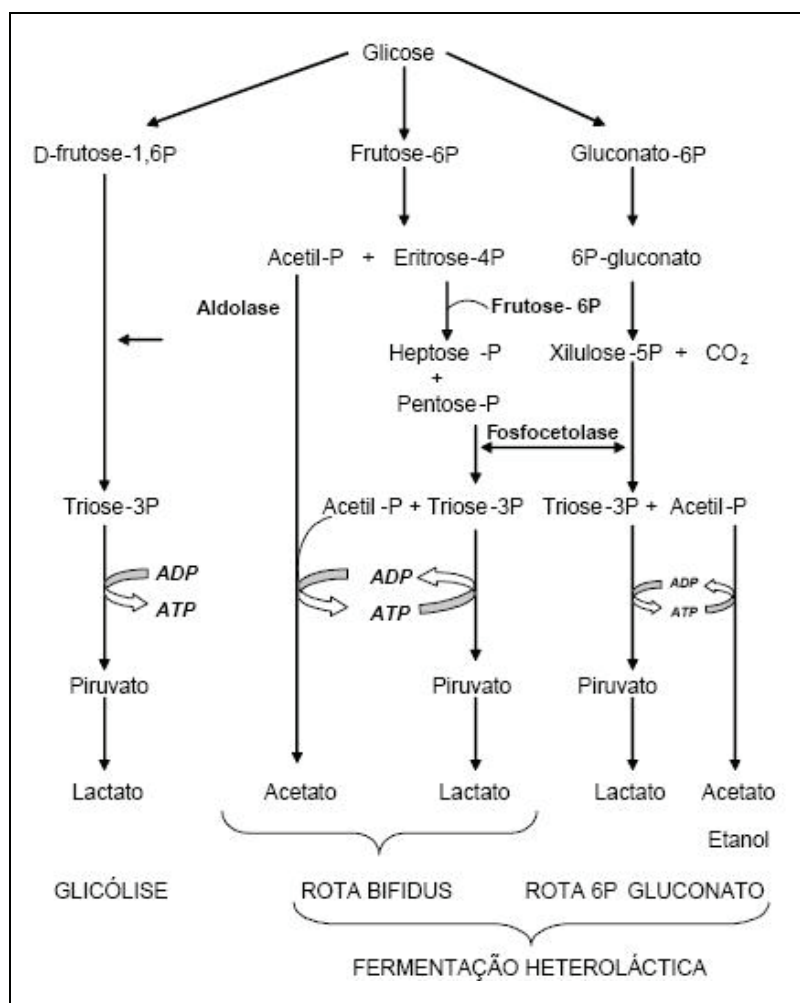


Figura 1.5 – Rotas metabólicas de fermentação da glicose pelas bactérias lácticas. (Fonte: WOOD & HOLZAPFEL, 1995).

A fermentação homoláctica ou glicólise é a degradação anaeróbica da glicose para produzir ácido láctico. A glicólise é uma das inúmeras vias catabólicas conhecidas genericamente como fermentações anaeróbicas, através das quais muitos organismos extraem energia de vários produtos orgânicos, na ausência de oxigênio. Uma vez que os organismos vivos surgiram primeiramente em uma atmosfera carente de oxigênio, a fermentação anaeróbica é o tipo mais primitivo de mecanismo biológico para a obtenção de energia a partir de nutrientes. A maioria dos organismos superiores reteve a capacidade para a degradação anaeróbica da glicose. Além disso, na maioria dos animais, a glicólise serve como um importante mecanismo de emergência capaz de

produzir energia por períodos curtos, quando o oxigênio não está disponível. (LEHNINGER *et.al.*, 2002).

### 1.7 Aplicações do ácido láctico

Segundo Datta *et al*, (1995), por apresentar características como leve acidez, presença de grupo carboxílico e hidroxílico, que possibilitam uma grande variedade de transformações químicas, estabilidade química e térmica, biodegradabilidade e ser reconhecidamente não tóxico em até doses consideráveis, conforme certificado pela FDA (Food and Drug Administration), o ácido láctico é vastamente aplicável.

O ácido láctico pode ser transformado em etanol, propilenoglicol e polímero acrílico nas indústrias químicas. Também possui aplicação na indústria de couro e peles, no processo de descalcinação, na indústria têxtil, como fixador em beneficiamento de tecidos e como anticongelante em substituição ao etileno-glicol, com maior eficiência e menor custo. Ésteres e sais derivados do ácido láctico são usados como solventes, emulsificantes e plastificantes (SAN-MARTÍN & CHERYAN, 1992).

Na agricultura tem sido utilizado, após a transformação em filmes poliméricos, na produção de embalagens e como agente para liberação controlada de pesticidas e nutrientes, o que permite redução nos custos de aplicação e uma melhor distribuição da quantidade de espécies desejáveis ao longo do desenvolvimento dos produtos agrícolas (LIPINSK & SINCLAIR, 1986).

O ácido láctico tem sido usado em setores de alimentos e bebidas há várias décadas. É utilizado como acidulante, flavorizante, tamponante, agente inibidor de bactérias deteriorantes em uma ampla variedade de alimentos processados, tais como, pães e produtos de panificação, bebidas, sopas, produtos lácteos, cerveja, doces e geléias, maionese, ovos e seus processados, muitas vezes em articulação com outros acidulantes (DATTA *et al.*, 1995; JOHN *et al.*, 2007).

A capacidade do ácido láctico de reter água torna-o adequado para uso em formulações cosméticas e nas indústrias farmacêuticas. O poder do ácido láctico para eliminar a formação de tirosinase é responsável pelos seus efeitos, como iluminação e rejuvenescimento da pele, além de seu papel importante na produção de loções, como esfoliante para a pele (DATTA *et al.*, 1995).

Também são utilizados na síntese de polímeros biorreabsorvíveis para utilizações médicas, tais como suturas cirúrgicas, próteses, medicamentos e sistemas de distribuição controlada (WEE *et al.*, 2006).

O emprego do ácido láctico na produção de biopolímero para aplicações médicas tem aumentado significativamente sua demanda mundial. Este crescimento é motivado pela possibilidade de substituição de materiais plásticos que não sejam biodegradáveis ou biocompatíveis por biomateriais que possam ser aplicados em próteses artificiais, liberação controlada de medicamentos em aplicações médicas como reconstituições em vítimas de queimaduras, fraturas e de grandes escoriações (JU & VERMA, 1994; HONDA *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1998; SAN-MARTÍN & CHERYAN, 1992).

Apesar do vasto campo de aplicação, o uso do ácido láctico é limitado pelo preço de mercado do produto. Seu consumo seria consideravelmente aumentado, principalmente na indústria de plásticos onde o custo da matéria-prima é decisivo, nas aplicações descritas anteriormente e em muitas outras nas quais o ácido láctico possui enorme potencial. O custo final de produção do ácido láctico está associado, em sua maior parte, aos processos de separação do produto final, que requerem muitas etapas e têm elevados custos (LIPINSK & SINCLAIR, 1986).

### 1.8 Poli(L – ácido láctico) – PLLA

O ácido láctico ganhou destaque na pesquisa e na indústria como uma fonte em potencial de produção de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. A procura de ácido láctico tem aumentado consideravelmente, devido a aplicações promissoras de seus polímeros, o poli(ácido láctico) (PLA), como uma fácil alternativa de substituir aos plásticos petroquímicos. A substituição dos polímeros sintéticos existentes por biodegradáveis também pode diminuir significativamente a eliminação de resíduos. Como as propriedades físicas do PLA dependem da composição isomérica de ácido láctico, a produção de ácido láctico opticamente puro é essencial para polimerização. Outras aplicações incluem o seu papel como promotor do crescimento de plantas agrícolas, nos têxteis e de não-tecidos, tais como fiberfill, geotêxteis, toalhetes, fraldas, fibras de subcapa, etc.

Devido à quiralidade do carbono  $\alpha$  do ácido láctico, é possível a síntese química de compostos enantioméricos, levógero (L-) e destrógero (D-) rotatórios, dando origem

a polímeros com propriedades distintas (figura 1.5), como por exemplo, o poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D-ácido láctico) (PDLA) – os quais são imagens especulares um do outro e oticamente ativos – e poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) – oticamente inativos – e esta geralmente produz misturas racêmicas (PLLA + PDLA), enquanto a síntese bioquímica produz o isômero opticamente puro.

Devido à distribuição aleatória das unidades L- e D- na cadeia polimérica, o polímero racêmico não possui domínios cristalinos, sendo um material amorfo e com propriedades mecânicas significativamente inferiores quando comparado ao semicristalino PLLA ou PDLA, os quais são semicristalinos com propriedades físicas e químicas similares, diferindo apenas pelo seu efeito na luz polarizada (MELO, 2009; BARBANTI *et al.*, 2005).

O PLA de alta massa molar é um polímero termoplástico com coloração clara, brilhante, duro e com propriedades similares ao poliestireno. O PLA amorfo é solúvel em alguns solventes orgânicos como o tetrahidrofurano (THF), solventes clorados, benzeno, acetonitrila e dioxano. Já o cristalino, é solúvel em solventes clorados e benzeno em altas temperaturas (MELO, 2009).

O poli(L – ácido láctico) tem um ponto de fusão de 175 a 178 °C. PLA foi descoberto em 1932 por Carothers (DuPont), que produziu um produto de baixa massa molecular pelo aquecimento de ácido láctico no vácuo. A impossibilidade de, nessa altura aumentar a massa molecular do produto, levou à suspensão de novos estudos. Posteriormente, PLA de alta massa molecular foi sintetizado por polimerização por abertura de anel do ácido láctico. PLA tem aplicações médicas como suturas bioreabsorvíveis, como matrizes para liberação controlada de agentes ativos ou fármacos, dispositivos de fixação interna e de fratura óssea (VERT *et al.*, 1992).

O PLLA tem sido amplamente utilizado para inúmeras aplicações na área médica como implantes reabsorvíveis, suporte para crescimento celular na engenharia de tecidos, microesferas para liberação controlada de fármacos, pesticidas e fertilizantes (MOTTA & DUEK, 2006; CORAÇA, 2008; JAHNO, 2006 *et al.*; SUI *et al.*, 2006). Sua degradação depende de uma série de fatores, como tempo, temperatura, massa molar, impurezas, cristalinidade, entre outras (PEZZIN, 2001).



## CAPÍTULO II – METODOLOGIA

### 2.1 *Microrganismo e manutenção*

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *Lactobacillus amylovorus* CCT 2948, uma espécie amilolítica.

Para manutenção da cepa empregou-se o cultivo em tubo em meio MRS (Mann, Rogosa e Sharpe) completo, contendo peptona (10,0 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (4,0 g.L<sup>-1</sup>), extrato de carne (8,0 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 dipostássio (2,0 g.L<sup>-1</sup>), acetato de sódio (2,0 g.L<sup>-1</sup>), citrato triamonical (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>).

Repiques mensais foram realizados transferindo as células para tubos de ensaio inclinados contendo o meio MRS e Agar (15 g.L<sup>-1</sup>) com incubação a 37 °C durante 72 h. Em seguida os tubos foram mantidos em refrigerador a 4 °C.

Os cultivos foram realizados em jarra de anaerobiose, uma vez que o microrganismo é anaeróbio.

### 2.2 *Definição dos parâmetros de cultivo*

#### 2.2.1 *Definição de agitação*

Os experimentos, em duplicata, foram conduzidos em agitador orbital (Shaker) durante 96 h, a 37 °C. Como biorreator foram empregados frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio MRS e o inoculado na concentração volumétrica de 10%. As condições avaliadas em *Shaker* (Figura 2.1) foram sem agitação e com agitação rotatória de 120 min<sup>-1</sup>.



Figura 2.1 – Equipamento utilizado para o cultivo de *Lactobacillus amylovorus* em frascos erlenmeyer com e sem agitação.

### 2.2.2 Definição da temperatura de cultivo

Para definição da melhor temperatura de cultivo, visando o crescimento celular, preparou-se, em duplicata, frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 200 mL de meio MRS, e inoculados a taxa de 10 %. Foram avaliadas as temperaturas de incubação de 25, 37 e 42 °C.

### 2.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O delineamento composto central rotacional consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis e na execução de experimentos com todas as combinações possíveis.

Neste estudo foram realizados dois planejamentos DCCR, cada um com três pontos centrais totalizando 11 experimentos. As distâncias dos pontos axiais foram  $\pm 1,41$ , calculados pela Eq. 2.1, onde  $\alpha$  é a distância dos pontos axiais e  $n$  é o número de variáveis independentes. Os dados foram tratados com o auxílio do software STATISTICA 7 Statsoft.

$$\alpha = (2n)^{1/4} \quad \text{Eq. 2.1}$$

O cultivo de *Lactobacillus amylovorus* visando à produção de ácido láctico foi realizado em meio similar ao meio MRS sendo substituídos peptona, extrato de carne, extrato de levedura por milhocina in natura e a glicose por melaço ou amido conforme a tabela 2.1, 2.2 e 2.3.

Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio e incubados a 37 °C sem agitação.

Tabela 2.1 – Concentrações (g.L<sup>-1</sup>) das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no delineamento composto central rotacional – DCCR.

<i>Fonte</i>	<i>-1,41</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>	<i>+1,41</i>
Melaço	10,0	14,4	25,0	36,5	40,0
Amido	10,0	14,4	25,0	36,5	40,0
Milhocina	10,0	14,4	25,0	36,5	40,0

Tabela 2.2 – Delineamento composto central rotacional – DCCR visando à otimização da produção de ácido láctico por melaço e milhocina.

<i>Experimento</i>	<i>Fonte de Carbono</i>	<i>Fonte de Nitrogênio</i>	<i>[C]</i>	<i>[N]</i>
M 1	Melaço	Milhocina	-1	-1
M 2	Melaço	Milhocina	1	-1
M 3	Melaço	Milhocina	-1	1
M 4	Melaço	Milhocina	1	1
M 5	Melaço	Milhocina	0	0
M 6	Melaço	Milhocina	0	0
M 7	Melaço	Milhocina	0	0
M 8	Melaço	Milhocina	-1,41	0
M 9	Melaço	Milhocina	1,41	0
M 10	Melaço	Milhocina	0	-1,41
M 11	Melaço	Milhocina	0	1,41

Tabela 2.3 – Delineamento composto central rotacional – DCCR visando a otimização de produção de ácido láctico por amido e milhocina.

<i>Experimento</i>	<i>Fonte de Carbono</i>	<i>Fonte de Nitrogênio</i>	<i>[C]</i>	<i>[N]</i>
A 1	Amido	Milhocina	-1	-1
A 2	Amido	Milhocina	1	-1
A 3	Amido	Milhocina	-1	1
A 4	Amido	Milhocina	1	1
A 5	Amido	Milhocina	0	0
A 6	Amido	Milhocina	0	0
A 7	Amido	Milhocina	0	0
A 8	Amido	Milhocina	-1,41	0
A 9	Amido	Milhocina	1,41	0
A 10	Amido	Milhocina	0	-1,41
A 11	Amido	Milhocina	0	1,41

O resultado, analisado em termos de produção de ácido láctico, foi posteriormente submetido a uma análise estatística pelo programa *Statística 7*.

#### 2.4 Verificação do modelo em escala ampliada

Posteriormente à verificação da melhor condição pelos delineamentos, foi realizada uma ampliação de escala, através de um biorreator (Figura 2.2). As células de *Lactobacillus amylovorus* foram cultivadas utilizando meio de cultivo alternativo, contendo, 1,0 mL.L<sup>-1</sup> de Tween 80, 2 g L<sup>-1</sup> de fosfato dipotássico, 2 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio, 2 g.L<sup>-1</sup> de citrato triamoniaco, 0,2 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio, 0,038 de sulfato de manganês e as melhores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio.

O biorreator utilizado (Biotron) com cuba 4 L (volume útil igual a 3 L) foi autoclavado por 20 min a 121 °C, contendo o meio fermentativo. Após o processo de esterilização, foram adicionadas as fontes de carbono e nitrogênio previamente

esterilizadas. O inóculo foi adicionado a taxa de 10 % (V/V) ao meio do biorreator. Os parâmetros para condução do processo foram: 37 °C sem agitação e sem aeração.



Figura 2.2 - Biorreator utilizado no processo de cultivo de *Lactobacillus amylovorus* visando à síntese de ácido láctico.

## 2.5 Metodologia analítica

### 2.5.1 Determinação da biomassa

A biomassa foi estimada por turbidimetria somente nos ensaios realizados em meio MRS completo. Leituras de absorbância das suspensões de células procedentes do cultivo foram realizadas em um espectrofotômetro (LKB Biochron – Novaspec II) na faixa de comprimento de 600 nm.

### 2.5.2 Determinação do ácido láctico e consumo de substrato

A determinação da produção de ácido láctico e o consumo do substrato foram obtidos por meio de análises de cromatografia em fase líquida (HPLC), aparelho da marca Merck-Hitachi, modelo P-7000 If, equipado com detector de índice de refração e colunas da marca transgenomic ICSEP Ice - Íon-300, forma iônica e trocadores de prótons. A coluna a ser utilizada possui fase móvel Isocrático  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com 8,5 mmol, tendo um fluxo de  $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de eluente, com a temperatura do forno de  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  e volume de injeção de  $10 \text{ }\mu\text{L}$ . Um modelo de cromatograma típico poderá ser analisado no ANEXO-A.

## 2.6 Metodologia de cálculo

### 2.6.1 Fator de Conversão ( $Y_{P/S}$ )

O fator de conversão de substrato em produto foi realizado através da seguinte Equação 2.2:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_0 - S_f} \quad \text{Eq. 2.2}$$

Onde:

$Y_{P/S}$  = fator de conversão de substrato em produto.

$P_f$  = concentração final de ácido láctico ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

$P_i$  = concentração inicial de ácido láctico ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

$S_f$  = concentração final de substrato ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

$S_0$  = concentração inicial de substrato ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

### 2.6.2 Produtividade no tempo final de produção

A produtividade de ácido láctico foi obtida através da seguinte equação:

$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{tp} \quad \text{Eq. 2.3}$$

Onde:

$Q_p$  = produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$P$  = concentração final de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$P_0$  = concentração inicial de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$t_p$  = tempo de processo (h)

## CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Ensaio para verificação da influência da agitação na produção de ácido lático

O cultivo das células de *Lactobacillus amylovorus* foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com a condição de agitação ( $120 \text{ min}^{-1}$ ) e condição estática a  $37^\circ\text{C}$  em *shaker*. O perfil de crescimento pode ser observado na Figura 3.1. Pode-se verificar que na condição estática o perfil do crescimento de *L. amylovorus*, foi ligeiramente superior que na condição agitada, condição esta que favoreceu a oxigenação, o que segundo Leite (2006) não é favorável ao crescimento do microrganismo, uma vez que estes são anaeróbios ou aerotolerantes.

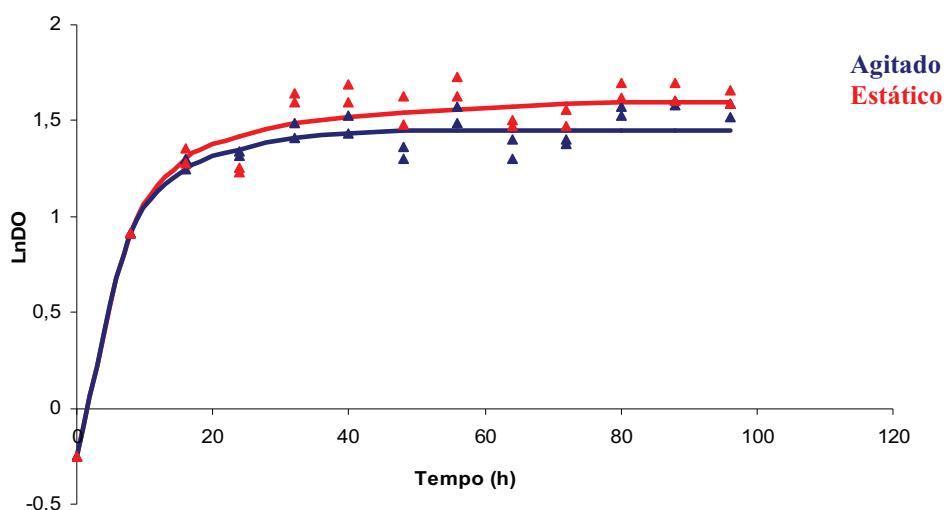


Figura 3.1 – Perfil de crescimento do *Lactobacillus amylovorus* em diferentes condições de agitação.

Da mesma forma, foi possível observar o perfil de consumo de substrato e a produção de ácido lático nas diferentes condições de agitação, conforme gráfico da Figura 3.2.



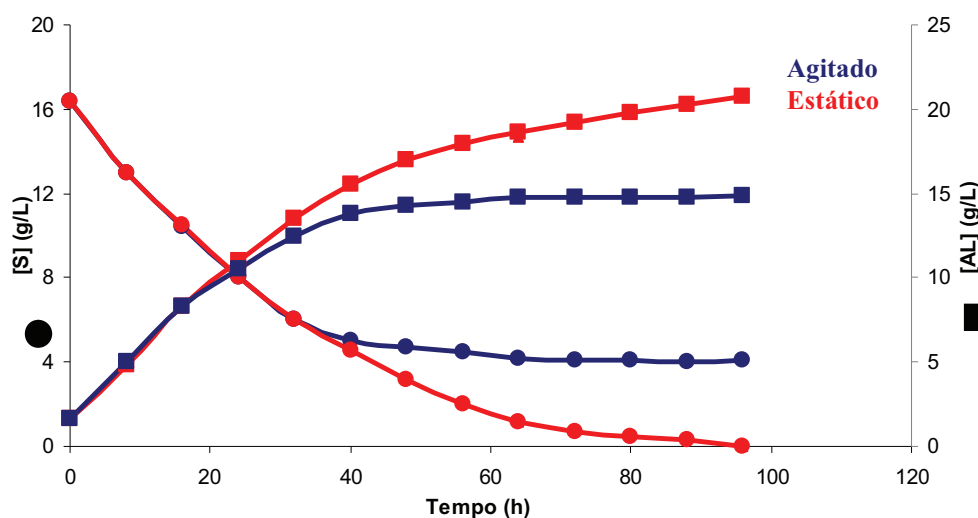


Figura 3.2 – Gráfico do perfil de produção de ácido láctico e consumo do substrato no cultivo de *Lactobacillus amylovorus* em diferentes condições de agitação.

Na condição sob agitação foi detectado  $4 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato no meio após 96 h de cultivo. O mesmo não foi observado quando as células foram cultivadas em condição estática onde todo o substrato foi consumido.

A produção de ácido láctico obtida no ensaio estático foi igual a  $20,7 \text{ g.L}^{-1}$  em 96 h, enquanto que para a condição agitada alcançou-se  $14,8 \text{ g.L}^{-1}$  no mesmo período de cultivo.

A produtividade em ácido láctico ( $Q_p$ ) e fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) podem ser observados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros de produtividade ( $Q_p$ ) e fator de conversão em ácido láctico ( $Y_{p/s}$ ) em diferentes condições de agitação.

Condição	$Q_p (\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	$Y_{p/s} (\text{g de AL/g de glicose})$
Com agitação	0,205	1,069
Estático	0,198	1,163

Os valores de produtividade em ácido láctico obtidos para as condições com agitação e estática foram  $0,205$  e  $0,198 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente. Apesar do  $Q_p$  na condição estática ter sido ligeiramente inferior a condição agitada, a produção de ácido láctico estacionou em 40 h de cultivo, o ensaio estático alcançou um fator de conversão cerca de 9 % superior. Sendo assim, mesmo que o processo agitado tenha proporcionado uma produtividade 3,41 % superior, ainda se torna mais vantajoso o

processo estático, por proporcionar um melhor fator de conversão de substrato em ácido láctico. Além disso, na condição agitada ainda restou cerca de  $4 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, o que dificulta os processos de extração e purificação do ácido láctico, enquanto no processo sem agitação o substrato foi totalmente consumido.

Shibata *et al.* (2007) obtiveram resultados para conversão de substrato em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ ) da ordem de  $0,83 \text{ g.g}^{-1}$ , tendo glicose como fonte de carbono. No entanto, o fator de conversão obtida pelo autor foi igual a  $1,16 \text{ g.g}^{-1}$ . Isto se explica pelo reduzido tempo (16 h) que o autor apresenta para atingir  $18 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido láctico.

### 3.2 Ensaios para verificação da influência da temperatura na produção de ácido láctico.

Para verificação da influência da temperatura no crescimento de *Lactobacillus amylovorus*, foram avaliadas as temperaturas de 25, 37 e 42 °C. Os perfis de crescimento dos microrganismos cultivados nestas condições estão apresentados na Figura 3.3, enquanto a produção de ácido láctico, bem como o consumo de substrato podem ser observados na Figura 3.4.

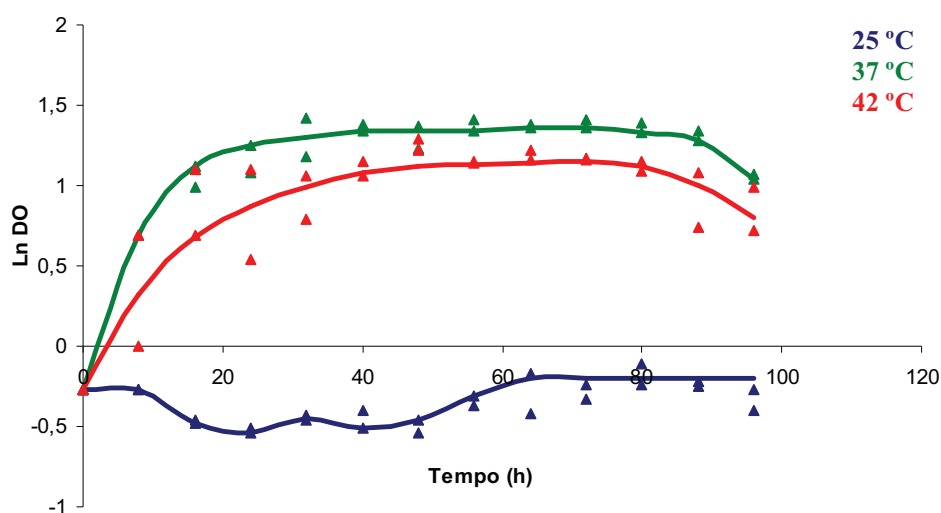


Figura 3.3 – Gráfico de perfil de crescimento celular do *Lactobacillus amylovorus*, em diferentes condições de temperatura.

A temperatura de 25 °C não favoreceu o crescimento celular e conseqüentemente não houve consumo de substrato e produção de ácido láctico.

O crescimento celular a 37 °C estabilizou em cerca de 32 h, enquanto em 42 °C o crescimento estabilizou em, aproximadamente 60 h. Da mesma forma, analisando as inclinações das retas no início do cultivo, pode-se constatar que a velocidade de crescimento, embora expressa em termos de absorbância, foi superior na temperatura de 37 °C.

Quanto ao consumo de substrato, na temperatura de 37 °C este foi quase totalmente consumido ao final do cultivo, restando cerca de 1 g.L<sup>-1</sup>, no entanto, em 42 °C o consumo estabilizou em cerca de 60 h, tempo este em que se observou o início da fase estacionária de crescimento, restando 6 g.L<sup>-1</sup> de substrato no meio ao final de 96 h de cultivo.

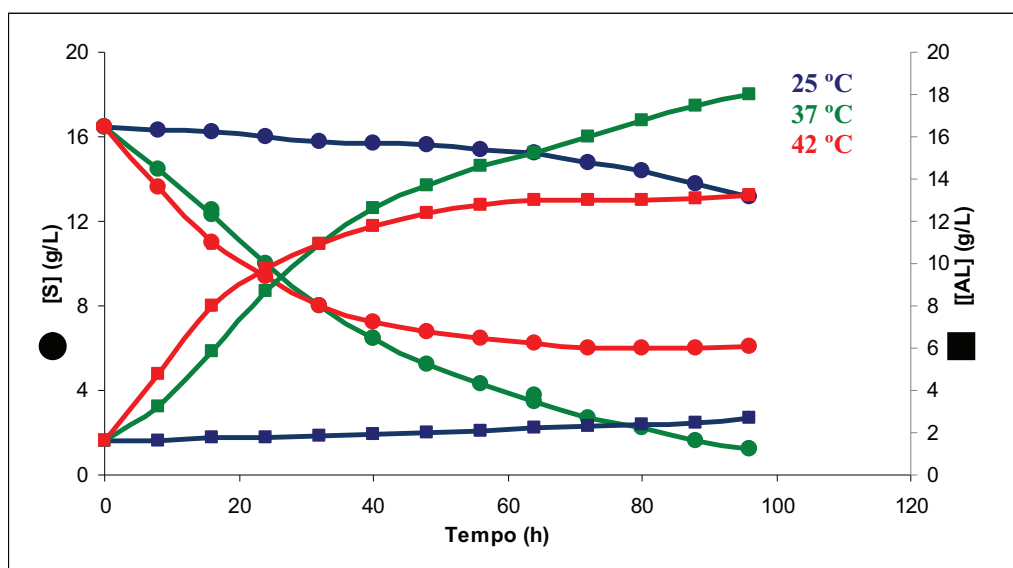


Figura 3.4 – Gráfico da produção de ácido láctico e consumo de substrato durante cultivo de *Lactobacillus amylovorus*, em diferentes temperaturas.

A produção de ácido láctico por sua vez teve um aumento contínuo na temperatura de 37 °C alcançando o valor de 18,1 g.L<sup>-1</sup> em aproximadamente 96 h. Na temperatura de 42 °C a produção de ácido láctico estabilizou-se em 12,5 g.L<sup>-1</sup> em 60 h de cultivo.

Kulozik e Wilde (1999) realizaram experimentos com *Lactobacillus helveticus* em cinco níveis de temperatura, 35, 38, 42, 45 e 49 °C a concentração de ácido láctico foi ligeiramente superior a 45 °C de que em 42 °C, utilizando soro de queijo como fonte de carbono.

Já Tango e Ghaly (1999a) realizaram experimentos a 23, 37 e 42 °C, utilizando soro de queijo e o *Lactobacillus helveticus*, obtendo uma maior concentração de ácido láctico a 42 °C.

A partir destes dados, foram calculados os parâmetros de produtividade ( $Q_p$ ) e fator de conversão de substrato ( $Y_{P/S}$ ) em ácido láctico, apresentados na tabela 3.2, com destaque para temperatura de 37 °C, a qual forneceu os maiores valores de produtividade ( $Q_p$ ) e fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ).

Tabela 3.2 – Parâmetros de produtividade ( $Q_p$ ) e fator de conversão em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ ) em diferentes temperaturas.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i><math>Q_p</math> (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</i>	<i><math>Y_{P/S}</math> (g de AL/g de glicose)</i>
25	0,01	0,34
37	0,34	1,10
42	0,18	0,90

Shibata *et al.* (2007) testaram as temperaturas de 30, 37 e 43 °C, para condução do cultivo de *Enterococcus faecium*, uma bactéria láctica amilolítica, e observaram que a temperatura de 30 °C forneceu os melhores resultados definido em termos de  $Y_{P/S}$  (0,78 g.g<sup>-1</sup>) e  $Q_p$  (0,35 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Após os ensaios da influência da agitação e da temperatura no bioprocesso, foi estabelecido que as condições selecionadas para o DCRR fossem de 37 °C, sem agitação e o tempo de processo será de 84 h por proporcionar melhor formação do produto e não sendo economicamente viável manter o processo até 96 h, pois o mesmo demonstra apenas um pequeno acréscimo na produção de AL.

### 3.3 Delineamento composto central rotacional – DCCR

#### 3.3.1 Avaliação do meio de cultura composto de melaço (ME) e milhocina (MI)

O objetivo do DCCR realizado foi de aperfeiçoar a produção de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* através da utilização de melaço, como fonte de carbono e milhocina, como fonte de nitrogênio. Foi analisada a produção em 84 h de fermentação, verificada a interação entre as variáveis sobre o processo e selecionadas as melhores condições do método proposto. As combinações específicas dos fatores testados em 11

experimentos, em frascos erlenmeyer de 250 mL, sobre a produção de ácido láctico estão apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – DCCR com valores da produção em ácido láctico em 84 h de fermentação utilizando melão como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

	<i>Ensaio</i>	<i>Melão (g.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Milhocina (g.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Ácido láctico (g.L<sup>-1</sup>)</i>
<b>Completo</b>	M1	14,4	14,4	2,8
	M2	35,6	14,4	4,2
	M3	14,4	35,6	3,2
	M4	35,6	35,6	4,5
<b>Centrais</b>	M5	25,0	25,0	3,8
	M6	25,0	25,0	3,7
	M7	25,0	25,0	3,7
<b>Axiais</b>	M8	10,0	25,0	3,1
	M9	40,0	25,0	4,6
	M10	25,0	10,0	3,1
	M11	25,0	40,0	3,7

De acordo com os resultados obtidos pode ser verificado que duas condições testadas para a produção de AL se destacaram: o experimento M4, no qual foi utilizada a combinação de 35,6 g.L<sup>-1</sup> de melão e 35,6 g.L<sup>-1</sup> de amido obtendo um valor de produção de AL de 4,5 g.L<sup>-1</sup> e o M9, o qual variou a concentração de melão para 40,0 g.L<sup>-1</sup> e milhocina para 25,0 g.L<sup>-1</sup> totalizando 4,6 g.L<sup>-1</sup> de ácido láctico em 84 h.

Foi utilizado no ensaio M2 35,6 g.L<sup>-1</sup> de melão e 14,4 g.L<sup>-1</sup> de milhocina que também forneceu um bom resultado, demonstrando valor acima de 4 g.L<sup>-1</sup> para a produção de ácido láctico. Este resultado pode ser favorecido, pois visualmente ocorre o menor acúmulo de resíduo no término da fermentação, o que leva ao menor custo de extração e purificação do AL.

O experimento que apresentou um menor valor de produção de ácido láctico foi o M1, onde as concentrações utilizadas de melão e milhocina foram de 14,4 g.L<sup>-1</sup> para ambas as fontes, sugerindo que houve restrições de nutrientes, visto que foi a condição com as menores concentrações de FC e FN.

Nos demais ensaios, as concentrações de ácido láctico no fim do processo fermentativo variaram entre 3,1 e 3,8 g.L<sup>-1</sup>.

Porém, para comprovar estes resultados e determinar qual a melhor condição, foi realizada uma análise estatística, a partir da qual se fez a análise de variância (ANOVA) para verificar quais seriam as variáveis significativas para o processo e obteve-se a Tabela de coeficientes de regressão e o gráfico de superfície de resposta. Os resultados foram interpretados observando-se como as variáveis do processo afetaram a produção de ácido láctico.

A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é através da análise de variância (ANOVA) segundo Garcia (2006). A Tabela 3.4 apresenta a ANOVA do delineamento proposto. Estão demonstrados a soma quadrática, o grau de liberdade, a média quadrática, o F calculado e a probabilidade dos valores serem significativos ( $p < 0,05$ ) para cada variável e suas interações. Nesse caso, os valores em azul e com asterisco refletem os fatores que exercem influência significativa sobre a produção de ácido láctico.

Tabela 3.4 – Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa sobre os parâmetros: concentração de melão e concentração de milhocina.

<i>Fatores</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>Fcalc</i>	<i>p-valor</i>
Melão (L)	2,808	1	2,808	265,955	0,000016*
Melão (Q)	0,025	1	0,025	2,414	0,180952
Milhocina (L)	0,291	1	0,291	27,630	0,003308*
Milhocina (Q)	0,134	1	0,134	12,721	0,016098*
ME x MI	0,001	1	0,001	0,144	0,719896
Erro	0,052	5	0,010		
Total SS	3,366	10			

\*=Significativo; L = linear; Q = quadrático.

Através da estimativa do p-valor fornecido pela ANOVA, verificou-se que das variáveis testadas, quando analisadas individualmente, apenas melão na forma quadrática não exerce influência significativa. Já a milhocina, tanto na forma linear como na forma quadrática obtiveram um p-valor inferior ao nível de significância estabelecido para este teste, constatando que a concentração de milhocina exerce influência significativa na produção de ácido láctico. Porém, o mesmo não foi

observado para a interação dos dois fatores, concluindo-se que o mesmo não exerceu influência significativa na produção de ácido láctico.

Os coeficientes lineares, quadráticos e suas interações fazem parte do modelo para compor a superfície de resposta. Os resultados dos coeficientes de regressão do modelo estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Coeficientes de regressão para resposta de produção de ácido láctico utilizando melão como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

<i>Fatores</i>	<i>Coefficientes de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(5)</i>	<i>p – valor</i>
Média	3,712	0,059	62,582	0,000000*
Melão (L)	0,593	0,036	16,308	0,000016*
Melão (Q)	0,067	0,043	1,553	0,180952
Milhocina (L)	0,191	0,036	5,256	0,003308*
Milhocina (Q)	-0,154	0,043	-3,566	0,016098*
ME <sub>1</sub> /MI <sub>2</sub>	-0,019	0,051	-0,379	0,719886

\*= Significativo; L = linear; Q = quadrático.

Por meio da análise de regressão foi verificado que a concentração de milhocina é uma variável que, tanto na forma linear, quanto na forma quadrática influencia de forma significativa a produção de ácido láctico. Já a concentração de melão na forma quadrática e a interação melão/milhocina não exercem influência significativa na produção de AL. O ajuste do modelo também foi expresso pelo coeficiente de correlação  $R^2$  que foi de 0,984, indicando que 98,4 % da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo (Equação 3.1).

$$[AL]=3,712+0,593*[ME]+0,067*[ME]^2+0,191*[MI]-0,154*[MI]^2*[ME]*[MI] \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde:

[AL] = concentração de ácido láctico

[ME] = concentração de melão

[MI] = concentração de milhocina

Considerando-se somente os fatores significativos pode-se reescrever a equação como apresentado na Equação 3.2.

$$[AL]=3,712+0,593*[ME]+0,191*[MI]-0,154*[MI]^2$$

Equação 3.2

Como os modelos são preditivos na região experimental, está apresentada na figura 3.5 a superfície resposta que exhibe a interação entre as concentrações de melaço e de milhocina na produção de ácido láctico por via fermentativa.

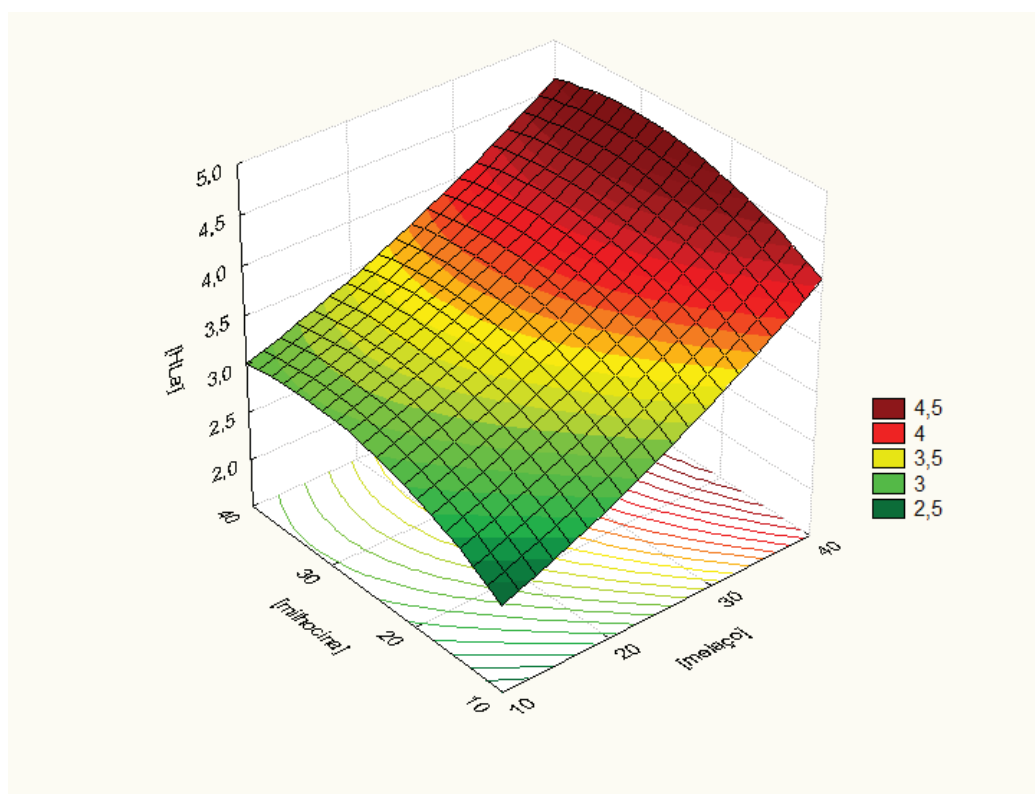


Figura 3.5 – Gráfico de superfície de resposta demonstrando a interação entre concentração de melaço (FC) e concentração de milhocina (FN) sobre a produção de ácido láctico.

Observa-se que a produção de ácido láctico foi maior utilizando concentrações de melaço (FC) na faixa de 35 a 40 g L<sup>-1</sup>, e de milhocina (FN) a partir de 18 g L<sup>-1</sup>, enquanto a utilização de baixas concentrações de melaço e milhocina simultaneamente conduziram a uma baixa produção de AL. Mesmo em condições favoráveis de temperatura, pH e anaerobiose os resultados mostraram que foram produzidas concentrações de ácido láctico inferiores em todos os experimentos quando comparado à outros autores. Isto pode ocorrer devido às complexas exigências nutricionais do gênero *Lactobacillus* (WOOD, 1995).



Em um estudo similar a este trabalho utilizando *Lactobacillus amylovorus* a 40 °C foram obtidas concentrações de ácido láctico iguais a 4,2 e 4,8 g.L<sup>-1</sup> utilizando mandioca e fécula de batata, respectivamente (XIODONG *et al.*, 1997), na mesma ordem de grandeza dos melhores resultados alcançados neste delineamento.

Oliveira (2009) obteve uma produção de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* em *shaker* a 37 °C em torno de 11 g.L<sup>-1</sup>, utilizando 20 g.L<sup>-1</sup> de melaço e 204 g.L<sup>-1</sup> de milhocina, quando as concentrações dos substratos foram reduzida pela metade obtiveram-se valores próximos de 3 g.L<sup>-1</sup>.

Ao visualizar a superfície de resposta verifica-se que não foi possível confirmar um valor ótimo para a produção de ácido láctico, pelo fato que com o aumento das concentrações de melaço pode-se levar a valores de concentrações superiores. Esses resultados sugerem que o deslocamento deveria ser realizado para uma nova região experimental, tendo os valores de concentração de melaço superiores ao nível máximo utilizado neste delineamento. Isso também pode ser evidenciado nas curvas de contorno apresentadas na Figura 3.6.

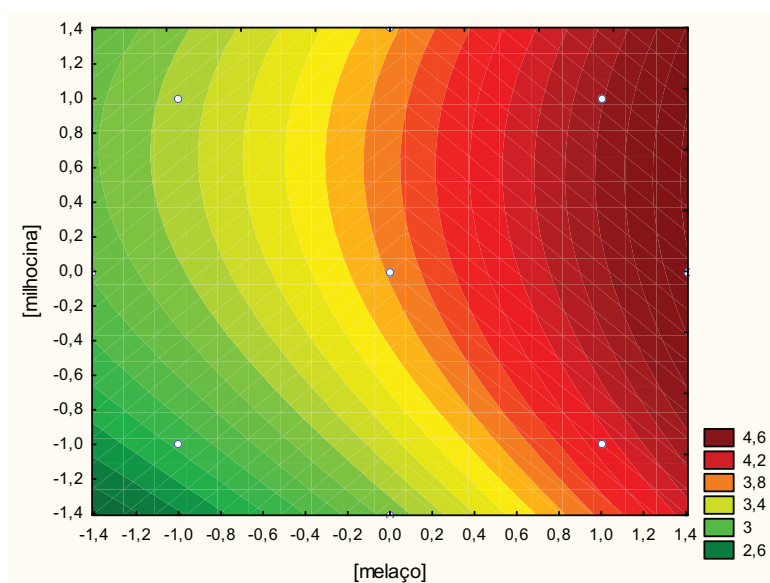


Figura 3.6 – Curvas de contorno da produção de ácido láctico, utilizando melaço como FC e milhocina com FN.

Por meio da equação 3.2 pode-se prever teoricamente concentrações de ácido láctico no tempo de 84 h e realizar novo ensaio experimental para validação do modelo. Para isso foram calculadas concentrações teóricas de ácido láctico variando as concentrações codificadas de melaço e milhocina partindo de -1,41 até +1,41 com

intervalos de 0,2 pontos (planilha de cálculo apresentada no ANEXO B. Após análise das concentrações de AL obtidas pelo modelo, verificou-se que as maiores concentrações foram obtidas na região vermelha apresentada na Figura 3.6. Assim, para a validação do modelo optou-se por utilizar as concentrações codificadas de melão e milhocina equivalentes a +1,41 e -0,8, respectivamente, os quais estão na região de maiores concentrações de AL predita pelo modelo, o que equivale a 40,0 g L<sup>-1</sup> de melão e 18,6 g L<sup>-1</sup> de milhocina. Como a milhocina dificulta a purificação do produto optou-se trabalhar com a menor concentração dentro da região de concentrações máximas. Na tabela 3.6, pode-se visualizar o valor predito pelo modelo para esta condição e o valor médio obtido experimentalmente.

Tabela 3.6 – Concentrações de AL preditas pelo modelo e experimental utilizando melão como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

	<i>Concentração de AL (g.L<sup>-1</sup>)</i>	
	<i>Predito</i>	<i>experimental</i>
Melão/Milhocina	4,30	4,16 ± 0,59

Como o valor obtido experimentalmente é estatisticamente igual ao valor predito pelo modelo podemos considerar esse modelo válido.

### 3.3.2 Avaliação do meio de cultura composto de amido (AM) e milhocina (MI)

A influência do amido, como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio, sobre a produção de ácido láctico em 84 h de cultivo foram conduzidas utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) com três pontos centrais totalizando 11 experimentos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Os valores codificados e reais de concentrações de amido e milhocina utilizados nos experimentos, bem como a concentração final de ácido láctico estão apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – DCCR com valores da produção em ácido láctico em 84 h de fermentação utilizando amido como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

	<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis Codificadas</i>		<i>Variáveis Reais</i>		<i>Respostas</i>
		<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>Amido</i> (g.L <sup>-1</sup> )	<i>Milhocina</i> (g.L <sup>-1</sup> )	<i>Ácido láctico</i> (g.L <sup>-1</sup> )
<b>completo</b>	A1	-1	-1	14,4	14,4	1,5
	A2	1	-1	35,6	14,4	1,6
	A3	-1	1	14,4	35,6	1,5
	A4	1	1	35,6	35,6	2,1
<b>centrais</b>	A5	0	0	25,0	25,0	1,7
	A6	0	0	25,0	25,0	1,9
	A7	0	0	25,0	25,0	1,5
<b>Axiais</b>	A8	-1,41	0	10,0	25,0	1,5
	A9	1,41	0	40,0	25,0	1,9
	A10	0	-1,41	25,0	10,0	1,4
	A11	0	1,41	25,0	40,0	2,2

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que dentre todas as condições testadas para a produção de ácido láctico destacaram-se o experimento A4, no qual foi utilizada a combinação de amido (FC) e milhocina (FN) ambas com concentração 35,6 g L<sup>-1</sup> e o experimento A11, no qual foram avaliadas as concentrações da FC para o nível de 25,0 g L<sup>-1</sup> e FN para 40,0 g L<sup>-1</sup>. Nestes experimentos as concentrações de ácido láctico foram 2,1 e 2,2 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Xiaodong *et al.* (1997) cultivando *Lactobacillus amylovorus* em diferentes fontes de carbono, como amido de milho, amido de mandioca, amido de arroz, amido de trigo e de batata obteve resultados de 10,1, 7,8 e 7,9 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico para amido de milho, de trigo e de arroz, respectivamente. Cabe salientar que neste estudo apenas a fonte de carbono foi substituída, sendo utilizado fontes de nitrogênio convencionais do meio de cultivo MRS.

Segundo Teófilo & Ferreira (2005), existem diferentes métodos para se avaliar efeitos e coeficientes significativos e, entre os mais usados destaca-se a análise de variância (ANOVA). A análise de variância para os ensaios utilizando amido como FC e milhocina como FN está apresentada na tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa sobre os parâmetros: concentração de amido e concentração de milhocina.

<i>Fatores</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>Fcalc</i>	<i>p-valor</i>
Amido (L)	0,270	1	0,270	8,839	0,031*
Amido (Q)	0,006	1	0,006	0,288	0,614
Milhocina (L)	0,303	1	0,303	12,953	0,015*
Milhocina (Q)	0,006	1	0,006	0,279	0,619
AM x MI	0,056	1	0,056	2,418	0,180
Erro	0,117	5	0,117		
Total SS	0,702	10	0,702		

\*= Significativo; L = linear; Q = quadrático.

O p-valor foi utilizado como um instrumento para verificar a significância de cada um dos coeficientes, que, por sua vez, são imprescindíveis para entender o nível de interações entre as variáveis do teste. A menor magnitude de p corresponde ao valor do coeficiente mais significativo valores de p menores que 0,05 indicam que são fatores significativos. Pode-se verificar pela ANOVA que as concentrações de amido e milhocina afetam significativamente de forma linear a produção de AL, diferentemente das concentrações de amido e milhocina no modelo quadrático que não afetaram significativamente a produção do ácido láctico, apresentando um p-valor igual a 0,614 e 0,619 respectivamente, assim como a interação das variáveis amido e milhocina que também não afetam significativamente a produção de AL por *L. amylovorus*, com valores de  $p > 0,05$  ao nível de confiança de 95 %. Como alguns fatores da ANOVA apresentaram-se como significativos, podem ser calculados os coeficientes de regressão a fim de construir o modelo. Os coeficientes de regressão do modelo, bem como o erro padrão estão apresentados na Tabela 3.9 obtidos para resposta de produção de ácido láctico utilizando amido e milhocina.

Tabela 3.9 – Coeficientes de regressão para resposta de produção de ácido láctico utilizando amido como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

<i>Fatores</i>	<i>Coefficientes de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(5)</i>	<i>P – valor</i>
Média	1,712	0,088	19,387	0,000007*
Amido (L)	0,161	0,108	2,973	0,031043*
Amido (Q)	-0,034	0,129	-0,536	0,614368
Milhocina (L)	0,195	0,108	3,599	0,015558*
Milhocina (Q)	0,034	0,129	0,528	0,619525
AM x MI	0,120	0,153	1,555	0,180619

\* = Significativo; L = linear; Q = quadrático.

O ajuste do modelo também foi expresso pelo coeficiente de determinação  $R^2$  que foi de 0,833, indicando que 83,3 % da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo, com os coeficientes de regressão construiu-se o modelo expresso na Eq. 3.3.

$$[AL] = 1,712 + 0,161*[AM] - 0,034*[AM]^2 + 0,195*[MI] + 0,034*[MI]^2 + 0,12*[AM]*[MI] \quad \text{Eq. 3.3}$$

Onde:

[AL] = concentração de ácido láctico no tempo de 84h.

[AM] = concentração de amido

[MI] = concentração de milhocina

Considerando-se somente os fatores significativos pode-se reescrever a equação como apresentado na Eq. 3.4.

$$[AL] = 1,712 + 0,161*[AM] + 0,195*[MI] \quad \text{Eq. 3.4}$$

As superfícies de resposta 3D são geralmente as representações gráficas da equação de regressão (Eq. 3.4) a partir do qual as variáveis independentes e das suas interações podem ser previstos. Cada contorno da curva representa um número infinito de combinações das duas variáveis estudadas. Na Figura 3.5 está apresentada como varia a produção de ácido láctico por via fermentativa, conforme a variação das concentrações de amido e de milhocina.

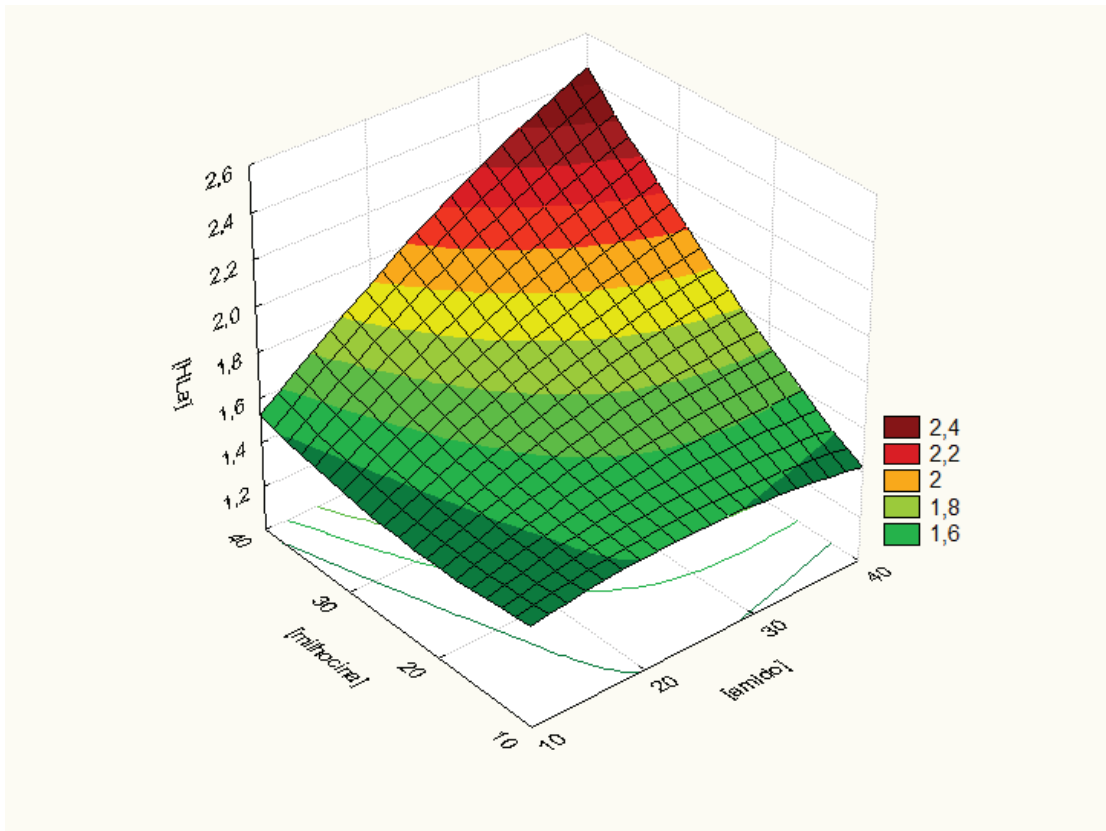


Figura 3.7 – Gráfico de superfície de resposta demonstrando a interação entre concentração de amido (FC) e concentração de milhocina (FN) sobre a produção de ácido láctico.

Analisando o gráfico de superfície de resposta, bem como as curvas de contorno (Figura 3.8) pode-se observar que a produção de ácido láctico foi máxima para concentrações de amido (FC) e milhocina (FN) situando na faixa de 35,0 a 40,0 g L<sup>-1</sup>, que correspondem às variáveis codificadas na faixa entre +1 e +1,41, enquanto baixas concentrações de amido e milhocina conduziram a baixa produção de ácido láctico.

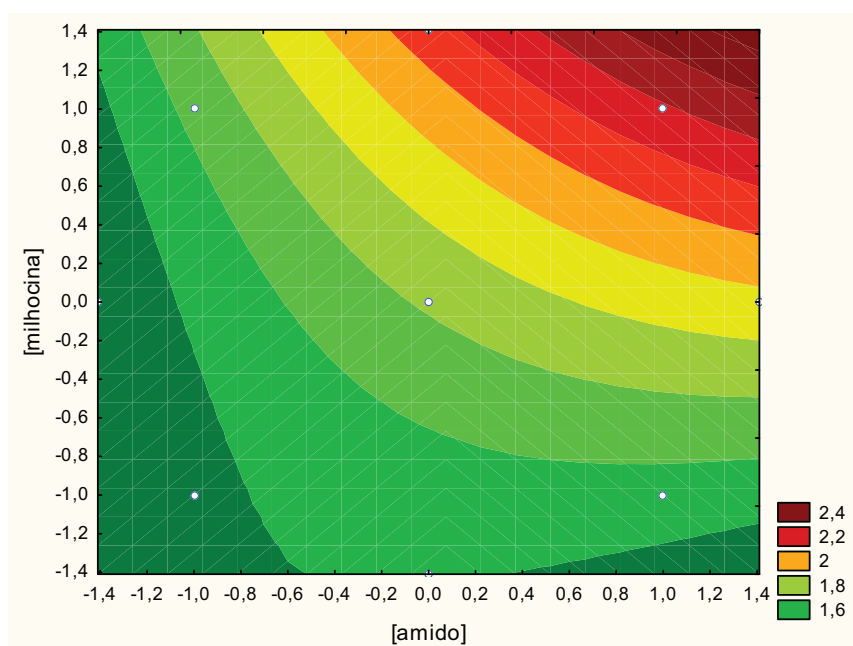


Figura 3.8 – Curvas de contorno da produção de ácido láctico, utilizando amido como FC e milhocina com FN.

Mesmo em condições favoráveis de temperatura, pH e anaerobiose os resultados mostraram que não foram produzidas altas concentrações de ácido láctico. Com um tempo de fermentação de 84 h os resultados indicam que o uso de milhocina como fonte de nitrogênio para substituir peptona, extrato de levedura e extrato de carne, bem como a utilização de amido como fonte de carbono para substituição de glicose proporcionaram uma produtividade de ácido láctico inferior às obtidas nos experimentos utilizando melão como FC, apresentados neste trabalho. A concentração de amido que obteve um melhor resultado na produção de ácido láctico foi a de  $40 \text{ g L}^{-1}$  em combinação com a  $40 \text{ g L}^{-1}$  de milhocina. Porém, ao visualizar a superfície de resposta verifica-se que não foi possível confirmar um valor ótimo para a produção de ácido láctico, pelo fato de que a tendência das curvas indica que o aumento das concentrações de amido e milhocina parecem fornecer valores de concentrações de ácido láctico superiores.

Pela equação 3.4 pode-se prever teoricamente valores de produção de ácido láctico no tempo de 84 h, assim podendo validar o modelo experimentalmente. Foram calculados valores de concentração para amido e milhocina em intervalos de 0,2 pontos, partindo de -1,4 até +1,4, apresentado no ANEXO C. Após análise dos valores simulados e da tendência, foi estabelecido que para o teste de validação seria utilizado

40 g.L<sup>-1</sup> de amido e 40 g.L<sup>-1</sup> de milhocina, equivalendo às maiores concentrações, que foram codificadas como +1,41. Na tabela 3.5, pode-se visualizar os valores preditos pelo modelo e o obtido experimentalmente com o respectivo desvio padrão.

Tabela 3.10 – Concentrações de AL predita pelo modelo e experimental utilizando amido como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

	<i>Concentração de AL (g.L<sup>-1</sup>)</i>	
	<i>Predito</i>	<i>experimental</i>
Amido/Milhocina	2,21	2,43 ± 0,281

Na figura 3.9 está apresentada uma comparação entre a produção de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* cultivado em meio MRS (padrão) e as melhores condições definidas neste trabalho para a combinação de melação com milhocina e amido com milhocina.

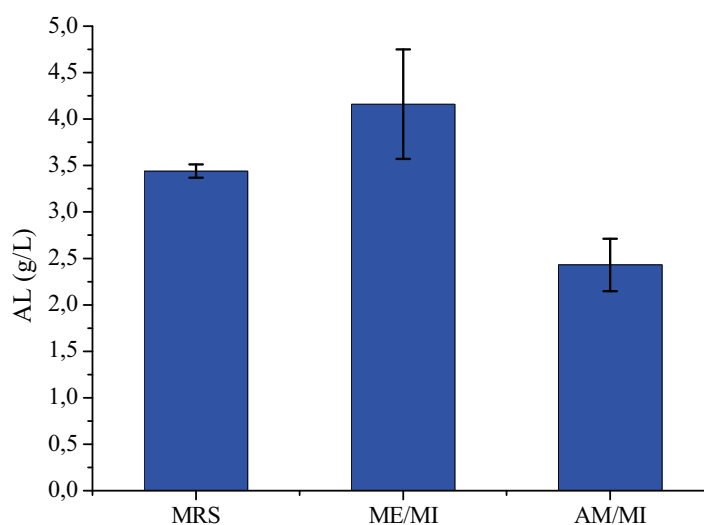


Figura 3.9 – Produção de AL por *Lactobacillus amylovorus* cultivado em diferentes meios.

Como pode ser observado, a substituição da FC por melação e da FN por milhocina proporcionou um aumento significativo na produção de ácido láctico. Esses valores foram obtidos em experimentos em *shaker*, após essa etapa foi realizada uma ampliação de escala, reproduzindo as mesmas condições daquelas estabelecidas como



as melhores na etapa preliminar. Os resultados estão apresentados no item a seguir. Verificou-se que nos ensaios preliminares a produção de ácido láctico foi bem superior (figura 3.4) quando comparado com os ensaios da figura 3.9, pois a cepa já tinha passado por vários repiques e por ser sensível ela pode ter sofrido stress.

### 3.4 Verificação do modelo em escala ampliada

A síntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* foi realizada em um biorreator Biotron com cuba de 4 L, contendo 3 L de volume útil, a 37 °C, sem aeração. As células foram cultivadas em meio similar ao MRS, tendo como fonte de carbono, 40 g.L<sup>-1</sup> de melaço e como fonte de nitrogênio, 18,6 g.L<sup>-1</sup> de milhocina. Durante o cultivo de 80 h foram feitas amostragens em intervalos de 8 h, com as quais se pode observar a cinética de consumo de substrato, evolução espontânea de pH e a produção de ácido láctico demonstradas na Figura 3.10.

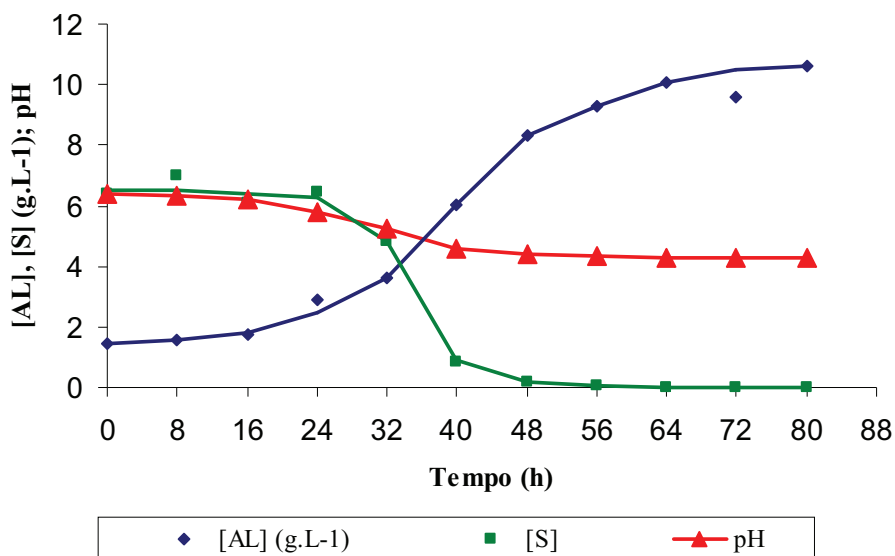


Figura 3.10 – Evolução do cultivo em batelada a 37 °C expresso em consumo de substrato, evolução espontânea de pH e produção de ácido láctico.

Analisando primeiramente o consumo do substrato, pode-se observar que até 16 h de cultivo não houve um decréscimo no consumo do mesmo, a partir de 24 h de processo pode-se verificar um decréscimo contínuo até 56 h de cultivo, quando o substrato se tornou escasso, sendo totalmente consumido.

Ao longo do processo fermentativo a evolução espontânea do pH apresentou um decréscimo relevante a partir de 16 h de cultivo, passando de 6,42 no tempo inicial para 4,28 no término do processo fermentativo. Apesar de ser conhecido que baixos valores de pH levam a inibição da produção de ácido láctico, estes resultados demonstram que não houve inibição durante este processo, pois mesmo com pH abaixo 6,4, a produção dobrou após o pH cair para 4,28.

A comparação da formação de ácido láctico após 48 h de cultivo demonstrado por Ohkouch *et al.* (2006) em meio MRS com pH controlado em 4,5, 5,0 e 5,5 com hidróxido de sódio 10 N, demonstrou que 1,5 g.L<sup>-1</sup> de ácido láctico foi produzido em pH 6,5, com pH inicial de 4,5, a produção de AL foi superior passando para 8 g.L<sup>-1</sup>, porém as melhores concentrações foram obtidas com pH entre 5,0 e 5,5 obtendo concentrações em torno de 9 g.L<sup>-1</sup>. No entanto, com pH 4,0 os pesquisadores obtiveram uma concentração em torno de 4 g.L<sup>-1</sup>, assim afirmam que deve ser evitado o uso de baixos valores de pH, uma vez que, pode causar inibição na formação de produto.

A evolução da produção de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* durante todo o processo fermentativo foi gradativa, tornando-se mais perceptível a partir de 16 h de cultivo. Sabe-se através dos experimentos preliminares que a produção de ácido láctico é associada ao crescimento das células do microrganismo, o que também é demonstrado por Pritchard & Coolbear (1993), assim verifica-se que durante as 16 h iniciais do processo é destinada apenas a adaptação do MO a novas FC e FN, não ocorrendo variações na produção de ácido láctico, no consumo de substrato e na evolução espontânea do pH.

Na tabela 3.11 podem ser observados os dados de Q<sub>p</sub>, Q<sub>máx</sub> e Y<sub>p/s</sub> e a concentração de AL no fim do processo fermentativo.

Tabela 3.11 – Concentração de ácido láctico ([AL]) no final da produção, produtividade em ácido láctico (Q<sub>p</sub>), produtividade máxima (Q<sub>máx</sub>) e fator de conversão de substrato em produto em 80 h (Y<sub>p/s</sub>)

$[AL]_{80h} (g.L^{-1})$	$Q_p (g.L^{-1}.h^{-1})$	$Q_{máx} (g.L^{-1}.h^{-1})$	$Y_{p/s} (g.g^{-1})$
10,62	0,11	0,14	1,43

A análise do consumo de substrato no final do processo fermentativo contendo 40 g.L<sup>-1</sup> de melão e 18,6 g.L<sup>-1</sup> de milho, demonstra um fator de conversão de substrato em produto (Y<sub>p/s</sub>) igual a 1,43, a produtividade para este ensaio alcançou um valor de 0,11 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e a produtividade máxima foi de 0,14 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Leite (2006) em seu estudo, obteve um  $Y_{p/S}$  igual a 0,78, utilizando  $82 \text{ g.L}^{-1}$  de soro de leite com *Lactobacillus helveticus* incubados a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 6,8.

## CONCLUSÃO

A influência da agitação de cultivo em meio MRS avaliada em  $120 \text{ min}^{-1}$  e em condição estática demonstrou que a condição estática favoreceu a produção de ácido láctico. A influência da temperatura de cultivo também foi investigada a 25, 37 e 42 °C após 96 h de fermentação. Enquanto que a 25 °C não se observou produção de ácido láctico, em 42 °C a produção de ácido láctico se estabilizou em apenas 60 h de cultivo, sendo que a condição mais favorável para a produção de AL foi a 37 °C, consumindo totalmente a fonte de carbono.

Os resultados obtidos a partir dos delineamentos investigados permitiram a escolha das melhores condições para realização do processo fermentativo. Os coeficientes de regressão mostraram que a fonte de nitrogênio exerce uma forte influência, interferindo diretamente na produção de AL. Já a fonte de carbono, embora importante, apresenta um nível menor de significância, sendo o meloço, a fonte mais adequada para a utilização como substituinte da glicose no processo fermentativo.

Após análise das concentrações de AL obtidas do modelo, por meio de cálculos que variaram as concentrações codificadas das fontes de carbono (meloço e amido) e nitrogênio (milhocina) de -1,41 a + 1,41 optou-se por utilizar as concentrações codificadas de meloço e milhocina equivalentes à +1,41 e -0,8, que resulta na utilização de  $40,0 \text{ g.L}^{-1}$  de meloço e  $18,6 \text{ g.L}^{-1}$  de milhocina para o primeiro delineamento. Já para o segundo DCCR utilizando amido e milhocina optou-se por utilizar concentrações de  $40,0 \text{ g.L}^{-1}$ , equivalente a +1,41, para ambos. Como os valores obtidos experimentalmente foram estatisticamente iguais aos valores preditos pelos modelos pode-se considerar os modelos válidos para ambos os delineamentos.

O uso do DCCR não apenas auxiliou na seleção das variáveis que mais influenciavam na produção de ácido láctico, como possibilitou o conhecimento das concentrações em que as fontes de carbono e nitrogênio avaliadas deveriam ser adicionadas ao meio para aumentar a produção de ácido láctico. Essa ferramenta permitiu a escolha da condição para realização do processo em escala ampliada, com a substituição de fonte de carbono e nitrogênio por  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de meloço e  $18,6 \text{ g.L}^{-1}$  de milhocina, respectivamente.

A ampliação de escala apresentou um decréscimo no consumo de substrato a partir de 24 h de processo até 56 h de cultivo, sendo totalmente consumido, enquanto o

pH diminuiu a partir de 16 h de cultivo, passando de 6,42 no tempo inicial para 4,28 no término do processo fermentativo. Observou-se um crescimento exponencial de AL entre 16 e 48 h de cultivo, estabilizando após este período.

Com o intuito de propor um processo fermentativo econômico e eficiente para a produção de AL pela via biológica visando à troca de nutrientes de alto custo como a glicose, peptona e o extrato de levedura por fontes renováveis de baixo custo, foi possível substituí-los por resíduos agroindustriais. É importante ressaltar que estas fontes são de baixo custo, porém possui elevado teor de carbono bem como nitrogênio. Sendo assim, também contribuem com o meio ambiente, como uma alternativa para destinação desses resíduos.

## REFERÊNCIAS

- AGATI, V., GUYOT, J.P., MORLON-GUYOT, J., TALAMOND, P., HOUNHOUIGAN, D.J. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. **Journal of Applied Microbiology**.85:512–520,1998.
- ALTAF M, NAVEENA BJ, REDDY G. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresource Technology**. 98:498–503, 2007.
- ANURADHA R., SURESH A.K., VENKATESH K.V. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. **Process Biochemistry**. 35: 367–75, 1999.
- AXELSSON L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von right A, Ouwehand A, editors. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 1-66, 2004.
- SHIBATA K, FLORES DM, KOBAYASHI G, SONOMOTO K. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. **Enzyme Microb Technol**. 41: 149–155. 2007
- TANGO, M.S.A; GHALY, A. E. Effect of temperature on lactic production from cheese whey using lactobacillus under batch condition. **Biomass and Bioenergy** 16: 61-78, 1999a.
- KULOZIK, V; WILDE, J. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by lactobacillus helveticus. **Enzyme and microbial technology**. 24: 297 -302, 1999.
- CHATTERJEE M., CHAKRABARTY S.L., CHATTOPADHYAY B.D., MANDAL R.K. Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. **Biotechnology Letters**. 19:873–874, 1997.
- DATTA R. et al. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**. 16:221-231, 1995.
- DAVIDSON B.E., LLANOS R.M., CANCELLA M.R., REDMAN N.C., HILLIER A.J. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. 5:763–84, 1995.
- ERCOLINI D., MOSCHETTI G., BLAIOTTA G., COPPOLA S. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. **Current Microbiology**. 42:199–202, 2001.
- FITZPATRICK, J.J.; MURPHY, C.; MOTA, F.M., PAULI, T. Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics, **International Dairy Journal**. 13: 575–580, 2003.

FORMANEK, J.A. **Genetic manipulation and characterization of solvent-producing clostridia**. Ph.D. Thesis. University of Illinois, IL, USA, 1998.

GAO, M.-T., KOIDE, M., GOTOU, R., TAKANASHI, H., HIRATA, M., HANO, T. Development of continuous electro-dialysis fermentation system for *Lactobacillus rhamnosus* based production of lactic acid. **Process Biochemistry**. 40: 1033–1036. 2007.

GAO, M.T.; HIRATA, M.; TOORISAKA, E.; HANO, T. Acid hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. **Bioresource technology**. 97: 2414-2420, 2006.

GIRAUD E., CHAMPAILLER A., RAIMBAULT M. Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**. 60: 4319–4323, 1994.

GOKSUNGUR Y., GUVENC U. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 74:131–136, 1999.

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

HOCH, J.A. Panspermia, spores and the *Bacillus subtilis* genome. **Nature**. 390: 237-238, 1997.

HOFVENDAHL K., HAHN-HAGERDAL B., Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**. 26: 87–107, 2000.

HOLZAPFEL W.H., HABERER P., GEISEN R., BJÖRKROTH J., SCHILLINGER U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**.73:365S–373S, 2001.

HONDA, H. ET AL. Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentation. **J. Fermentation and Biochem**. p. 589-593. 1995.

HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria:overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. **Current Opinion in Biotechnology**. 10: 492–497, 1999.

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

JAY J.M. Fermentation and fermented dairy products. **Modern food microbiology**. 6: 113–130, 2000.

JOHANSSON M.L., SANNI A., LONNER C., MOLIN G. Phenotypically-based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from Nigerian Ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. **International Journal of Food Microbiology**. 25:159–168, 1995

JOHN R.P., NAMPOOTHIRI K.M., PANDEY A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**. 41:759–63, 2006a.

JOHN R.P., NAMPOOTHIRI K.M., PANDEY A. Simultaneous saccharification and L-(+)-lactic acid fermentation of protease treated wheat bran using mixed culture of lactobacilli. **Biotechnology Letters**. 28:1823–1836, 2006b.

JOHN R.P., NAMPOOTHIRI K.M., PANDEY A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 74:524–34, 2007.

JU L.K., VERMA A, Characteristics of lactic acid transport in supported liquid membranes. **Separation Science and Technology**. 29: 2299–2313, 1994.

KAREL M., JAROSLAV V., VERA H., MOJMIR R. Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate. **Journal of Biotechnology**. 56:25–31, 1997.

KOTZAMANIDIS C, ROUKAS T, SKARACIS G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18:441–448, 2002.

KRISHNAN S., BHATTACHARYA S., KARANTH N.G. Media optimization for production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 using response surface methodology. **Food Biotechnology**. 12: 105–21, 1998.

LACTOBACILLUS AMYLOVORUS DEFINITION:

<<http://medconditions.net/lactobacillus-amylovorus.html>>. Acessado em 22 de junho de 2011.

LEE E.G. et al. Lactic acid recovery using two-stage electro dialysis and its modeling. **Journal of Membrane Science**. n. 145, p. 53-66, 1998.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 3ed. Sarvier, 2002.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. Tese de doutorado. 179p. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2006.

GARCIA, M.C.F. Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzindo por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero. Dissertação de mestrado. 158p. Universidade federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2006.



OLIVEIRA, P.F.B. Biossíntese do ácido láctico a partir de resíduos agroindustriais: Estudo das fontes carbono e nitrogênio. Trabalho de conclusão de estágio. 53p. Universidade da Região de Joinville, Joinville, SC, 2009.

LIPINSK, E. S.; SINCLAIR, R. S. Is a lactic acid a commodity chemical. **Chem Eng Progress**. 82:26, 1986.

LITCHFIELD J.H. Microbial production of lactic acid. **Adv Appl Microbiol**. 42:45-95, 1996.

MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; S'ANCHEZ, J.J. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media, **Bioresource Technology**. 96:383–387, 2005.

MERCIER P., YERUSHALAMI L., ROULEAU D., DOCHANIA D. Kinetics of lactic acid fermentations on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**.55:111–121,1992.

MORLON-GUYOT J., GUYOT J.P., POT B., JACOBÉ D.E., HAUT I., RAIMBAULT M. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 48:1101, 1998.

NAKAMURA L.K. *Lactobacillus amylovorus* a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 31:56–63,1981.

NARAYANAN N, ROYCHOUDHURY PK, SRIVASTAVA A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**.7:167–79, 2004.

NARITA J., NAKAHARA S., FUKUDA H., KONDO A. Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 97:423–425, 2004.

NAVEENA B.J., VISHNU C., ALTAF M.D., REDDY G. Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6- Optimization of fermentation conditions. **Journal of Scientific & Industrial Research**. 62:453–6, 2003.

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* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**. 96:485–90, 2005a.

NAVEENA B.J., ALTAF M.D., BHADRAYYA K., MADHAVENDRA S.S., REDDY G. 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**: 40:681–90, 2005b.

NAVEENA B.J., ALTAF M., BHADRIAH K., REDDY G. Screening and interaction effects of physical parameters total N content and buffer on L(+) Lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using Taguchi designs. **Indian Journal of Biotechnology**. 4(3): 301–28, 2005c.

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 of Bioscience and Bioengineering**. 93: 281–287, 2002.

NWANKWO D., ANADU E., USORO R. **Cassava fermenting organisms**. 5:169–79, 1989.

OHKOUCHI Y., INOUE Y. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. **Bioresource Technology**. 97:1554–62, 2006.

OLYMPIA M., FUKUDA H., ONO H., KANEKO Y., TAKANO M.: Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, “Burong Isda”, and its amyolytic enzyme. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 80: 124-130, 1995.

PAN X.J., ARATO C., GILKES N., GREGG D., MABEE W., PYE K., XIAO Z.Z., ZHANG X., SADDLER J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products, **Biotechnology and Bioengineering**. 90 473–481, 2005.

PANDEY A., SOCCOL C.R., RODRIGUEZ-LEON J.A., NIGAM P. Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech Publishers; 2001.

PAREKH, M., FORMANEK, J., BLASCHECK, H.P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 51, 152–157, 1999.

PAULI T., FITZPATRICK J.J. Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. **Process Biochemistry**. 38:1–6, 2002.

PODLECH P.A.S., LUNA M.F., JERKE P.R., DE SOUZA NETO C.A.C., DOS PASSOS R.F., SOUZA O., BORZANI W. Semicontinuous lactic fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaricus*. I. Experimental results. **Biotechnology Letters**. 12:531–4, 1990.

Rivas, B.; Moldes, A.B.; Domínguez, J.M.; Parajó J.C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*, **International Journal of Food Microbiology**. 97: 93–98, 2004.

RODRIGUEZ SANOJA, R., MORLON-GUYOT, J., JORE, J., PINTADO, J., JUGE, J., GUYOT, J.P., Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* amylase and the role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. **Applied Environmental Microbiology** 66, 3350–3356, 2000.

ROJAN P.J., NAMPOOTHIRI K.M., NAIR A.S., PANDEY A. L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. **Biotechnol Lett.** 27:1685–8, 2005.

SAHA B.C, NAKAMURA L.K. Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. **Biotechnol Bioeng:** 82:865–71, 2003.

SAN-MARTÍN M., PAZOS C., COCA J. Reactive extraction of lactic acid with Alamine 336 in the presence of salts and lactose. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology.** n. 54,p. 1-6, 1992.

SANNI A., MORLON-GUYOT J., GUYOT J.P. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. **International Journal of Food Microbiology.** 72:53–62, 2002.

SHARMA N., WATI L., SINGH D. Production of lactic acid during bioremediation of anaerobically digested molasses spent wash. **Indian Journal of Microbiology.** 43:119–21, 2003.

STILES M.E., HOLZAPFEL W.H. Review article: lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology.**36:1-29, 1997.

SURMELY, R. ; CEREDA, M.P. ; VILPOUX, O. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. **Hidrólise do amido.** São Paulo, Fundação Cargill. 3:377-448, 2003.

*Tate & Lyle* ; [www.tateandlyle.com/TateAndLyle/products.../portugal/](http://www.tateandlyle.com/TateAndLyle/products.../portugal/) acessado em 10 de junho de 2009.

TRINDADE, M.C. **Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas surtantes.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

VENKATESH, K.V. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. **Bioresource Technology.** 62:91–8, 1997.

VICKROY T.B. Lactic acid. In: Moo-Young, editor. **Comprehensive Biotechnology.** Pub: DicToronto: Pergamon Press. 761–76, 1985.

VISHNU C., SEENAY.Y.A. G, REDDY G. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. **Engenharia de**

**Bioprocessos & Biotecnologia.** 23:155–158, 2000.

VISHNU C., SEENAYYA G., REDDY G. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. **W J Microbiol Biotechnol.** 18:429–33, 2002.

WEE Y.J., KIM J.N., RYU H.W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technol Biotechnol.** 44:163–72, 2006.

WOICIECHOWSKI A.L., NITSCHKE S., PANDEY A., SOCOOL C.R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Braz Brazilian Archives of Biology and Technology.**45:393–400, 2002.

WOOD, B.J., HOLZAPFEL, W.H. The genera of lactic acid bacteria. **Glasgow: Blackie academic & Professional.** 6-15, 1995.

XAVIER S., LONSANE B.K. Sugarcane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 41:291–5, 1994.

XIAODONGW, XUAN G., RAKSHIT S.K. Direct fermentation of lactic acid from cassava or other starch substrates. **Biotechnology Letters.** 9:841–3, 1997.

YUMOTO I., IKEDA K. Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. **Biotechnology Letters.**17:543–6, 1995.

ZHANG D.X., CHERYAN M. Direct fermentation of starch to lactic acid by *Lactobacillus amylovorus*. **Biotechnology Letters.**10:733–8, 1991.

ZHANG Z.Y, JIN B., KELLY J.M Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 23: 229–236, 2007.

REDDY G., ALTAF M.D., NAVEENA B.J., VENKATESHWAR M., VIJAY KUMAR E. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation—a review. **Biotechnol Adv** 2008;26:22–34

ANEXO A – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ANÁLISES EM  
SOBREPOSIÇÕES DO EXPERIMENTO REALIZADO EM HPLC.

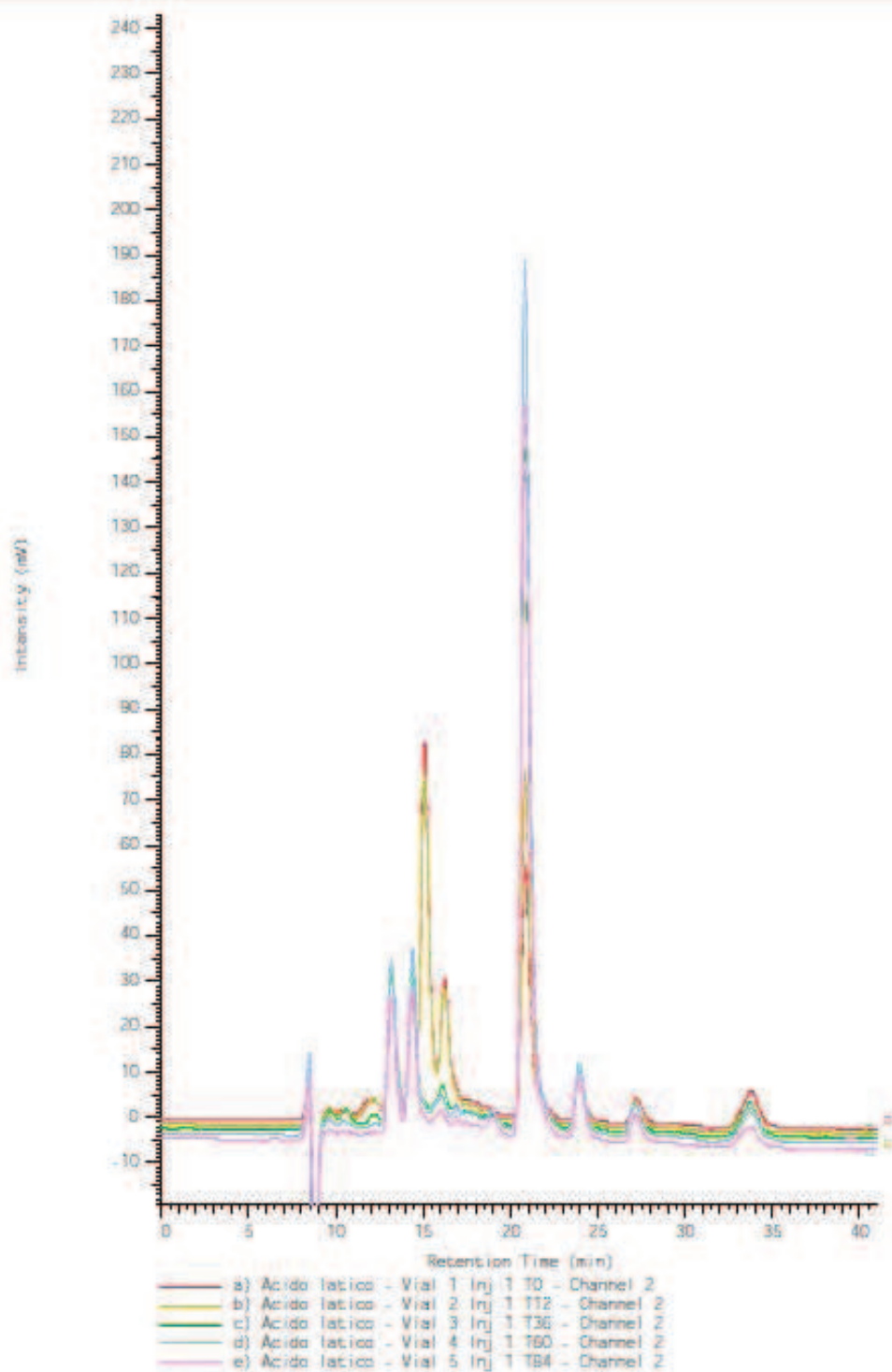


Figura A.1 – Gráfico de sobreposição das análises realizadas em HPLC.

**ANEXO B – VALORES CALCULADOS PARA A VALIDAÇÃO DO DELINEAMENTO PARA MELAÇO E MILHOCINA.**

Tabela B.1 – Valores calculados através do modelo prescrito para melaço e milhocina.

	-1,4	-1,2	-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4
<i>Melaço</i>															
<i>Milhocina</i>															
-1,41	2,30	2,42	2,54	2,66	2,78	2,90	3,02	3,14	3,25	3,37	3,49	3,61	3,73	3,85	3,97
-1,2	2,42	2,55	2,67	2,79	2,90	3,02	3,14	3,26	3,50	3,50	3,62	3,74	3,85	3,97	4,10
-1	2,53	2,65	2,77	2,89	3,01	3,13	3,25	3,37	3,60	3,60	3,72	3,84	3,96	4,08	4,20
-0,8	2,62	2,75	2,87	2,99	3,10	3,22	3,34	3,46	3,70	3,70	3,82	3,94	4,05	4,17	4,30
-0,6	2,71	2,83	2,95	3,07	3,19	3,31	3,42	3,54	3,78	3,78	3,90	4,02	4,14	4,25	4,38
-0,4	2,77	2,90	3,02	3,14	3,26	3,37	3,49	3,61	3,85	3,85	3,97	4,09	4,21	4,32	4,45
-0,2	2,83	2,96	3,08	3,19	3,31	3,43	3,55	3,67	3,91	3,91	4,02	4,14	4,26	4,38	4,51
0	2,88	3,00	3,12	3,24	3,36	3,48	3,59	3,71	3,95	3,95	4,07	4,19	4,31	4,42	4,55
0,2	2,91	3,03	3,15	3,27	3,39	3,51	3,63	3,74	3,98	3,98	4,10	4,22	4,34	4,46	4,58
0,4	2,93	3,05	3,17	3,29	3,41	3,53	3,65	3,76	4,00	4,00	4,12	4,24	4,36	4,48	4,60
0,6	2,94	3,06	3,18	3,30	3,42	3,53	3,65	3,77	4,01	4,01	4,13	4,25	4,37	4,48	4,61
0,8	2,93	3,05	3,17	3,29	3,41	3,53	3,65	3,77	4,00	4,00	4,12	4,24	4,36	4,48	4,60
1	2,91	3,04	3,16	3,27	3,39	3,51	3,63	3,75	3,99	3,99	4,11	4,22	4,34	4,46	4,59
1,2	2,88	3,01	3,13	3,24	3,36	3,48	3,60	3,72	3,96	3,96	4,08	4,19	4,31	4,43	4,56
1,4	2,84	2,97	3,08	3,20	3,32	3,44	3,56	3,68	3,91	3,91	4,03	4,15	4,27	4,39	4,51

**ANEXO C – VALORES CALCULADOS PARA A VALIDAÇÃO DO DELINEAMENTO PARA AMIDO E MILHOCINA.**

Tabela C.1 – Valores calculados através do modelo prescrito para amido e milhocina.

	-1,4	-1,2	-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4
<i>Amido</i>															
<i>Milhocina</i>															
-1,41	1,21	1,24	1,28	1,31	1,34	1,37	1,41	1,44	1,47	1,50	1,53	1,57	1,60	1,63	1,67
-1,2	1,25	1,29	1,32	1,35	1,38	1,41	1,45	1,48	1,51	1,54	1,57	1,61	1,64	1,67	1,71
-1	1,29	1,32	1,36	1,39	1,42	1,45	1,49	1,52	1,55	1,58	1,62	1,65	1,68	1,71	1,75
-0,8	1,33	1,36	1,40	1,43	1,46	1,49	1,52	1,56	1,59	1,62	1,66	1,69	1,72	1,75	1,78
-0,6	1,37	1,40	1,43	1,47	1,50	1,53	1,56	1,60	1,63	1,66	1,70	1,72	1,76	1,79	1,82
-0,4	1,41	1,44	1,47	1,51	1,54	1,57	1,60	1,63	1,67	1,70	1,74	1,76	1,80	1,83	1,86
-0,2	1,45	1,48	1,51	1,55	1,58	1,61	1,64	1,67	1,71	1,74	1,78	1,80	1,84	1,87	1,90
0	1,49	1,52	1,55	1,58	1,62	1,65	1,68	1,71	1,75	1,78	1,81	1,84	1,87	1,91	1,94
0,2	1,52	1,56	1,59	1,62	1,66	1,69	1,72	1,75	1,78	1,82	1,85	1,88	1,91	1,95	1,98
0,4	1,56	1,60	1,63	1,66	1,69	1,73	1,76	1,79	1,82	1,86	1,89	1,92	1,95	1,98	2,02
0,6	1,60	1,64	1,67	1,70	1,73	1,77	1,80	1,83	1,86	1,89	1,93	1,96	1,99	2,02	2,06
0,8	1,64	1,68	1,71	1,74	1,77	1,80	1,84	1,87	1,90	1,93	1,97	2,00	2,03	2,06	2,10
1	1,68	1,71	1,75	1,78	1,81	1,84	1,88	1,91	1,94	1,97	2,01	2,04	2,07	2,10	2,14
1,2	1,72	1,75	1,79	1,82	1,85	1,88	1,91	1,95	1,98	2,01	2,05	2,08	2,11	2,14	2,17
1,4	1,76	1,79	1,82	1,86	1,89	1,92	1,95	1,99	2,02	2,05	2,09	2,11	2,15	2,18	2,21