



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO
ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO
POR *Lactobacillus helveticus***

Marcelo Teixeira Leite

Uberlândia - MG

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO
ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO
POR *Lactobacillus helveticus***

Marcelo Teixeira Leite

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Uberlândia - MG

2006

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	v
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 – INTRODUÇÃO.....	3
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 – Soro de queijo	
2.1.1 – Introdução.....	5
2.1.2 – O soro como um poluente.....	6
2.1.3 – O soro e seus derivados.....	8
2.1.4 – Aplicações do soro e derivados.....	15
2.2 – O ácido láctico.....	16
2.3 – As bactérias do ácido láctico	
2.3.1 – Introdução.....	19
2.3.2 - O gênero <i>Lactobacillus</i>	20
2.3.3 - O agrupamento dos lactobacilos.....	20
2.3.3.1 - Lactobacilos estritamente homofermentativos.....	21
2.3.3.2 - Lactobacilos heterofermentativos facultativos.....	22
2.3.3.3- Lactobacilos estritamente heterofermentativos.....	22
2.3.4 – O metabolismo dos carboidratos.....	23
2.3.5 – A fermentação homoláctica ou glicólise.....	25
2.3.5.1 - O primeiro estágio da glicólise.....	25
2.3.5.2 - O segundo estágio da glicólise.....	27
2.3.5.3 – Glicogênio, amido, dissacarídeos, pentoses.....	29
2.3.6 – Cepas geneticamente modificadas para a produção do ácido láctico	32
2.4 – A produção do ácido láctico por fermentação	
2.4.1 - Introdução.....	34
2.4.2 - Fontes de carbono.....	35
2.4.3 - Fontes de nitrogênio.....	39
2.4.4 - Processos contínuos e descontínuos.....	43

2.4.5 - Imobilização e recirculação de células.....	44
2.4.6 - pH.....	45
2.4.7 - Temperatura.....	48
2.4.8 - Formação de subprodutos.....	49
2.4.9 - Formação de isômeros.....	52
2.4.10 - Densidade celular.....	55
2.5 – Cinética e modelagem das fermentações	
2.5.1 – Introdução.....	55
2.5.2 – O modelo logístico de crescimento microbiano.....	56
2.5.3 - A Equação de Luedeking e Piret.....	59
2.6 – A otimização da produção fermentativa do ácido láctico utilizando a metodologia da superfície de resposta.....	62
2.7 - Estimação de parâmetros em modelos não lineares	
2.7.1 - O método dos mínimos quadrados.....	64
2.7.2 - Medidas de não linearidade.....	65
2.7.2.1 - Medidas de curvatura de Bates e Watts.....	66
2.7.2.2 - Medida de vício de Box.....	68
2.7.3 - Estudo de simulação.....	69
2.7.4 - Resultados inferenciais.....	70
3 – MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 – Planejamento dos experimentos.....	72
3.2 – Microrganismo.....	73
3.3 - Preparo e padronização do inóculo.....	74
3.4 - Preparo do meio de fermentação.....	75
3.5 – Fermentações.....	76
3.6 - Metodologia analítica.....	76
3.7 - Análise estatística.....	79
3.8 – Modelagem da produção fermentativa do ácido láctico	
3.8.1 – Modelo de crescimento.....	82
3.8.2 – Modelo de formação do produto.....	83
3.8.3 – Modelo de consumo do substrato.....	84
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 – Otimização da produção fermentativa do ácido láctico.....	86

4.2 – Estudo cinético e modelagem.....	95
4.2.1 - Análise das curvas de crescimento.....	97
4.2.2 - Estimação dos parâmetros	
4.2.2.1 - Modelo logístico de crescimento.....	102
4.2.2.2 - Modelo de crescimento de Amrane.....	104
4.2.2.3 - Modelo de formação do produto – Equação de Luedeking e Piret.....	106
4.2.2.4 - Modelo de consumo de substrato: Equação de Pirt.....	108
4.2.3 – Avaliação da modelagem.....	111
4.2.3.1 - Modelo logístico de crescimento.....	111
4.2.3.2 - Modelo de formação do produto: Equação de Luedeking e Piret.....	113
4.2.3.4 - Modelo de formação do substrato: Equação de Pirt.....	115
4.2.3.5 – Análise global dos resultados.....	118
5 – CONCLUSÃO.....	121
6 – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	123
Apêndice A – Método DNS para análise de açúcares redutores.....	124
Apêndice B – Curva de crescimento do <i>Lactobacillus helveticus</i>	126
Apêndice C – Curva de calibração de uma suspensão bacteriana.....	128
Apêndice D - Concentrações celulares, de substrato e de produto em função do tempo, para concentrações iniciais de lactose iguais a 52 g/L, 82 g/L e 112 g/L.....	130
Anexo A - Programa para o cálculo das medidas de curvatura de Bates e Watts e do vício de Box.....	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Processamento dos soros ácido, doce, desmineralizado e com teor de lactose reduzido.....	10
Figura 2.2	Processo de fabricação dos concentrados de soro.....	11
Figura 2.3	Processos de fabricação do isolado de proteína de soro.....	12
Figura 2.4	Formas espaciais dos isômeros do ácido láctico.....	17
Figura 2.5	Rotas metabólicas da fermentação da glicose nas bactérias do ácido láctico.....	24
Figura 2.6	Produção do ácido láctico a partir do amido em processo de sacarificação e fermentação simultâneas (A) e em separado (B).....	36
Figura 3.1	Ilustração da montagem experimental.....	78
Figura 3.2	Forma canônica para uma superfície de resposta em duas variáveis	81
Figura 4.1	Superfícies de resposta para a produção de ácido láctico como uma função das variáveis: (a) temperatura e concentração de extrato de levedura; (b) concentração de lactose e pH; (c) temperatura e pH; (d) concentração de extrato de levedura e pH.....	88
Figura 4.2	Superfície de resposta para a produção de ácido láctico como uma função do pH e da concentração de extrato de levedura.....	93
Figura 4.3	Concentrações de produto, substrato e biomassa em função do tempo nas condições ótimas: lactose 82 g/L; extrato de levedura 23,36 g/L; temperatura 40 °C; pH 6.8.....	95
Figura 4.4	Concentrações de produto, substrato e biomassa em função do tempo para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 112 g/L.....	96
Figura 4.5	Concentrações celulares em função do tempo para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L.....	98
Figura 4.6	Gráficos semilogarítmicos das concentrações celulares em função do tempo para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L.....	100
Figura 4.7	Concentrações de ácido láctico, obtidas experimentalmente, e as previstas pela Equação 3.21, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L.....	107

Figura 4.8	Concentrações de lactose obtidas experimentalmente e as preditas pela equação 3.25, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L.....	110
Figura 4.9	Valores experimentais da concentração celular e os preditos pelo modelo logístico, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L, (B) 82 g/L e (C) 112 g/L.....	112
Figura 4.10	Valores experimentais da concentração de ácido láctico e os preditos pelo modelo de Luedeking e Piret, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L, (B) 82 g/L e (C) 112 g/L.....	114
Figura 4.11	Valores experimentais da concentração de lactose e os preditos pelo modelo de Pirt, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L, (B) 82 g/L e (C) 112 g/L.....	117
Figura 4.12	Regressão linear dos dados de μ_x em função de P.....	118
Figura 4.13	Comparação entre os valores observados e os preditos pelos modelos: (A) de crescimento logístico; (B) de consumo de substrato (Equação de Pirt) e (C) de formação de produto (Equação de Luedeking e Piret).....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composições dos soros doce e ácido.....	6
Tabela 2.2	Composições típicas dos derivados de soro na forma de pó.....	13
Tabela 2.3	Composições dos permeados de soro Grau Ração e Grau Alimento...	14
Tabela 2.4	Influência da fonte de carbono sobre a produção de ácido láctico.....	37
Tabela 2.4	Influência da fonte de nitrogênio sobre a produção do ácido láctico...	40
Tabela 2.6	Influência do modo de fermentação sobre a produção do ácido láctico.....	43
Tabela 2.7	Influência da recirculação de células sobre a produção de ácido láctico.....	45
Tabela 2.8	Influência do pH inicial e do controle do pH na produção do ácido láctico.....	45
Tabela 2.9	Influência da temperatura sobre a produção do ácido láctico.....	49
Tabela 2.10	Efeito dos parâmetros do processo sobre a formação de subprodutos.....	50
Tabela 2.11	Efeito dos parâmetros do processo sobre a forma isomérica do ácido láctico produzido.....	52
Tabela 3.1	Planejamento composto central, com variáveis independentes codificadas.....	72
Tabela 3.2	Valores reais das variáveis independentes codificadas.....	73
Tabela 4.1	Resultados do planejamento experimental.....	86
Tabela 4.2	Valores reais das variáveis independentes codificadas.....	92
Tabela 4.3	Resultados do planejamento composto central, construído para a otimização das variáveis concentração de extrato de levedura (X2) e pH (X4).....	92
Tabela 4.4	Parâmetros cinéticos do modelo logístico de crescimento.....	103
Tabela 4.5	Comparação entre as concentrações celulares máximas obtidas experimentalmente (Xmax) e as previstas pelo modelo logístico de crescimento (K).....	103
Tabela 4.6	Medidas de não linearidade dos parâmetros μ_{max} e K do modelo logístico de crescimento.....	104
Tabela 4.7	Parâmetros cinéticos do modelo de crescimento de Amrane.....	105

Tabela 4.8	Medidas de não linearidade dos parâmetros μ_{max}, c e d do modelo de Amrane.....	105
Tabela 4.9	Parâmetros r e Kp da Equação 3.21 e concentração experimental máxima de produto, Pmax.....	106
Tabela 4.10	Parâmetros A e B da equação de Luedeking; Piret, para diferentes concentrações iniciais de lactose.....	108
Tabela 4.11	Parâmetros a e Ko da Equação 3.25, para diferentes concentrações iniciais de lactose.....	109
Tabela 4.12	Parâmetros $Y_{X/S}$ e ms do modelo de Pirt, para diferentes concentrações iniciais de lactose.....	109
Tabela 4.13	Parâmetros cinéticos dos modelos de concentração celular, consumo de substrato e formação de produto.....	111
Tabela 4.14	Velocidades de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, a partir de 24 horas de fermentação.....	116
Tabela 4.15	Valores de μ_x e P correspondentes a S^*	116

LISTA DE SÍMBOLOS

A	coeficiente da formação do produto associada ao crescimento, g ácido láctico/g células
a	parâmetro cinético, h^{-1}
B	coeficiente da formação do produto não associada ao crescimento, g ácido láctico/g células·h
c	parâmetro cinético do modelo de crescimento de Amrane, h^{-1}
CL	nível utilizado para a codificação da variável independente lactose, g/L
d	parâmetro cinético do modelo de crescimento de Amrane, h^{-1}
K	densidade de saturação, g células/L
K₀	parâmetro cinético, g lactose/L
K_p	parâmetro cinético, g ácido láctico/L
m_s	coeficiente de consumo específico para manutenção de energia, h^{-1}
P	concentração de ácido láctico, g/L
P_{max}	concentração experimental máxima de ácido láctico, g/L
r	Parâmetro cinético, h^{-1}
S	concentração de lactose, g/L
S*	Concentração residual de lactose
S₀	concentração de lactose no instante $t = 0$
T	temperatura, °C
X	concentração celular, g/L
X_i	i-ésima variável codificada do planejamento experimental
X_{max}	concentração experimental máxima de células, g/L
X₀	concentração celular no instante $t = 0$
Y_{X/S}*	fator real de conversão de substrato para células, g células/g substrato
YE	nível utilizado para a codificação da variável independente extrato de levedura, g/L
α	nível de significância estatística
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento celular, h^{-1}
μ_s*	velocidade específica de consumo de substrato, quando $S = S^*$ (h^{-1})
μ_x	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a fermentação homoláctica do soro de queijo, utilizando uma cepa do *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009). Os experimentos foram conduzidos em um fermentador em batelada, com controles de agitação, temperatura e pH, por um período de 32 horas. Foram analisadas as influências de quatro variáveis sobre a produção do ácido láctico: temperatura, pH, concentração do substrato lactose e concentração do extrato de levedura, utilizado como suplemento do meio de fermentação. Os efeitos dessas variáveis e de suas interações foram analisadas pela metodologia da superfície de resposta. As maiores influências foram exercidas pelo pH e pela concentração do extrato de levedura. Através de uma análise canônica da superfície de resposta ajustada, determinou-se os valores ótimos das variáveis que levaram à máxima produção de ácido láctico: 82 g/L de lactose, 23,36 g/L de extrato de levedura, temperatura de 40 °C e pH 6,8. Nestas condições, a concentração do ácido láctico atingiu 59 g/L. Um estudo cinético revelou que a fermentação do soro de queijo pelo *Lactobacillus helveticus* é inibida pelo substrato e pelo produto. Foram testados modelos para descrever o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a formação do produto. A equação logística representou adequadamente o crescimento do *Lactobacillus helveticus*. Os maiores desvios ocorreram no início da fermentação e na fase estacionária, onde a condição de velocidade instantânea de crescimento igual a zero não é prevista pelo modelo. As medidas de vício de Box e de curvatura de Bates e Watts referentes a este modelo demonstraram que existe confiabilidade estatística para os estimadores de mínimos quadrados dos parâmetros. O ajuste do modelo de crescimento de Amrane (1999) aos resultados experimentais foi ligeiramente melhor do que o obtido pela equação logística. Entretanto, as medidas de vício de Box e de curvatura de Bates e Watts demonstraram que as inferências estatísticas sobre as estimações dos parâmetros não são válidas e, portanto, a possibilidade de utilização deste modelo foi descartada. Os modelos de consumo de substrato de Pirt e de formação de produto de Luedeking e Piret ajustaram-se bem aos resultados experimentais.

PALAVRAS-CHAVE: soro de queijo, ácido láctico, otimização, *Lactobacillus helveticus*.

ABSTRACT

In this work the homolactic fermentation of cheese whey using *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009) was studied. The experiments were carried out in a batch reactor, with agitation, temperature and pH control during a period of 32 hours. The influences of four variables according to a composite design on the production of lactic acid were analyzed: temperature, pH, concentration of lactose and concentration of yeast extract, used as a supplement for the fermentation medium. The effects of these variables and its interactions were analyzed by the response surface methodology. The biggest influences were exerted by pH and by the concentration of yeast extract. Through a canonic analysis of the adjusted response surface, the optimal variables values that led to the biggest production of lactic acid were determined: 82 g/L of lactose, 23.36 g/L of yeast extract at 40 °C and pH 6.8. In these conditions, the concentration of the lactic acid reached 59 g/L. Through a kinetic study, it was proved that the homolactic fermentation of whey is inhibited by the substrate as well as by the product. Models were tested to describe the microbial growth, the substrate consumption and the product formation. The logistic equation represented well the growth of the *Lactobacillus helveticus*. The biggest deviations occurred at the beginning of the fermentation and at the stationary phase, where the condition of instantaneous rate of growth equal to zero is not predicted by the model. The measures of bias from Box and of curvature from Bates and Watts referring to this model demonstrated that there is a statistic confidence for the least square estimators of the parameters. The adjustment of the growth model from Amrane (1999) for the experimental data was slightly better than the one obtained from the logistic equation. However, the measures of bias from Box and of curvature from Bates and Watts demonstrated that the statistical inferences on the parameters estimative are not valid. Therefore, the possibility of using this model was discarded. The models of substrate consumption from Pirt and of formation of product from Luedeking and Piret fitted well to the experimental data.

WORD KEYS: whey, lactic acid, *Lactobacillus helveticus*, optimization.

1 – INTRODUÇÃO

Soro é o nome dado ao líquido remanescente das etapas de precipitação e remoção da caseína do leite, durante a fabricação do queijo. As indústrias de laticínios o produzem diariamente em grandes quantidades. Para cada 1kg de queijo produzido gera-se, em média, 9 kg de soro (SISO, 1996). A produção mundial no ano de 2001 foi de aproximadamente 100 bilhões de litros (ALVES FILHO, 2002).

Por se tratar de um subproduto de baixo valor econômico, antigamente o soro era simplesmente lançado nos cursos d'água sem nenhum tratamento prévio. Embora várias possibilidades de utilização tenham sido pesquisadas nos últimos cinquenta anos, até o ano de 1995 quase metade do soro produzido em todo o mundo ainda era descartado como um efluente (SISO, 1996). Isto fez com que o soro se tornasse um sério problema ambiental, devido às grandes quantidades produzidas e ao seu alto teor de matéria orgânica, com DBO=30000-50000 mg/L (MAWSON, 1994). Para atender às legislações ambientais, as indústrias têm buscado alternativas para a sua utilização ao invés do descarte. As proteínas contidas no soro, por exemplo, podem ser separadas por ultrafiltração e utilizadas como suplemento alimentar e como matéria-prima para a fabricação de produtos nutricionais. Entretanto, a recuperação das proteínas pouco contribui para a diminuição da carga poluente do soro, formada principalmente pela lactose presente no permeado (MAWSON, 1994). Logo, é de grande interesse o estudo das diversas possibilidades de utilização desse açúcar.

Um dos caminhos mais promissores é utilizá-lo como fonte de carbono para a produção de ácidos orgânicos por fermentação. A maior parte das pesquisas desenvolvidas nos últimos anos visam à produção de ácido láctico, de alto valor agregado, através da fermentação da lactose presente no soro (FU; MATHEWS, 1999).

Os principais consumidores do ácido láctico são as indústrias alimentícia, de bebidas e farmacêutica. Entretanto, a produção mundial de ácido láctico vem crescendo nos últimos anos para atender principalmente a demanda das indústrias produtoras de polímeros biodegradáveis. Esses polímeros são fabricados a partir do ácido láctico produzido por fermentação, e são utilizados principalmente na produção de embalagens biodegradáveis (BUSTOS *et al.*, 2004).

No ano de 2001 foram produzidas oitenta e seis mil toneladas de ácido láctico em todo o mundo. Desse total, aproximadamente noventa por cento foi obtido por fermentação. O restante foi produzido sinteticamente, através da hidrólise da lactonitrila (NEXANT

CHEMSYSTEMS, 2002). O principal substrato para a produção do ácido láctico por fermentação é a glicose de milho. Portanto, para que o soro de queijo se constitua numa matéria-prima atrativa e conquiste espaço neste mercado, são necessários vários estudos abordando tanto os aspectos técnicos quanto os econômicos do processo.

Assim sendo, este trabalho dedica-se a estudar a produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo com os seguintes objetivos:

- i. Analisar a influência das variáveis temperatura, pH e concentrações de lactose e de extrato de levedura sobre a formação do produto, através da metodologia da superfície de resposta;
- ii. Localizar o ponto de máxima produção de ácido láctico, através de uma análise canônica da superfície de resposta ajustada;
- iii. Desenvolver um estudo cinético e propor modelos para prever as concentrações de células, substrato e produto em função do tempo.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Soro de Queijo

2.1.1 - Introdução

Para a fabricação da maioria dos queijos, adiciona-se ao leite uma cultura láctica (fermento), composta de bactérias produtoras de ácido láctico, e uma enzima (coalho) capaz de coagular o leite. A atividade da enzima, combinada com a acidez produzida pelo fermento, causam a desestabilização das proteínas que compõem as micelas de caseína. A destruição das micelas inicia o processo de coagulação, formando um gel de caseína. A massa formada é aquecida lentamente, e este processo de cozimento provoca a contração do gel e a expulsão de líquido do seu interior. Este líquido remanescente da precipitação da caseína do leite, durante a fabricação do queijo, recebe o nome de *soro de queijo* (USDEC – United States Dairy Exporters Council, 2004).

Este subproduto representa 85-95% do volume do leite e retém 55% dos seus nutrientes. Entre esses nutrientes destacam-se a lactose (4-5%), as proteínas solúveis (0,6-0,8%), os lipídeos (0,4-0,5%) e os sais minerais (8-10% do extrato seco). Os sais minerais são essencialmente os mesmos presentes no leite. Dentre os mais importantes destacam-se os sais de sódio e potássio, que representam a metade do total. O restante é formado por sais de cálcio, magnésio e fósforo. Há também a presença de ácido láctico (0,1-0,8%), ácido cítrico, compostos nitrogenados não protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (SISO, 1996). As proteínas – em sua maior parte globulina e albumina – são de alto valor nutricional, constituindo-se de matéria-prima para produção de enzimas, anticorpos e outras substâncias necessárias ao metabolismo humano (MADRID *et al*, 1995).

O soro de queijo pode ser classificado como ácido ou doce, dependendo do processo do qual ele é originado. Na fabricação dos queijos mussarela, cheddar e suíço, por exemplo, a coagulação das proteínas é feita por um processo enzimático e o soro resultante é classificado como doce, com acidez titulável entre 0,10 e 0,15%. Já na fabricação dos queijos cottage e ricota, ocorre a adição de ácido (láctico, cítrico ou acético) para promover a coagulação. Além disso, uma quantidade significativa de lactose é convertida a ácido láctico, antes que o soro seja separado da massa. Essa conversão é feita pelas bactérias que compõem o fermento. Desse modo, o soro produzido é classificado como ácido, com acidez titulável entre 0,35 e

0,44% (USDEC, 2004). As principais diferenças quanto à composição desses dois tipos de soro são exibidas na Tabela 2.1. O soro doce possui uma maior quantidade de lactose. O soro ácido apresenta maior quantidade de ácido láctico e uma menor quantidade de proteínas. A sua utilização pela indústria alimentícia é limitada, devido ao sabor azedo e ao alto teor de sais (MAWSON, 1994).

Tabela 2.1 – Composições dos soros doce e ácido.

<i>Constituintes</i>	<i>Soro doce</i> (% m/v)	<i>Soro ácido</i> (%m/v)
Água	93-94	94-95
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Proteínas	0,8-1,0	0,6-0,8
Sais minerais	0,5-0,7	0,7-0,8
Lipídeos	0,3-0,5	0,3-0,6
Ácido láctico	0,1	0,1-0,8

Fonte: Madrid *et al.*, 1995

2.1.2 – O soro como um poluente

A crescente demanda por queijos no mercado faz com que a produção de soro aumente a cada ano. Por causa da sua baixa concentração de nutrientes, durante muitos anos o soro foi considerado um simples efluente e era lançado nos cursos d'água sem nenhum tratamento prévio. Desse modo, o soro de queijo tornou-se um grave problema ambiental, devido aos grandes volumes produzidos e à grande carga de matéria orgânica, com DBO entre 30000 e 50000 mg/L. A lactose é a principal responsável por estes altos valores, haja vista que a recuperação de proteínas reduz esses números em apenas 10000 mg/L. Já a bioconversão da lactose reduz a DBO em mais de 75% (MAWSON, 1994).

O soro de queijo produzido nos laticínios possui dois destinos: disposição ou utilização. Entende-se como disposição o lançamento sobre o campo, oxigenação em lagoas aeradas ou sistemas de tratamento de efluentes, bombeamento para um curso d'água ou outra destinação semelhante (SISO, 1996). Em países desenvolvidos industrialmente, a disposição está se tornando cada vez menos comum. Porém, em muitos países, a disposição ainda representa a mais freqüente destinação dada ao soro de queijo (TORQUETTI *et al.*, 1999

apud TRINDADE, 2002). O soro de queijo, quando despejado junto com os demais resíduos líquidos das indústrias de laticínios, pode significar a duplicação do sistema de tratamento, devido aos grandes volumes produzidos. Além disso, por apresentar alta concentração de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio, sua estabilização por métodos convencionais e tratamento biológico é dificultada (PAPA, 2000).

No Brasil, ainda é comum o lançamento dos efluentes das indústrias de laticínios diretamente nos cursos d'água, sem qualquer tratamento prévio. Entretanto, devido a uma maior atuação dos órgãos ambientais, essa é uma prática cada vez menor. Esta mudança de comportamento é notadamente percebida no estado de Minas Gerais, maior produtor de queijo e conseqüentemente de soro do país. A FEAM - Fundação Estadual do Meio Ambiente - tem aumentado a fiscalização e buscado, junto aos produtores, soluções para a destinação do soro, tendo como objetivo a preservação ambiental conciliada com o desenvolvimento econômico (TRINDADE, 2002).

Apesar de solucionar o problema legal associado ao lançamento do soro sem tratamento em cursos d'água, a disposição do soro pelos métodos de tratamento de efluentes fornece produtos com baixo ou nenhum valor econômico. Desta maneira, o tratamento do soro se constitui apenas em uma fonte de trabalho e custo, que são refletidos diretamente nos preços dos produtos para o consumidor final (FU; MATHEWS, 1999).

A recuperação dos nutrientes do soro e a sua transformação em compostos de maior valor agregado parece ser uma melhor alternativa em relação à disposição. Deste modo, pode-se ter uma atividade econômica paralela à redução do efeito poluidor. A matéria orgânica presente no soro pode ser aproveitada de várias formas. As proteínas podem ser recuperadas por ultrafiltração e utilizadas como suplemento alimentar. A lactose pode ser cristalizada e comercializada, ou fermentada para produzir etanol ou ácidos orgânicos, ou ainda hidrolisada para produzir edulcorantes (SISO, 1996).

Enfim, com a necessidade de se reduzir a carga poluente dos laticínios, de forma viável tanto sob o aspecto técnico quanto do financeiro, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos com o objetivo de explorar as possibilidades de utilização do soro de queijo. Um dos caminhos mais promissores é a sua utilização como fonte de carbono de baixo custo para a produção fermentativa de ácidos orgânicos. A maior parte dessas pesquisas visam à produção de ácido láctico, de alto valor agregado, através da fermentação da lactose presente no soro (FU; MATHEWS, 1999).

2.1.3 - O soro e seus derivados

A identificação de alternativas para um adequado aproveitamento do soro de queijo é de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional, do volume produzido e de seu poder poluente (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001). Na última década, a necessidade de adequação às leis ambientais e a busca por produtos com maior valor agregado fez com que as indústrias intensificassem as pesquisas visando explorar as possibilidades de utilização do soro de queijo. Os investimentos resultaram em novos produtos, como os concentrados e os isolados de proteínas do soro, além de frações de proteínas e produtos derivados (USDEC, 2004).

Os derivados do soro de queijo fabricados atualmente pelas indústrias de laticínios, bem como os processos utilizados, são descritos a seguir. Deve-se ressaltar que, antes de ser convertido em qualquer produto, o soro *in natura* é centrifugado e pasteurizado. O objetivo da primeira etapa é remover parte dos lipídeos e as pequenas partículas de queijo (finos) que não permaneceram aderidas à massa. Uma centrífuga clarificadora remove os finos e uma outra centrífuga, conhecida como separadora, remove a gordura. Essa gordura é denominada *creme* do soro. O objetivo da pasteurização é eliminar bactérias provenientes do fermento, evitando que a lactose do soro seja convertida em ácido láctico. Este processo também elimina patógenos porventura presentes. A pasteurização é feita pelo método HTST (High Temperature, Short Time), onde o soro permanece à 72°C por 15 segundos (USDEC, 2004).

Soro doce em pó

É obtido a partir do soro doce pasteurizado, que não tenha recebido a adição de nenhum tipo de conservante. Inicialmente, o soro passa por um processo de evaporação à vácuo, onde é concentrado até um mínimo de 50% de sólidos formando assim uma solução supersaturada de lactose. O soro concentrado segue então para a cristalização, onde formam-se os cristais de lactose. Por fim, a secagem do soro é feita em um *spray dryer* (USDEC, 2004).

Soro ácido em pó

Produzido a partir do soro ácido pasteurizado, que não tenha recebido a adição de nenhum tipo de conservante. O processo é idêntico ao utilizado na fabricação do soro doce em pó (USDEC, 2004).

Soro com teor de lactose reduzido

A redução do teor de lactose pode ser feita por técnicas de separação como precipitação e centrifugação, ou por hidrólise enzimática, transformando a lactose em glicose e galactose. O total de lactose no produto seco não deve exceder 60%. A acidez pode ser ajustada através da adição de substâncias permitidas (USDEC, 2004).

Soro desmineralizado

O soro desmineralizado é produzido através de técnicas de separação como troca iônica, diafiltração ou eletrodialise. A acidez pode ser ajustada através da adição de substâncias permitidas. O produto seco não deve exceder 7% de cinzas (USDEC, 2004). A Figura 2.1 ilustra o processo de obtenção dos soros ácido, doce, com teor de lactose reduzido e desmineralizado.

WPC - Concentrado de proteína de soro

Este produto é obtido separando-se as proteínas do soro através de membranas. A acidez pode ser ajustada através da adição de substâncias permitidas. O produto final é classificado como WPC34, WPC50, WPC60, WPC75 ou WPC80, e deverá conter percentuais mínimos de proteínas de 34%, 50%, 60%, 75% e 80%, respectivamente (USDEC, 2004).

A Figura 2.2 ilustra o processo de obtenção dos concentrados de proteínas do soro.

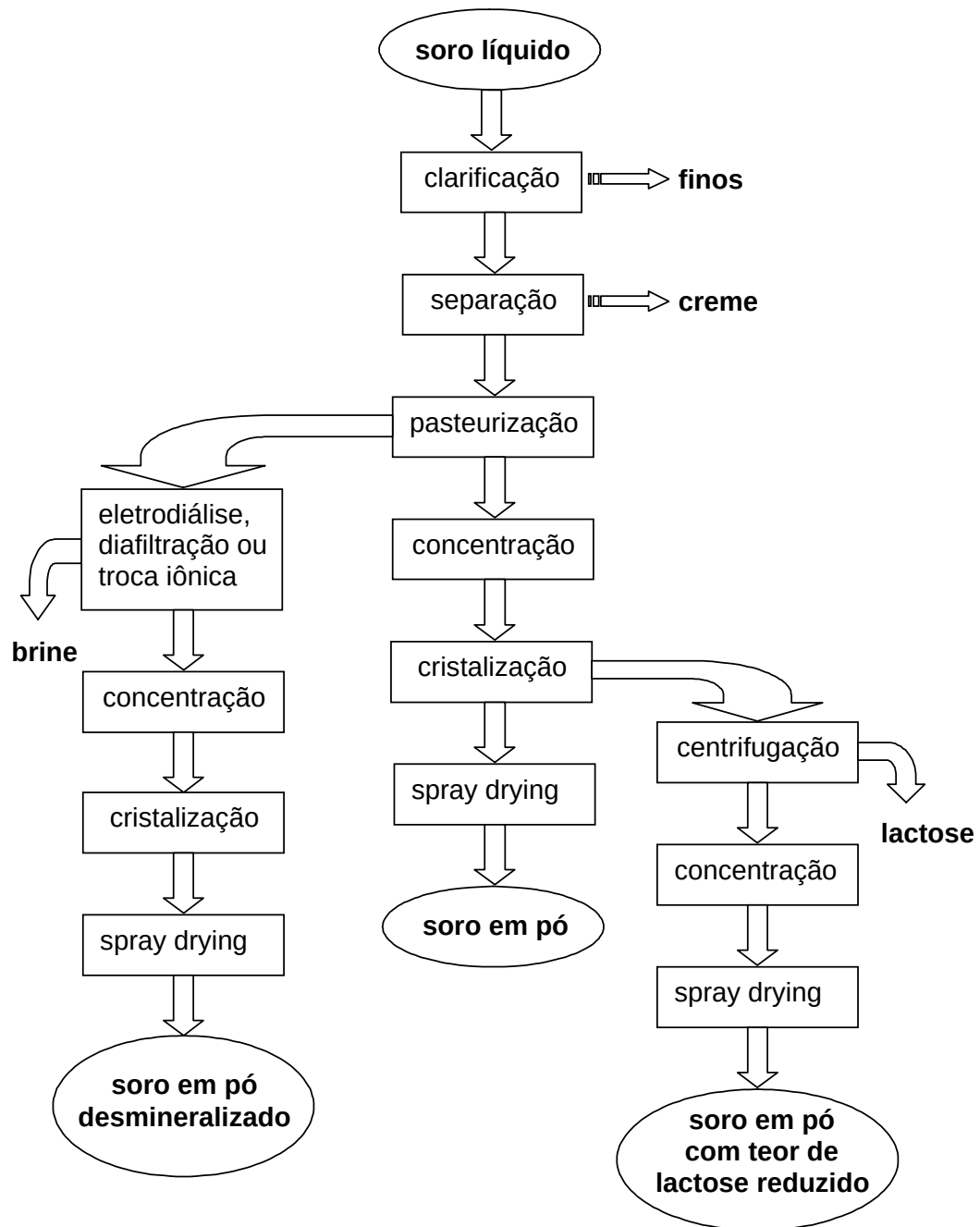


Figura 2.1 – Processamento dos soros ácido, doce, desmineralizado e com teor de lactose reduzido. Adaptado de USDEC (2004).

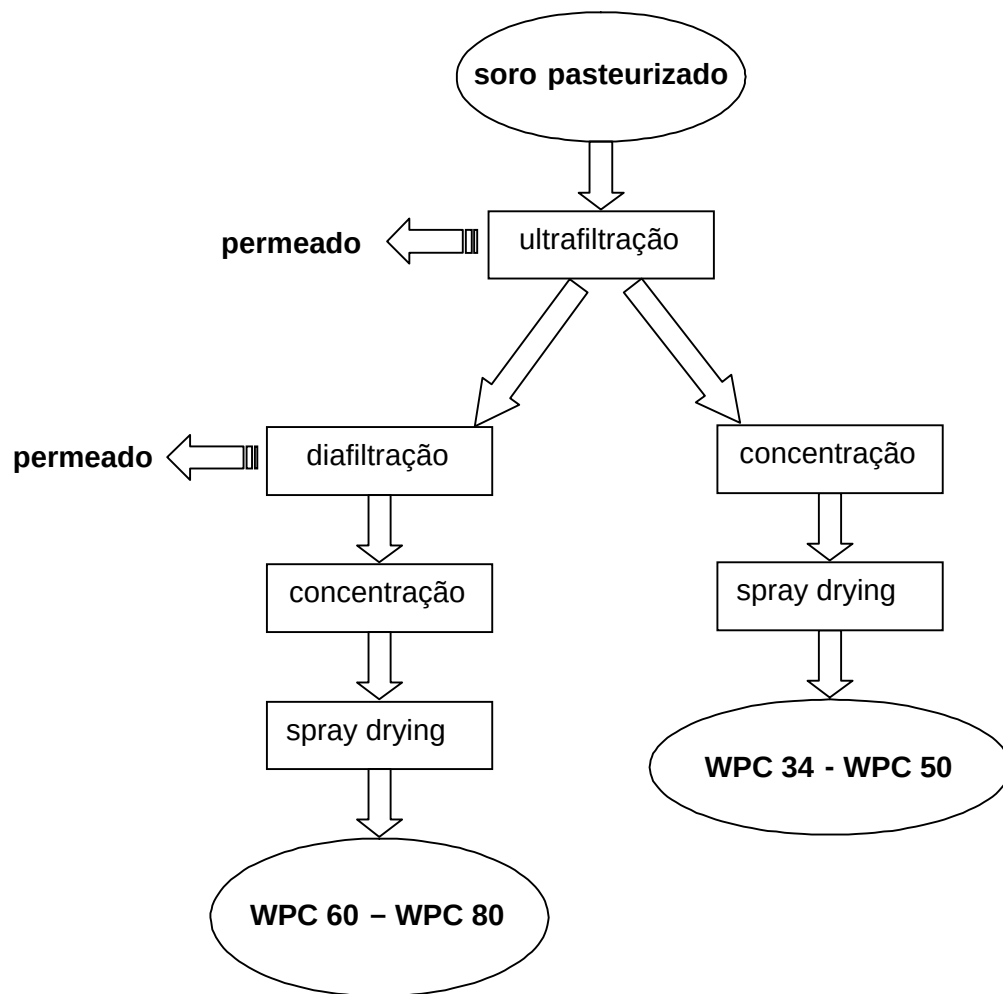


Figura 2.2 – Processo de fabricação dos concentrados de soro. Adaptado de USDEC (2004).

WPI – Isolado de proteína de soro

Este produto é obtido separando-se as proteínas do soro através de microfiltração ou por troca iônica. A microfiltração fornece um produto com maior teor de glicomacropéptídeos. O produto final deve conter um mínimo de 90% de proteínas (USDEC, 2004).

A Figura 2.3 ilustra o processo de obtenção da proteína isolada do soro.

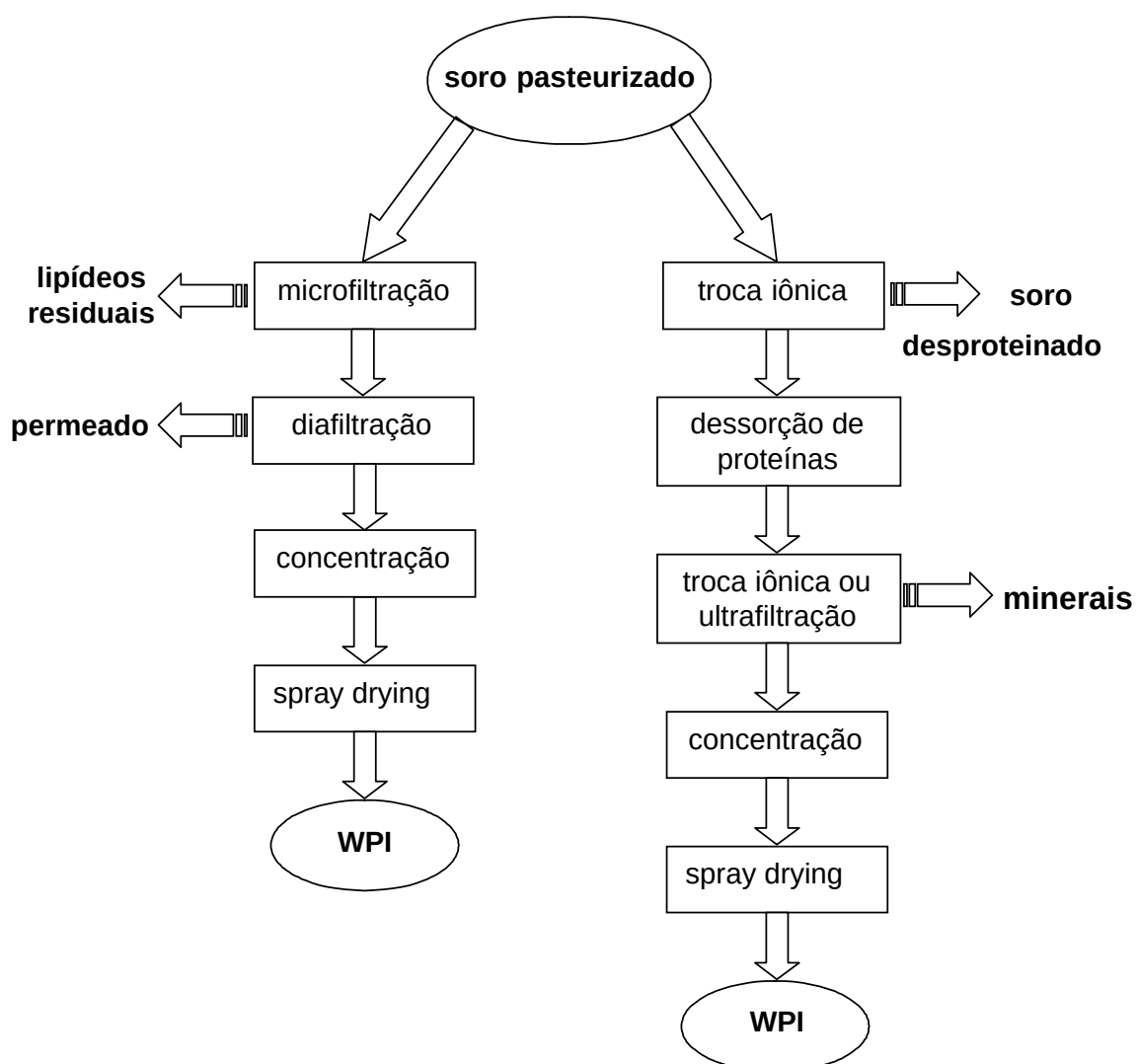


Figura 2.3 – Processos de fabricação do isolado de proteína de soro

Adaptado de USDEC, 2004.

Na Tabela 2.2 são apresentadas as composições típicas dos soros de queijo ácido, doce, com teor de lactose reduzido e desmineralizado, bem como as composições dos concentrados e dos isolados de proteína do soro.

Tabela 2.2 – Composições típicas dos derivados de soro na forma de pó.

Tipo de soro	Concentração (%)				
	Proteínas	Lactose	Lipídeos	Cinzas	Umidade
doce	11,0-14,5	63-75	1,0-1,5	8,2-8,8	3,5-5,0
ácido	11,0-13,5	61-70	0,5-1,5	9,8-12,3	3,5-5,0
teor de lactose reduzido	18-24	52-58	1-4	11-22	3-4
desmineralizado	11-15	70-80	0,5-1,8	1-7	3-4
WPC 34	34-36	48-52	3,0-4,5	6,5-8,0	3,0-4,5
WPC 50	50-52	33-37	5-6	4,5-5,5	3,5-4,5
WPC 60	60-62	25-30	1-7	4-6	3-5
WPC 75	75-78	10-15	4-9	4-6	3-5
WPC 80	80-82	4-8	4-8	3-4	3,5-4,5
WPI	90-92	0,5-1,0	0,5-1,0	2-3	4,5

Fonte: USDEC, 2004.

Permeados de soro

Os permeados de soro obtidos dos vários processamentos vistos anteriormente são utilizados na fabricação de dois produtos: permeado grau ração e permeado grau alimento. Para isso, os permeados pasteurizados são concentrados, cristalizados e secos (USDEC, 2004). A Tabela 2.3 mostra as composições típicas desses produtos.

Lactoperoxidase

A lactoperoxidase é uma glicoproteína que, juntamente com o peróxido de hidrogênio e tiocianato, formam um sistema capaz de inibir o crescimento bacteriano. Este sistema, conhecido como *sistema lactoperoxidase*, é utilizado como alternativa ao processo de refrigeração na conservação do leite cru (FAO – Food and Agriculture Organization, 1999).

A lactoperoxidase é isolada do soro através de resinas de troca iônica (USDEC, 2004).

Tabela 2.3 – Composições dos permeados de soro Grau Ração e Grau Alimento.

	<i>Permeado Grau Ração</i>	<i>Permeado Grau Alimento</i>
Proteínas (%)	3,5-4,0	3-8
Lactose (%)	82	65-85
Lipídeos (%)	0,2	1,5 (máximo)
Cinzas (%)	8,5	8-20
Umidade (%)	4-5	3-5
Cálcio (mg/100g de produto)	800	870
Fósforo (mg/100g de produto)	600	720
Sódio (mg/100g de produto)	1000	570
Magnésio (mg/100g de produto)	180	130

Fonte: USDEC, 2004.

Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína que inibe a proliferação e o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como leveduras, fungos e protozoários, por sequestrar o ferro disponível no ambiente (McBEAN, 2003). A hidrólise enzimática da lactoferrina libera peptídios com ação inibitória ao vírus da hepatite C e com ação contra a bactéria *Helicobacter pylori* (McCANN, 2001). A lactoferricina, peptídio resultante da ação da pepsina sobre a lactoferrina, apresenta, além da atividade antimicrobiana, ação apoptótica sobre células da leucemia humana (ROY *et al.*, 2002).

A lactoferrina é isolada do soro através de resinas de troca iônica. O grau de pureza obtido é maior do que 90% (USDEC, 2004).

Glicomacropeptídeos (GMP)

Durante a fabricação do queijo, a *k*-caseína é hidrolisada em duas partes: a para-*k*-caseína, que permanece aderida à massa e que contém os aminoácidos 1-105 da molécula da *k*-caseína, e os glicomacropeptídeos, que são frações da cadeia da *k*-caseína que contém os aminoácidos 106-169 e que são removidos juntamente com o soro.

Os glicomacropéptídeos do soro podem suprimir o apetite através do estímulo da produção do hormônio pancreático colecistocinina, que inibe o esvaziamento gástrico, inibe as secreções gástricas e induz à saciedade (BRODY, 2000). Estas substâncias podem ainda alterar a produção de pigmento em melanócitos e atuar como imunomoduladores. São isolados do soro por troca iônica ou através de separação por membrana (USDEC, 2004).

2.1.4 – Aplicações do soro e derivados

O soro “in natura” é utilizado na alimentação de bovinos e, principalmente, suínos. No Brasil, esta prática ainda é muito difundida entre os produtores rurais, que geralmente possuem criação de bovinos leiteiros associados com suínos. Além de uma destinação de reduzido impacto ambiental, a utilização do soro pode fornecer uma parte significativa da nutrição dos animais e redução do consumo de água nos criatórios. Porém, o uso do soro “in natura” na alimentação animal é pouco explorado em sua potencialidade, sendo utilizado de forma rudimentar na maioria das propriedades rurais, apesar de ser vantajoso segundo muitos estudos. Os ruminantes podem adquirir até 30% e os suínos até 20% da matéria seca da sua dieta a partir do soro líquido (KOSIKOWSKI, 1979). Porém, devido ao teor de lactose, deve-se fornecer o soro apenas como um complemento da alimentação e atentar para não oferecê-lo em excesso aos animais (SIENKIEWICZ; RIEDEL, 1990 apud SISO, 1996).

O soro in natura também pode ser utilizado como fertilizante. Entretanto, esta prática não pode ser conduzida por um longo período, pois com o tempo, grandes depósitos de sais podem ocorrer, reduzindo a fertilidade das terras. Assim, há a necessidade de grandes áreas disponíveis para o recebimento do soro, além do cuidado com agentes patogênicos que podem se desenvolver no soro antes do lançamento ao solo (MINAS AMBIENTE, 1998 apud TRINDADE, 2002).

Os vários tipos de soro em pó vistos no item anterior, com exceção do soro ácido, são utilizados pela indústria alimentícia. As maiores aplicações são nos setores de panificação, bebidas lácteas, alimentos protéicos, produtos para alimentação infantil e confeitos. O soro ácido é utilizado apenas para conferir sabor azedo em produtos de panificação (USDEC, 2004).

A lactose cristalizada obtida a partir do soro é utilizada principalmente em bebidas para alimentação infantil, na produção do adoçante lactitol e como excipiente em formulações farmacêuticas (SISO, 1996).

Na última década, a lactose presente no soro doce em pó e nos permeados de soro vem sendo utilizada como fonte de carbono em vários processos fermentativos (FU; MATHEWS, 1999). As principais aplicações são as produções de etanol e de ácidos orgânicos. Embora seja possível encontrar vários trabalhos sobre microrganismos com a capacidade de produzir etanol a partir da lactose, o microrganismo de escolha para a produção em escala comercial é o *Kluyveromyces marxianus* (MAWSON, 1994). A produção de ácido láctico, objeto deste estudo, pode ser alcançada utilizando-se as várias bactérias do ácido láctico. Essas bactérias são descritas no Item 2.3. Outros ácidos orgânicos como os ácidos acético, propiônico, cítrico, glucônico e itacônico, e ainda vitaminas do complexo B e aminoácidos podem ser obtidos através da fermentação da lactose, utilizando diversos processos e diferentes microrganismos. As produções fermentativas do glicerol e da goma xantana também vêm sendo intensamente estudadas (SISO, 1996).

Alguns microorganismos, como o *Kluyveromyces marxianus*, podem ser cultivados em soro de queijo, e a biomassa produzida servir como matéria prima na fabricação de extrato de levedura. Além de ser utilizada na suplementação de meios de fermentação, os extratos de levedura podem ser utilizados como aditivo em alimentos. A utilização de extratos de leveduras para este fim é feita desde a década de 40 nos países industrializados. O produto comercial é um substituto vantajoso do monoglutamato de sódio como aditivo realçador de sabor. Além disso, a preferência do mercado consumidor por produtos mais saudáveis tornou interessante a substituição do monoglutamato de sódio por extratos de levedura, de maneira a diminuir o teor de sal dos alimentos e também pela possibilidade de exprimir no rótulo os dizeres "aditivo natural", como definiu a FDA (Food and Drug Administration, EUA). A classificação do extrato de levedura como aditivo natural está sendo incluída na legislação de vários países (RÉVILLION *et al.*, 2000).

2.2 – O ácido láctico

Ácido láctico é o nome comum dado ao ácido 2-hidroxi-propanóico, descoberto em 1780 pelo químico sueco C. W. Scheele, que o isolou como um composto impuro a partir do leite ácido (DATTA *et al.*, 1995). Trata-se de um ácido alfa-hidroxi simples com um carbono assimétrico (Figura 2.4). Portanto, possui duas formas enantioméricas com atividade óptica. As formas dextrógira e levógira são chamadas de isômeros espaciais, ou estereoisômeros, pois elas diferem entre si apenas pela maneira na qual os átomos estão dispostos no espaço, mas

são idênticas no que se refere à ordenação dos átomos e às ligações atômicas presentes. Ambas as formas podem ser polimerizadas, resultando em compostos com propriedades diferentes. O ácido láctico é encontrado mais freqüentemente nos seres vivos na forma levógira. No homem, por exemplo, somente a forma levógira é produzida na contração muscular (MORRISON; BOYD, 1990).

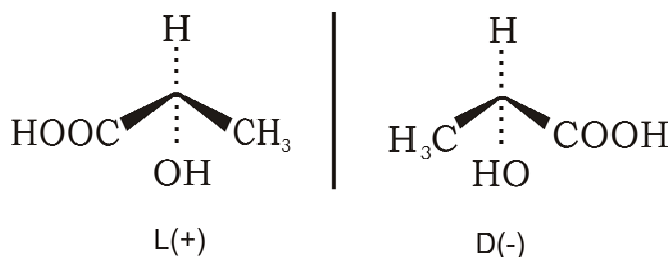


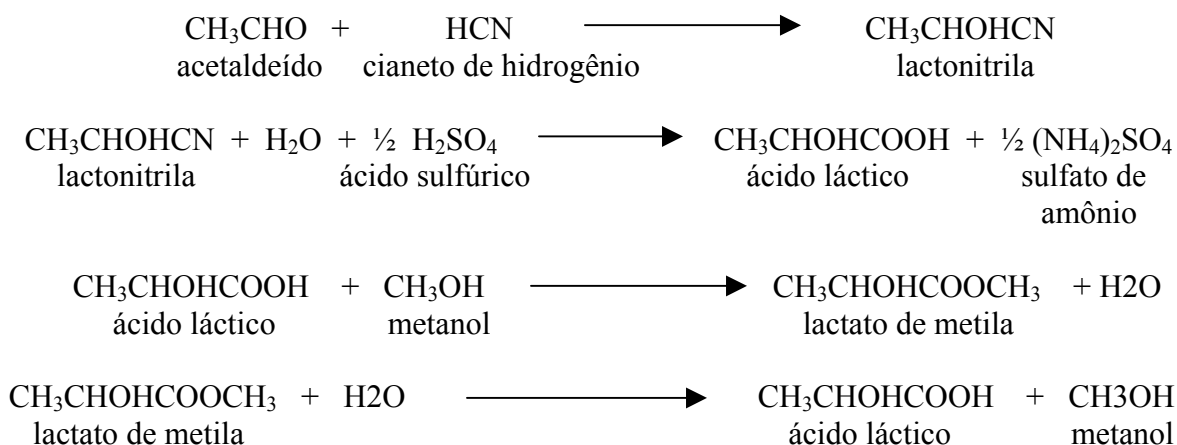
Figura 2.4 – Formas espaciais dos isômeros do ácido láctico.

O ácido láctico é o principal componente do leite ácido e, no corpo humano, pode ser encontrado no sangue, músculo, pele e cabelo. A conversão metabólica do ácido L-láctico no homem é mais rápida do que a do ácido D-láctico e, portanto, a forma levógira é preferida nas aplicações em alimentos e medicina (LEE *et al.*, 1998).

O ácido láctico pode ser obtido através de síntese química ou por processos fermentativos, utilizando as chamadas *bactérias do ácido láctico* (Item 2.3). Atualmente, somente a indústria japonesa Musashino utiliza a rota química para fabricar o ácido láctico em escala comercial, porém, recentemente esta empresa inaugurou uma linha de produção de ácido láctico por fermentação (MUSASHINO CHEMICAL LABORATORY, 2006).

A síntese química do ácido láctico baseia-se na hidrólise da lactonitrila. Inicialmente, cianeto de hidrogênio é adicionado a acetaldeído na presença de uma base, para produzir a lactonitrila. Esta reação ocorre em fase líquida. A lactonitrila produzida é recuperada por destilação e então hidrolisada por ácido sulfúrico, resultando em ácido láctico e sulfato de amônio. O ácido láctico é esterificado com metanol, produzindo lactato de metila. Este composto é recuperado por destilação e em seguida hidrolisado, formando ácido láctico e metanol, que é reciclado. O processo de síntese do ácido láctico é representado a seguir (NARAYANAN *et al.*, 2004):





O ácido láctico também pode ser obtido por outros processos: oxidação do propilenoglicol, reação entre acetaldeído, monóxido de carbono e água, hidrólise do ácido cloropropiônico, degradação catalisada de açúcares e fermentação de carboidratos (NARAYANAN *et al.*, 2004).

A rota química sempre leva à formação de uma mistura racêmica, na qual as concentrações das formas D- e L- são iguais. Nos processos fermentativos, dependendo da bactéria escolhida, pode ser obtida apenas uma das formas, D- ou L-, ou ainda uma mistura dos isômeros em composições variadas (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000). A produção fermentativa do ácido láctico, objeto deste estudo, é descrita com detalhes no Item 2.4.

O ácido láctico é um produto versátil, que encontra aplicações em diversas áreas. É utilizado como acidulante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SCHEPERS *et al.*, 2002). Alguns ésteres de ácido láctico são utilizados como emulsificantes em produtos de panificação (SODEGARD, 1998). Na indústria têxtil, o ácido láctico é utilizado como fixador para corantes (DATTA *et al.*, 1995).

A demanda global de ácido láctico foi de 86000 toneladas no ano de 2001. Os principais consumidores foram as indústrias alimentícia, de bebidas e farmacêutica. Entretanto, a produção mundial de ácido láctico vem crescendo nos últimos anos para atender principalmente a demanda das indústrias produtoras dos polímeros biodegradáveis de ácido láctico. Esses polímeros são fabricados a partir do ácido láctico produzido por fermentação. A indústria NatureWorks, subsidiária da Cargill Inc., é a líder mundial na fabricação de poli-ácido láctico (PLA), com uma produção de 140 mil toneladas por ano (NEXANT CHEMSYSTEMS, 2002).

Esses polímeros estão sendo amplamente utilizados na produção de embalagens biodegradáveis (BUSTOS *et al.*, 2004). Na área médica, os polímeros de ácido láctico são utilizados na fabricação de vários materiais, como fios de sutura (LAM *et al.*, 1995), cola para unir membranas e pele, material para preenchimento de lacunas em ossos (NARAYANAN *et al.*, 2004) e suporte para transplante de tecidos (GIUREA *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2005).

2.3 – As bactérias do ácido láctico

2.3.1- Introdução

As bactérias do ácido láctico englobam um diverso grupo de bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos. Essas bactérias existem nas formas de cocos ou bacilos e geralmente não possuem catalase, embora a pseudo-catalase tenha sido encontrada em alguns casos raros. São quimiorganotróficos e crescem em meios complexos. São encontradas em alimentos (bebidas, laticínios, carne e vegetais fermentados), em plantas, silagem, esgotos e também nos tratos genital, intestinal e respiratório de homens e animais. Carboidratos fermentáveis são utilizados como fonte de energia durante o crescimento desses microrganismos. As hexoses são degradadas até lactato (bactérias homofermentativas) ou, no caso de bactérias heterofermentativas, até lactato e outros produtos adicionais, como acetato, etanol, CO₂, formiato e succinato (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

Com base nos dados das análises comparativas da sequência do RNA ribossomal 16S e 23S, as bactérias Gram-positivas formam duas linhas de descendência. Um dos filos consiste de indivíduos com um conteúdo de guanina e citosina (G + C) menor do que 50% (base molar) em seu DNA. Esses indivíduos formam o chamado ramo *Clostridium*. O outro ramo, chamado Actinomycetos, compreende organismos com um conteúdo G + C maior que 50% (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

As bactérias do ácido láctico típicas, como *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* possuem um conteúdo de G + C menor que 50% e pertencem ao ramo *Clostridium*. O gênero *Bifidobacterium* era considerado como um membro das bactérias do ácido láctico, porém com base no alto conteúdo de G + C e nas análises do rRNA 16S, está claro que as bifidobactérias pertencem ao ramo Actinomycetos. Há várias bactérias importantes para a produção de alimentos e que são

membros do ramo Actinomycetos, como *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* e *Propionibacterium* (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

2.3.2- O gênero *Lactobacillus*

Os lactobacilos são estritamente fermentativos, aero-tolerantes ou anaeróbicos, acidófilos e com complexas exigências nutricionais (carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais, vitaminas e derivados de ácidos nucléicos). Não sintetizam porfirinóides e, portanto, são destituídos de atividades hemodependentes. Cepas de algumas espécies podem usar porfirinóides do ambiente e exibir atividades de catalase, redução de nitrito e até citocromos. Pseudo-catalase é formada em cepas de *Lb. mali*. Utilizando a glicose como fonte de carbono os lactobacilos podem ser homofermentativos, produzindo mais do que 85% de ácido láctico, ou heterofermentativos, produzindo ácido láctico, CO₂, etanol e/ou ácido acético em quantidades equimolares. Na presença de oxigênio ou outros oxidantes, maiores quantidades de acetato podem ser produzidas às custas de lactato ou etanol. Portanto, variações nos produtos finais podem ocorrer. Vários compostos (citrato, malato, tartarato, nitrato, nitrito) podem ser metabolizados e utilizados como fonte de energia ou como aceptores de elétrons. Os lactobacilos foram revistos por Hammes *et al.* (1991) apud Wood e Holzapfel (1995) e por Pot *et al.* (1994) apud Wood e Holzapfel (1995), que apresentaram um levantamento completo sobre o isolamento, ecofisiologia, identificação e aplicações desses microrganismos.

2.3.3- O agrupamento dos lactobacilos

Os lactobacilos podem ser divididos em três grupos, a saber:

- **Grupo A:** Lactobacilos estritamente homofermentativos. Fermentam quase exclusivamente as hexoses, fornecendo ácido láctico pela rota de Embden-Meyerhof-Parnas (glicólise). Os organismos possuem frutose-difosfato-aldolase, mas não possuem fosfoctolase e, portanto, gluconato e pentoses não são fermentados.
- **Grupo B:** Lactobacilos heterofermentativos facultativos: Hexoses são quase exclusivamente fermentadas a ácido láctico pela rota EMP. Os organismos possuem

aldolase e fosfocetolase e, portanto, fermentam pentoses e gluconato. Na presença da glicose, as enzimas da rota do fosfogluconato são inibidas.

- **Grupo C:** Lactobacilos estritamente heterofermentativos. Hexoses são fermentadas pela rota do fosfogluconato fornecendo lactato, etanol (e/ou ácido acético) e CO₂ em quantidades equimolares. Pentoses podem ser fermentadas nessa rota.

Dentro destes três grupos as espécies são arrançadas de acordo com as suas relações filogenéticas. A letra **a** indica a filiação ao grupo do *Lb. delbrueckii*, a letra **b** ao grupo do *Lb. casei-Pediococcus* e a letra **c** ao grupo *Leuconostoc*. Deste modo, a combinação **Aa** define uma espécie estritamente homofermentativa pertencente ao grupo do *Lb. delbrueckii*, **Cb** define que a espécie é estritamente heterofermentativa e pertencente ao grupo do *Lb. casei-Pediococcus*, e assim por diante (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

2.3.3.1 - Lactobacilos estritamente homofermentativos (grupo A)

Este grupo compreende 17 espécies, 11 pertencem ao grupo **Aa** e 6 ao grupo **Ab**. Todos os membros do grupo **Aa** são caracterizados pelo peptidoglicano do tipo Lis-DAsp. Os membros do grupo **Ab** possuem peptidoglicano ou do tipo Lis-DAsp, ou do tipo DAP-direto (Ácido Diamino Pimélico).

No grupo **Aa** existem três subespécies do *Lactobacillus delbrueckii*: *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Intimamente relacionado com esta última espécie está o *Lb. jensenii*, que pode ser distinguido pelo conteúdo de G+C em seu DNA. Um segundo ramo compreende o *Lb. acidophilus* e espécies relacionadas com propriedades fisiológicas similares: *Lb. crispatus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri* e *Lb. johnsonii*. *Lb. helveticus* está intimamente relacionado com *Lb. acidophilus* com respeito à homologia DNA-DNA, características bioquímicas e sequência do rRNA 16S.

Outros organismos estritamente fermentativos do grupo do *Lb. delbrueckii* são *Lb. amylophilus*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. acetotolerans* e *Lb. hamsteri*. As duas últimas espécies podem fermentar pentoses e portanto foram transferidas para o grupo **Ab**.

Lb. aviarius, *Lb. mali*, *Lb. ruminis*, *Lb. salivarius*, *Lb. sharpeae* e *Lb. farciminis* pertencem ao grupo **Ab** e portanto são membros do grupo do *Lb. casei-Pediococcus*.

Os organismos do grupo **A** são encontrados em habitats descritos anteriormente para os lactobacilos. Entretanto, espécies associadas ao ser humano e aos animais predominam neste grupo. *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lb. kefiranoferiens* são importantes para a fermentação de alimentos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

2.3.3.2 - Lactobacilos heterofermentativos facultativos (grupo B)

Duas espécies, *Lb. acetotolerans* e *Lb. hamsteri* constituem o grupo **Ba**, o que significa que filogeneticamente esses organismos pertencem ao grupo do *Lb. delbrueckii*.

O grupo **Bb** contém 15 espécies, 12 possuem Lis-DAsp e três possuem DAP em seus peptidoglicanos. *Lb. bifementans* é caracterizado pela fermentação homoláctica da glicose. Entretanto, dependendo do pH, lactato pode ser metabolizado a etanol, ácido acético, CO₂ e H₂. A utilização de lactato e/ou piruvato é comumente preferida pelos organismos do grupo **Bb**. Por exemplo, *Lb. pentosus*, em condições anaeróbicas, produz acetato e formiato. *Lb. casei* e *Lb. bulgaricus* também produzem acetato e formiato, na presença de citrato, e ainda acetato e CO₂, na presença de oxidantes. Logo, dependendo da composição do meio, do pH ou do potencial de redução, diferentes produtos podem ser observados, especialmente com as espécies do grupo do *Lb. casei-Pediococcus* (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

Lb. casei, *Lb. plantarum* e *Lb. sake* têm sido isolados de vários habitats diferentes. As duas últimas espécies são conhecidas por seu potencial metabólico incomum. *Lb. plantarum* pode reduzir nitrato e demonstrar atividade de pseudo-catalase. *Lb. sake* pode formar lodo e utilizar arginina para a produção de ATP. *Lb. curvatus* é filogeneticamente relacionado ao *Lb. sake* porém não possui essas propriedades incomuns (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

A maioria das espécies do grupo **B** são freqüentemente associadas aos alimentos, e podem realizar ou fermentações controladas (*Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lb. plantarum*) ou causar deterioração, principalmente em alimentos embalados e refrigerados (*Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lb. plantarum*, *Lb. alimentarius*, *Lb. bifementans*, *Lb. homohiochii*) (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

2.3.3.3- Lactobacilos estritamente heterofermentativos (grupo C)

Este grupo compreende 22 espécies, sendo 16 do grupo do *Lb. casei-Pediococcus* (Cb) e 6 do grupo do *Leuconostoc* (Cc). Tal como todas as espécies do grupo *Lb. casei-Pediococcus*, as espécies do grupo Cb possuem um peptidoglicano ou do tipo Lis-DAsp (na maioria dos casos), ou do tipo DAP. A presença de ornitina ao invés de lisina no *Lb. fermentum* e no *Lb. vaginalis* é um marcador taxonômico seguro para identificar estas espécies (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

As espécies *Lb. fructivorans* e *Lb. hilgardii*, caracterizadas por alta tolerância ao etanol, um limitado espectro de carboidratos fermentáveis e pronunciada acidofilia, foram tratadas como “Betabactérias” por ROGOSA (1970) e SHARPE (1979) apud WOOD; HOLZAPFEL (1995). *Lb. suebicus* é a espécie mais tolerante ao etanol e a baixos valores de pH, e fermenta um número maior de carboidratos. O seu genótipo está intimamente relacionado ao *Lb. vaccinostercus* e a presença de peptidoglicano do tipo DAP em ambas as espécies confirma esta observação. Porém, uma relação genotípica não inclui uma relação ecológica, já que o *Lb. vaccinostercus*, além de pouca tolerância ao etanol e a baixos valores de pH, ocorre em esterco de vaca, enquanto o *Lb. suebicus* é encontrado em purês fermentados de maçãs e pêras (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

As “Betabactérias” clássicas *Lb. brevis*, *Lb. buchneri* e *Lb. fermentum* foram isoladas de vários habitats como laticínios, plantas em fermentação, fermento e tratos intestinais de homens e animais. Em geral, essas espécies ocorrem preferencialmente em plantas (grãos, material em decomposição). Por outro lado, *Lb. vaginalis*, *Lb. oris* e *Lb. reuteri* estão preferencialmente associados ao homem e aos animais (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

2.3.4 – O metabolismo dos carboidratos

O metabolismo dos carboidratos pelas bactérias do ácido láctico pode ser classificado como homoláctico ou heteroláctico. A fermentação homoláctica ou glicólise segue a rota de Embden-Meyerhof-Parnas e fornece exclusivamente lactato como produto final. Já a fermentação heteroláctica segue a rota do fosfogluconato fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e CO₂ em quantidades equimolares. Nas bifidobactérias, a fermentação heteroláctica leva à formação somente de acetato e lactato.

As rotas de fermentação dos carboidratos pelas bactérias do ácido láctico são exibidas de maneira simplificada pela Figura 2.5. A fermentação homoláctica, objeto deste estudo, é descrita detalhadamente no Item 2.3.5.

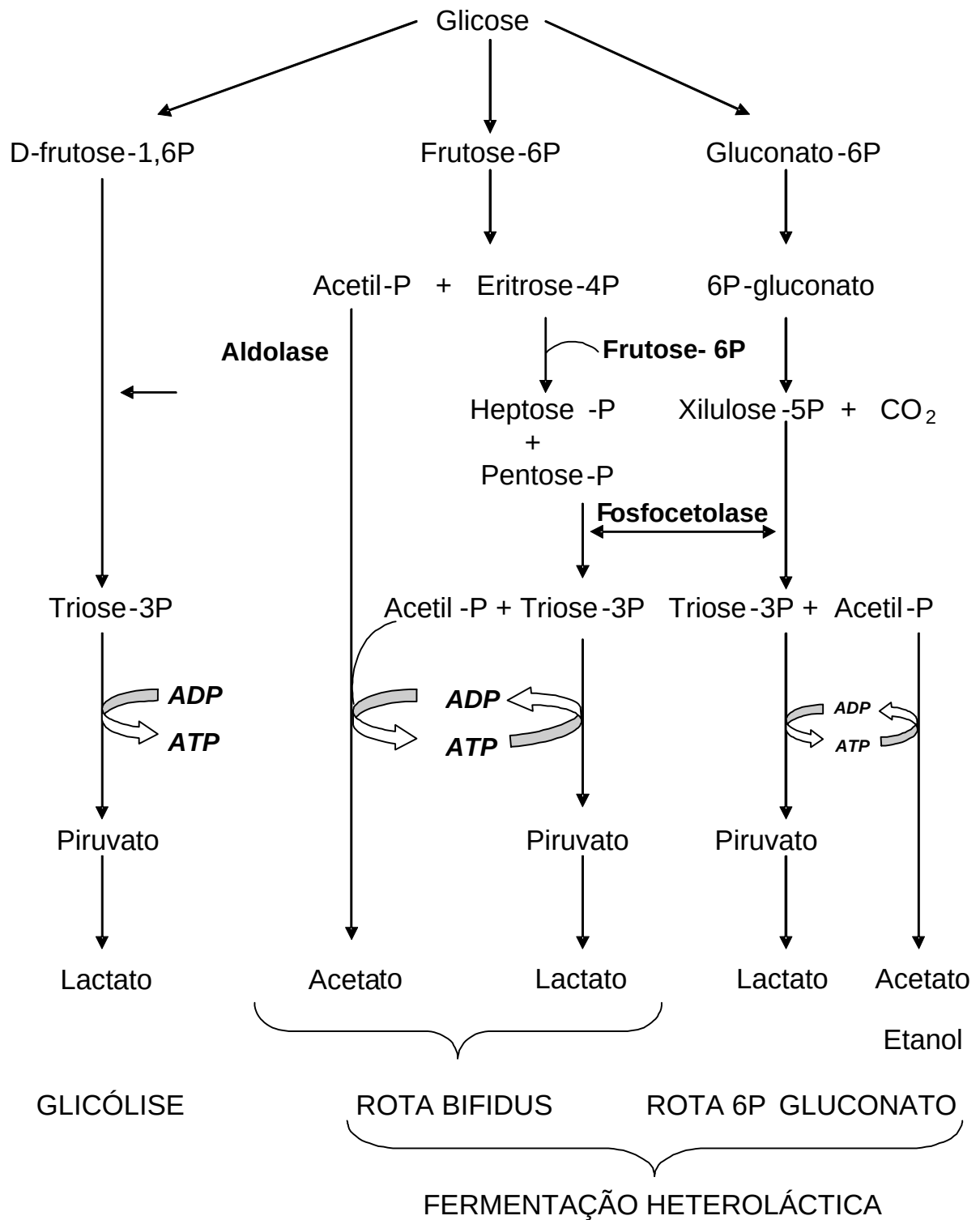


Figura 2.5 – Rotas metabólicas da fermentação da glicose nas bactérias do ácido láctico. As rotas podem ser utilizadas para qualquer hexose metabolizável, com as alterações apropriadas. Adaptado de Wood e Holzapfel (1995).

2.3.5 – A fermentação homoláctica ou glicólise

A fermentação homoláctica, ou glicólise, é a degradação anaeróbica da glicose para produzir o ácido láctico. A glicólise é uma das inúmeras vias catabólicas conhecidas genericamente como *fermentações anaeróbicas*, através das quais muitos organismos extraem energia química de vários combustíveis orgânicos, na ausência do oxigênio molecular. Uma vez que os organismos vivos surgiram primeiramente em uma atmosfera carente de oxigênio, a fermentação anaeróbia é o tipo mais primitivo de mecanismo biológico para a obtenção de energia a partir de moléculas nutrientes. A maioria dos organismos superiores reteve a capacidade para a degradação anaeróbia da glicose até lactato, que se tornou uma via preparatória no catabolismo aeróbico 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).

2.3.5.1 - O primeiro estágio da glicólise

A fosforilação da D-glicose pelo ATP

A fosforilação da D-glicose na posição 6 pelo grupo fosforila do ATP, para produzir D-glicose-6-fosfato, é catalisada pela *hexoquinase* e pela *glucoquinase*, as quais diferem em sua especificidade pelo açúcar e afinidade pela D-glicose. A reação para ambas as enzimas é



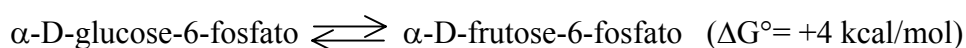
A hexoquinase é a mais amplamente distribuída, sendo a enzima normalmente empregada pela maioria das células. Catalisa a fosforilação não apenas da D-glicose, mas também de muitas outras hexoses e seus derivados, incluindo a D-frutose, a D-manose e a D-glucosamina. A hexoquinase possui uma afinidade mais elevada pelas aldexoses do que pelas cetoxoses.

O segundo tipo de enzima fosforiladora da glicose, a glucoquinase, fosforila apenas a D-glicose, e não age sobre as outras hexoses. Tanto a hexoquinase como a glucoquinase

requerem um cátion bivalente (Mg^{2+} ou Mn^{2+}), que se combina primeiramente com o ATP para formar o substrato verdadeiro, MgATP^{2-} ou MnATP^{2-} (BAILEY; OLLIS, 1986).

Conversão de glucose-6-fosfato a frutose-6-fosfato

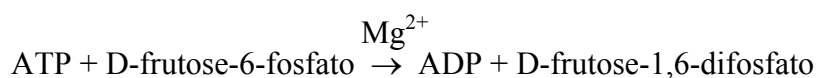
A glucose-fosfato-isomerase é a enzima que catalisa a isomerização da glucose-6-fosfato a frutose-6-fosfato:



A reação se processa facilmente em ambas as direções, sendo também reversível na célula. A glucose-fosfato-isomerase é específica para a glucose-6-fosfato e frutose-6-fosfato.

A fosforilação da D-frutose-6-fosfato a D-frutose-1,6-difosfato

Uma molécula de ATP é requerida para fosforilar a frutose-6-fosfato na posição 1, através da enzima 6-fosfofrutoquinase, produzindo a frutose-1,6-difosfato.



O Mg^{2+} é requerido provavelmente porque o verdadeiro substrato é o MgATP^{2-} . Embora a frutose-6-fosfato seja o receptor específico de fosfato na reação, o UTP (uridina trifosfato) e o ITP (inosina trifosfato) podem substituir o ATP como doadores de fosfato.

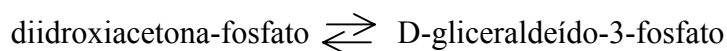
Clivagem da frutose-1,6-difosfato a diidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato

A reação, catalisada pela frutose-difosfato-aldolase, é uma condensação aldólica reversível que produz duas trioses-fosfato diferentes (BAILEY; OLLIS, 1986):



A interconversão das trioses-fosfato

Apenas uma das trioses-fosfato, a gliceraldeído-3-fosfato, pode ser degradada diretamente nas reações posteriores da glicólise. Entretanto a outra, a diidroxiacetona-fosfato, é convertida reversivelmente a gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triose-fosfato-isomerase.

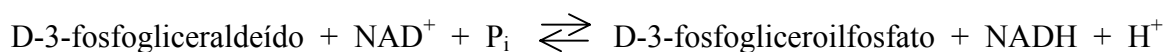


Essa reação completa o primeiro estágio da glicólise, no qual a molécula de glicose foi preparada para o segundo estágio, através de etapas de fosforilação e clivagem (BAILEY; OLLIS, 1986).

2.3.5.2 - O segundo estágio da glicólise

Oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 3-fosfogliceroilfosfato

A enzima que catalisa a reação é a gliceraldeído-fosfato-desidrogenase (ou 3-fosfogliceraldeído-desidrogenase):



O NAD funciona como um transportador de elétrons do doador D-3-fosfogliceraldeído para o piruvato, que é formado posteriormente na sequência glicolítica (LEHNINGER *et al.*, 2002).

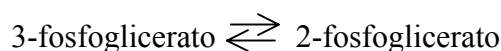
A transferência de fosfato do 3-fosfogliceroilfosfato para o ADP

O 3-fosfogliceroilfosfato formado na reação anterior reage enzimaticamente com o ADP, formando ATP e 3-fosfoglicerato. A reação é catalisada pela fosfoglicerato-quinase (LEHNINGER *et al.*, 2002).



A conversão do 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato

Essa reação é catalisada pela enzima fosfogliceromutase:



O Mg^{2+} é essencial para essa reação, que envolve a transferência do grupo de fosfato da posição 3 para a posição 2 do ácido glicérico (LEHNINGER *et al.*, 2002).

A desidratação do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato

A conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato é a segunda reação da sequência glicolítica na qual se forma um composto de fosfato altamente energético. A reação é catalisada pela *enolase*:



A enolase tem uma absoluta dependência de um cátion bivalente (Mg^{2+} ou Mn^{2+}), o qual forma um complexo com a enzima antes que o substrato se ligue (LEHNINGER *et al.*, 2002).

A transferência de fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP

A transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP, formando piruvato livre, é catalisada pela enzima *piruvato-quinase*:



A reação é altamente exergônica e mostra-se irreversível em condições intracelulares. A enzima requer Mg^{2+} ou Mn^{2+} , com os quais precisa formar um complexo antes de ligar-se ao substrato. O Ca^{2+} compete com o Mg^{2+} ou Mn^{2+} e forma um complexo inativo. A enzima também requer um cátion metálico alcalino, que pode ser K^+ , Rb^+ ou Cs^+ ; o K^+ é o ativador fisiológico. Acredita-se que a ligação com o K^+ provoque uma alteração conformacional na enzima, produzindo uma forma mais ativa. Semelhante à hexoquinase e à 6-fosfofrutoquinase, a piruvato-quinase é inibida sempre que a concentração de ATP na célula for relativamente elevada ou quando estão disponíveis outros combustíveis, tais como ácidos graxos, citrato, acetil-CoA ou alanina. Ela é estimulada quando houver um acúmulo dos intermediários precedentes da glicólise, particularmente a frutose-1,6-difosfato e o fosfoenolpiruvato (LEHNINGER *et al.*, 2002).

A redução do piruvato a lactato

Na última etapa da glicólise, o piruvato é reduzido a lactato às custas dos elétrons doados no início pelo 3-fosfogliceraldeído. Esses elétrons são transportados pelo NADH. A reação é catalisada pela *lactato-desidrogenase*:



O lactato, produto final da sequência glicolítica em condições anaeróbicas, difunde-se através da membrana celular para o meio circundante, como excreção.

Os polissacarídeos de reserva, glicogênio e amido, e outros açúcares simples, além da glicose, são conduzidos para o primeiro estágio da glicólise através das vias alimentadoras catalisadas por enzimas auxiliares, como descrito a seguir (LEHNINGER *et al.*, 2002).

2.3.5.3 – O metabolismo de outros carboidratos na fermentação homoláctica

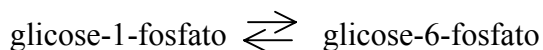
Glicogênio e amido

As unidades D-glicose do glicogênio e do amido entram na sequência glicolítica através da ação sequencial de duas enzimas, a *glicogênio-fosforilase* (ou *amido-fosforilase*, nos vegetais) e a *fosfoglucomutase*. A glicogênio-fosforilase e a amido-fosforilase são enzimas do tipo $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -glucano-fosforilases. Elas catalisam a reação geral:

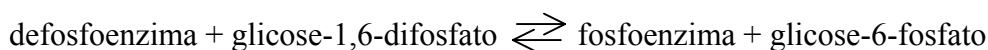
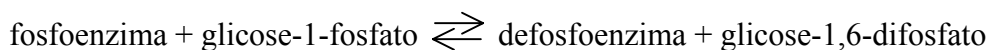


onde $(\text{glicose})_n$ representa a cadeia glucânica e $(\text{glicose})_{n-1}$ a cadeia glucânica diminuída. Nessa reação, a ligação glicosídica terminal $\alpha(1 \rightarrow 4)$ da extremidade não reduzida de uma cadeia lateral do glicogênio sofre *fosforólise*. Assim como a hidrólise faz a clivagem de uma molécula pela introdução dos elementos da água, a fosforólise o faz pela introdução dos componentes do ácido fosfórico. A clivagem da ligação glicosídica resulta na remoção da glicose terminal como glicose-1-fosfato, deixando para trás uma molécula de glicogênio com uma unidade de glicose a menos. A enzima age repetitivamente até que encontre ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$ que não pode atacar, formando assim uma dextrina limite. Essas dextrinas têm suas ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$ rompidas pela amilo-1,6-glucosidase, que dessa forma deixa a cadeia polissacarídica disponível para a ação da glicogênio-fosforilase (LEHNINGER *et al.*, 2002).

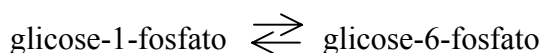
A glicose-1-fosfato formada é convertida em glicose-6-fosfato pela ação da enzima fosfoglucomutase, segundo a reação:



Embora também possa catalisar a conversão de D-manose-1-fosfato a D-manose-6-fosfato, a velocidade dessa reação é de apenas 1% da velocidade de conversão da D-glicose-1-fosfato. A fosfoglicomutase requer não apenas Mg^{2+} , mas também a glicose-1,6-difosfato. Muitas evidências sugerem ser esta última um intermediário na ação da enzima, como mostrado abaixo:

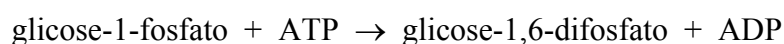


Cuja soma dá:



O papel da glicose-1,6-difosfato na reação da fosfoglucomutase é similar ao do 2,3-difosfoglicerato, na reação da fosfogliceromutase.

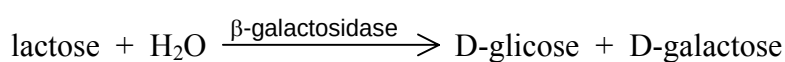
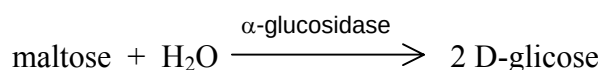
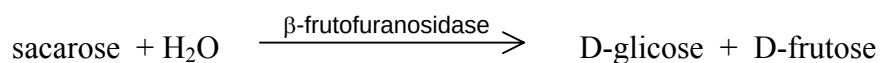
A glicose-1,6-difosfato também pode ser formada pela reação:



que é catalisada pela enzima fosfoglucoquinase (LEHNINGER *et al.*, 2002).

A entrada de dissacarídeos

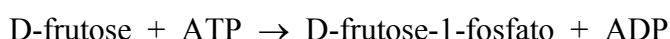
As reações mais importantes são:



Os monossacarídeos formados nessas reações entram na glicólise pelas reações descritas a seguir.

Frutose

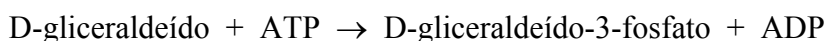
A frutose entra na glicólise pela ação da frutoquinase, que catalisa a fosforilação da frutose no átomo de carbono 1:



A frutose-1-fosfato resultante é clivada pela aldolase:



O D-gliceraldeído livre é fosforilado a gliceraldeído-3-fosfato:



A diidroxiacetona-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato são intermediários na glicólise e degradados posteriormente a lactato (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Galactose

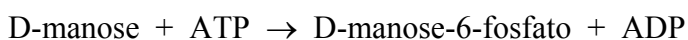
A galactose entra no ciclo glicolítico após fosforilação pela enzima galactoquinase:



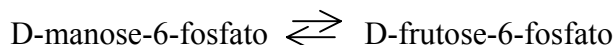
A D-galactose-1-fosfato é convertida a seu epímero do carbono 4, a D-glicose-1-fosfato, mediante uma sequência de reações que requerem como coenzima a uridina-trifosfato (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Manose

A D-manose é fosforilada na posição 6 pela hexoquinase:



A D-manose-6-fosfato é isomerizada reversivelmente a D-frutose-6-fosfato, pela ação da manose-fosfato-isomerase (LEHNINGER *et al.*, 2002):

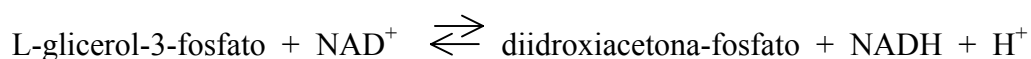


Pentoses

Pentoses também podem entrar no ciclo glicolítico, após fosforilação e conversão a hexose e triose-fosfatos. Glicerol e L-glicerol-3-fosfato, que são derivados dos triacilgliceróis e dos fosfoglicerídeos, também podem ser utilizados. O glicerol livre é fosforilado às custas do ATP pela enzima glicerol-quinase:



O L-glicerol-3-fosfato sofre oxidação a diidroxiacetona-fosfato, ou pela desidrogenase-glicerol-3-fosfato citoplasmática – uma enzima que requer NAD^+ como aceptor de elétrons, ou pela desidrogenase-glicerol-3-fosfato-mitocondrial, uma flavoproteína. A diidroxiacetona-fosfato formada nessas reações pode então ser convertida enzimaticamente a gliceraldeído-3-fosfato para entrar no segundo estágio da glicólise (LEHNINGER *et al.*, 2002).



2.3.6 – Cepas geneticamente modificadas para a produção do ácido láctico

Como visto no Item 2.3.5.2, a última etapa da glicólise consiste na redução do piruvato a lactato, numa reação catalisada pela enzima lactato-desidrogenase. As formas D- e L- do ácido láctico são produzidas pelas enzimas D- e L-lactato-desidrogenase, respectivamente. A conversão metabólica do ácido L(+)-láctico no homem é mais rápida do que a do ácido D(-)-láctico e, portanto, a forma levógira é preferida nas aplicações em alimentos e medicina (LEE *et al.*, 1998). Desse modo, alguns pesquisadores utilizaram a engenharia metabólica para aumentar a produção de L(+)-ácido láctico, em cepas do gênero *Lactobacillus* que produzem ambas as formas, D- e L- (NARAYANAN *et al.*, 2004).

Nikkila *et al.* (2000) promoveram a inativação do gene D-lactato-desidrogenase (*ldhD*) no *Lactobacillus helveticus*. Duas cepas *ldhD* negativas estáveis foram produzidas. Em uma delas ocorreu a deleção da região promotora, prevenindo assim a transcrição do gene

ldhD. Na outra, houve a substituição do gene *ldhD* pelo gene *ldhL*. A atividade da enzima L-lactato-desidrogenase aumentou 53% e 93% respectivamente, em relação à cepa selvagem. As cepas modificadas produziram apenas L(+)-ácido láctico, em quantidade igual ao total de ácido láctico (D- e L-) produzido pela cepa selvagem.

O gene codificador da L-lactato-desidrogenase foi isolado do *Lactobacillus plantarum* e clonado na *Escherichia coli*. Este gene foi seqüenciado e usado para construir isolados de *Lactobacillus plantarum* com superexpressão ou sem expressão de *ldhL*. Um plasmídeo multicópia carregando o gene *ldhL* foi introduzido dentro do *Lactobacillus plantarum* sem modificação do sinal de expressão desse gene. Isto aumentou a atividade da L-lactato-desidrogenase 13 vezes, porém teve efeito discreto na produção de L(+) lactato ou D(-) lactato. Uma deleção cromossomal estável no gene *ldhL* resultou na ausência da atividade da L-lactato-desidrogenase e na produção exclusiva do isômero D(-) lactato (FERAIN *et al.*, 1994).

Em *Lactococcus lactis*, quando o número de cópias do operon *lac* no plasmídeo que carrega o gene *ldhL* foi aumentado, resultou num pequeno incremento na produção de ácido láctico (DAVIDSON *et al.*, 1995).

O gene D-lactato desidrogenase do *Lactobacillus johnsonii* foi isolado, e uma cópia truncada do gene alvo foi usada para inativar a cópia genômica da linhagem selvagem *in vitro*. Para isto uma deleção de 8 pb foi gerada dentro do gene clonado *ldhD* para inativar a sua função. O plasmídeo alterado, carregando o gene *ldhD*, foi transferido para o *Lactobacillus johnsonii* via comobilização conjugativa com o *Lactococcus lactis*. Integrações através de permuta do plasmídeo com o sítio genômico *ldhD* foi selecionado, e transformações bem sucedidas resultaram em mutantes completamente sem atividade da D-lactato desidrogenase. A baixa atividade da L-lactato-desidrogenase restante reconvertiu piruvato a L(+) lactato, com um aumento discreto nos produtos secundários finais acetaldeído, acetoina e diacetila (LAPIERRE *et al.* 1999).

A *Escherichia coli* é um anaeróbio facultativo, que realiza atividade de fermentação mista da glicose-desidrogenase, e não é capaz de crescer em glicose. Entretanto, uma mutação dupla álcool-desidrogenase (*adh*) e fosfotransacetilase (*pta*) foi capaz de crescer anaerobicamente em glicose pela fermentação do lactato produzindo D-lactato e uma pequena quantidade de succinato. Uma mutação adicional no gene codificador da fosfoenolpiruvato carboxilase fez o mutante produzir D-lactato tal como um microrganismo homofermentativo, no qual os produtos principais são formato, acetato, D-lactato, succinato e etanol. Um

mutante *pta⁻*, que não é capaz de sintetizar fosfotransacetilase, responsável pela formação do acetato, não foi capaz de crescer em glicose (NARAYANAN *et al.*, 2004). Um gene L-lactato desidrogenase foi introduzido neste mutante sem o gene D-lactato desidrogenase, o que resultou na formação de L-lactato desidrogenase como o maior produto da fermentação (CHANG *et al.*, 1999).

2.4 – A produção do ácido láctico por fermentação

2.4.1- Introdução

No ano de 2001, das oitenta e seis mil toneladas de ácido láctico produzido em todo o mundo, mais de 90% foi obtido por fermentação. O restante foi produzido sinteticamente, através da hidrólise da lactonitrila (NEXANT CHEMSYSTEMS, 2002).

A produção via fermentação possui algumas vantagens. Algumas cepas podem produzir a forma D- ou L- pura, enquanto a rota química leva sempre à formação de uma mistura racêmica. A fermentação também possibilita a utilização de substratos provenientes de fontes renováveis, como amido e celulose. Vários processos vêm sendo patenteados nos últimos anos, dentre os quais destacam-se: (i) processo contínuo de sacarificação e hidrólise simultâneas do amido de batata, utilizando cinco cepas de lactobacilos, com purificação através da eletrodialise; (ii) uso de material lignocelulósico e cepas recombinantes capazes de fermentar a xilose; (iii) processo contínuo utilizando soro de queijo ultrafiltrado como substrato, com recirculação de células e purificação através de eletrodialise; (iv) utilização do esgoto municipal como substrato; (v) utilização de cepas de *Lb. delbrueckii* tolerantes ao ácido láctico (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

As bactérias utilizadas na fermentação do ácido láctico pertencem aos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus* (*Ent*), *Lactobacillus* (*Lb*), *Lactococcus* (*Lc*), *Leuconostoc* (*Leu*), *Oenococcus*, *Pediococcus* (*Ped*), *Streptococcus* (*Str*), *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Essas bactérias recebem a classificação GRAS (geralmente reconhecidas como seguras), porém algumas cepas de *Streptococcus* são patogênicas (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

Diferentes substratos têm sido utilizados para a produção fermentativa do ácido láctico. A utilização de um carboidrato puro leva à formação de um produto de maior pureza, o que reduz os custos das etapas posteriores de purificação. Entretanto, isto pode tornar a produção economicamente inviável, pois carboidratos puros são caros. Portanto, a utilização de

substratos provenientes de efluentes industriais e rejeitos da agricultura vem sendo intensamente estudada (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

2.4.2- Fontes de carbono

A glicose é o substrato mais utilizado industrialmente para a produção fermentativa do ácido láctico (NEXANT CHEMSYSTEMS, 2002), cuja rota metabólica foi descrita com detalhes no Item 2.3.5. Entretanto, a utilização de outras fontes de carbono de baixo custo estão sendo pesquisadas, dentre as quais pode-se destacar o soro de queijo, o melaço da cana-de-açúcar, o amido e alguns materiais lignocelulósicos (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Na fermentação do soro de queijo, a lactose presente é hidrolisada a glicose e galactose (AMRANE; PRIGENT, 1994). Antes da fermentação, o soro de queijo deve ser desproteinizado e desmineralizado (KRISCHKE *et al.*, 1991). Extrato de levedura, peptona, leite em pó e farelo de soja são utilizados como suplementos (CHIARINI *et al.*, 1992). O microrganismo mais utilizado na fermentação do soro de queijo é o *Lb. bulgaricus*, seguido do *Lb. helveticus* e do *Lb. casei* (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

O melaço proveniente das indústrias de açúcar também pode ser utilizado como substrato na produção fermentativa do ácido láctico. O microrganismo mais utilizado neste caso é o *Lb. delbrueckii* (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Um outro substrato comumente utilizado na fermentação do ácido láctico é o amido (GIRAUD *et al.*, 1994). Antes de ser fermentado pelas bactérias lácticas, o amido deve ser hidrolisado a glicose e maltose. Várias fontes de amido têm sido utilizadas, como trigo, milho, mandioca, batata, arroz, centeio, sorgo e cevada. Geralmente, adicionam-se amilases ao meio para hidrolisar o amido a glicose, que será fermentada a ácido láctico (HOFVENDAHL *et al.*, 1999). Em alguns casos, o amido é utilizado sem tratamento ou gelatinizado, e então fermentado por um microrganismo produtor de amilase, como *Lb. fermentum*, *Lb. amylovorus* ou *Lb. amylophilus* (YUMOTO; IKEDA, 1995; CHATTERJEE *et al.*, 1997). Há também a possibilidade do amido ser degradado por um microrganismo produtor de amilase, e a glicose assim obtida ser fermentada a ácido láctico por outro microrganismo. Kurosawa *et al* (1988) realizou um estudo no qual o *Aspergillus awamori* foi utilizado como produtor de amilase e o *Lc. lactis* como produtor de ácido láctico.

Em todos os casos mencionados acima, as reações de hidrólise do amido são conduzidas simultaneamente com a fermentação, em um processo denominado SSF -

Simultaneous Saccharification and Fermentation. Entretanto, existe a possibilidade de se usar o amido pré-hidrolisado como substrato (AKERBERG *et al.*, 1998). Esta é uma boa alternativa quando a enzima de sacarificação e a cepa possuem diferentes valores de pH e temperatura ideais. Um exemplo desse caso é o estudo da produção do ácido láctico pelo *Lc. lactis*, realizado por Hofvendahl e Hahn-Hagerdal (1997). A sacarificação do amido foi realizada pelas enzimas α - e glucoamilase, além de proteases, à 55°C e pH 5, enquanto a fermentação foi conduzida à 30°C e pH 6. Os processos de sacarificação e fermentação simultâneos e em separado são ilustrados na Figura 2.6.

O amido é frequentemente suplementado com peptona ou extrato de levedura (ZHANG; CHERYAN, 1991). As bactérias utilizadas incluem *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lc. Lactis* (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

De modo similar ao amido, materiais lignocelulósicos também podem ser utilizados como substratos na produção do ácido láctico. Esses materiais consistem principalmente de glicose, galactose, manose, xilose e arabinose, e devem ser hidrolisados para tornarem-se fermentáveis. O processo SSF da celulose vem sendo estudado com *Lb. delbrueckii* (ABE; TAKAGI, 1991) e *Lb. rhamnosus* (PARAJÓ *et al.*, 1997).

A comparação dos resultados de diversas fermentações empregando diferentes fontes de carbono é exibida na Tabela 2.4. Segundo Hofvendahl e Hahn-Hagerdal (2000), a utilização de glicose ou de amido hidrolizado resultou em maiores concentrações de ácido láctico em relação aos outros açúcares. Para o *Lb. delbrueckii*, a utilização simultânea de glicose e frutose foi mais efetiva do que a utilização somente da glicose. Para o *Lb. rhamnosus* aconteceu o oposto.

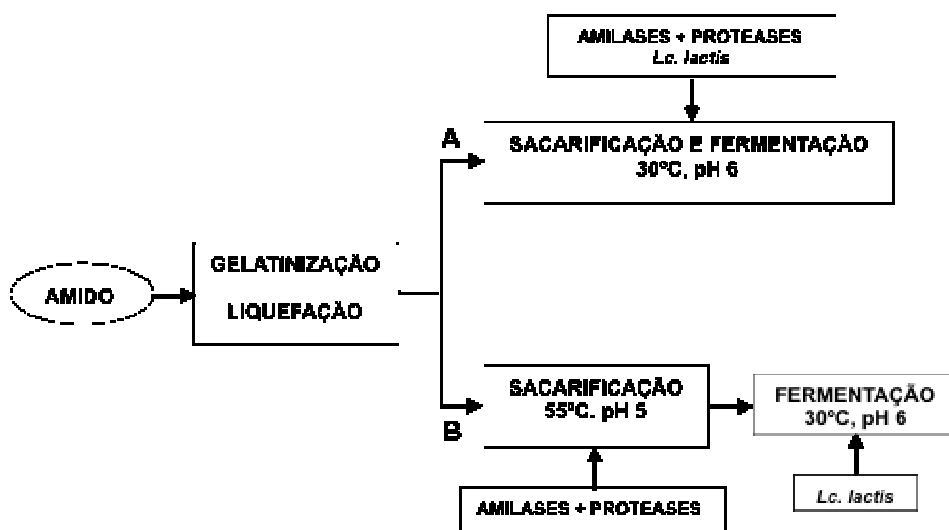


Figura 2.6 - Produção do ácido láctico a partir do amido em processo de sacarificação e fermentação simultâneas (A) e em separado (B).

Tabela 2.4 - Influência da fonte de carbono sobre a produção de ácido láctico.

Microrganismo	Substrato	AL g/L	Y _{AL/tot} g/g	Q _v g/(Lh)
<i>Lb. amylophilus</i> ATCC 49845	glicose	21	0,95	1,6
	amido hidrolisado de milho	33	0,73	0,88
<i>Lb. amylovorus</i> ATCC 33620	amido de mandioca	4,8	0,48	0,69
	amido de milho	10	1,0	1,2
	amido de batata	4,2	0,42	0,14
	amido de arroz	7,9	0,79	0,86
	amido de trigo	7,8	0,78	1,2
	amido de milho	45	0,82	8,6
<i>Lb. amylovorus</i> ATCC 33622	amido de milho	45	0,82	8,6
	amido de milho liquefeito	55	1,0	20
<i>Lb. casei</i> NRRL B-441	amido liq. de cevada + glucoam.	112	0,68	
	amido liq. de cevada + glucoam. + alfa.	162	0,87	
<i>Lb. casei</i> NRRL B-441 +	farinha de cevada	36	0,20	1,1
<i>Lb. amylovorus</i> NRRL B-4542	farinha de cevada + glucoam.	114	0,63	2,0
<i>Lb. delbrueckii</i> IFO 3534	jornal hidrolisado	24	0,48	0,85
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> CBS 743.84	glicose	35	0,85	
	lactose	37	0,82	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 369	glicose	56	2,8	
	celobiose	32	1,6	
	xilose	41	2,1	
	glicose	87	0,87	5,5
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>delbrueckii</i>	frutose + glicose	94	0,94	5,5
	sacarose	85	0,85	6,2
	glicose	58	0,85	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>delbrueckii</i> ATCC 9649	glicose	58	0,85	
	lactose	40	0,75	
<i>Lb. DSM</i> 20605 MONT4, plasmid X1 + XK + reg	xilose	14	0,70	
	xilose + glicose	11	0,55	
	glicose	18	0,36	4,2
<i>Lb. helveticus</i> sp. <i>milano</i>	maltose	42	0,84	5,0
	glicose	95	0,95	5,6
<i>Lb. paracasei</i> No 8	sorgo doce	91	0,91	10

continua

continuação

Microrganismo	Substrato	AL	Y _{AL/tot}	Q _v
		g/L	g/g	g/(Lh)
<i>Lb. pentosus</i>	glicose	46	0,92	2,4
	xilose	27	0,54	0,59
	glicose + xilose	90	1,8	4,0
	madeira hidrolisada	40	0,70	1,3
<i>Lb. pentosus</i> NRRL B-227	glicose	6,0	0,60	
	galactose	7,4	0,74	
	manose	6,8	0,68	
	celulose hidrolisada		0,51	
<i>Lb. pentosus</i> NRRL B-473	glicose	6,9	0,69	
	galactose	5,9	0,59	
	manose	7,4	0,74	
	xilose	1,4	0,14	
	celulose hidrolisada		0,43	
<i>Lb. plantarum</i>	amido solúvel hidrolisado	15	0,30	
	amido hidrolisado de tapioca	15	0,30	
	farinha hidrolisada de tapioca	17	0,35	
<i>Lb. plantarum</i> NRRL B-531	glicose	5,4	0,54	
	manose	5,7	0,57	
	celulose hidrolisada		0,43	
<i>Lb. plantarum</i> NRRL B-787	glicose	6,2	0,62	
	galactose	4,0	0,40	
	manose	6,6	0,66	
	celulose hidrolisada		0,42	
<i>Lb. plantarum</i> NRRL B-788	glicose	6,0	0,60	
	galactose	4,9	0,49	
	celulose hidrolisada		0,46	
<i>Lb. plantarum</i> NRRL B-813	glicose	7,3	0,73	
	galactose	4,7	0,47	
	manose	8,3	0,83	
	celulose hidrolisada		0,43	
<i>Lb. plantarum</i> USDA 422	glicose	5,2	0,52	
	galactose	3,1	0,31	
	manose	6,2	0,62	
	xilose	1,3	0,13	

continua

continuação

Microrganismo	Substrato	AL	Y _{AL/tot}	Q _v
		g/L	g/g	g/(Lh)
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	glicose	17	0,86	
	frutose	14	0,71	
	glicose + frutose	16	0,81	
	sacarose	15	0,73	
	alfa-celulose	45		0,96
	celulose de grama	28		0,50
LBM5 = mix of 5 <i>Lb</i> strains	glicose	99	0,90	
	amido	90	0,82	
<i>Lb. lactis</i> IO-1 JCM 7683	xilose	23	0,45	0,30
	xilose + glicose	28	0,70	2,2
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 13673	glicose	36	1,0	3,6
	xilose	13	0,42	0,37
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	glicose	4,9	0,86	2,5
	maltose	3,2	0,70	1,0
	farinha hidr de trigo, 3 µL enz/g amido	75	0,78	1,2
	farinha hidr de trigo, 5 µL enz/g amido	75	0,83	0,85
	farinha hidr de trigo, 6 µL enz/g amido	90	0,98	1,5
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> NRRL B-4449	glicose	6,6	0,66	
	galactose	2,8	0,28	
	manose	5,8	0,58	
	xilose	1,8	0,18	
	celulose hidrolisada		0,16	

Abreviações: AL = ácido láctico; Y_{AL/tot} = total de ácido láctico produzido / massa inicial de substrato; Q_v = produtividade volumétrica (g AL/L.h); hidr = hidrolisado(a); liq = liquefeito; glucoam = glucoamilase; alfa = alfa-amilase; X1 = codificação do gene da xilose isomerase; XK = codificação do gene da xiluloquinase; reg = gene regulador *xy/R*; enz = enzima.

Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.3- Fontes de nitrogênio

A adição de nutrientes geralmente leva a uma melhora significativa dos processos fermentativos. A Tabela 2.5 traz um estudo comparativo da influência de diversos nutrientes na síntese do ácido láctico por fermentação. Segundo Hofvendahl e Hahn-Hagerdal (2000), o tratamento do soro de queijo e a adição de extrato de levedura melhoraram sensivelmente a produtividade das fermentações. Além disso, o meio MRS (DIFCO 0881), que contém extrato

de levedura, peptona e extrato de carne, foi superior ao meio suplementado apenas com extrato de levedura, que por sua vez foi superior ao meio que continha apenas extrato de malte. Estas observações estão de acordo com os trabalhos publicados por Amrane e Prigent (1997) e Wood e Holzapfel (1995), nos quais são relatadas as complexas exigências nutricionais do gênero *Lactobacillus*, principalmente em relação às fontes de nitrogênio e aos fatores de crescimento.

Tabela 2.5 - Influência da fonte de nitrogênio sobre a produção do ácido láctico.

Microrganismo	Substrato	Nutrientes	AL g/L	Y _{AL/tot} g/g	Q _v g/(Lh)
<i>Lactobacterium delbrueckii</i> <i>sowjeskii</i>	sacarose	20% ext leved	21	1,1	1,0
	sacarose	1% ext leved + 0,5% pep	18	0,90	0,83
<i>Lb. Acidophilus</i> R	soro de queijo		13	0,22	
	soro de queijo	ext leved	20	0,34	
<i>Lb. casei</i> NRRL B-441	glicose	brotos de malte	93	0,93	2,3
	glicose	ext leved	96	0,96	3,9
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	farinha hidr de trigo, SSF		18	0,11	0,56
	farinha hidr de trigo, SSF	ext leved	26	0,18	0,9
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>delbrueckii</i> ATCC 9649	glicose	MRS + 1% ext leved	58	0,48	0,72
	glicose	MRS + 3% ext leved	67	0,56	1,4
	farinha hidr de trigo, SSF		106	0,82	1,6
	farinha hidr de trigo, SSF	ext leved	109	0,91	3,6
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 12315	batata hidrolisada		100	1,0	
	resíduo de batata hidrolisada	AMM	93	0,78	
<i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009	lactose	MRS	17	0,38	
	soro de queijo		8,9	0,20	

continua

continuação

Microrganismo	Substrato	Nutrientes	AL g/L	Y _{AL/tot} g/g	Q _v g/(Lh)
<i>Lb. helveticus</i> Milano	permeado de soro de queijo	ext leved	36	0,75	5,8
	permeado de soro de queijo	ext leved alta conc	36	0,75	9,4
	permeado soro de queijo	ext leved + pep	40	0,83	12
<i>Lb. helveticus</i> sp. milano	soro de queijo hidr	ext leved	44		5,5
	soro de queijo hidr e clarificado	AMM	41		4,4
	soro de queijo UF	AMM	37		2,7
<i>Lb. IMET</i> 11466	glicose	MRS	93	0,95	
	ext leved hidr	5% MRS	92	0,92	
<i>Lb. kefir</i>	soro de queijo		9,8	0,20	
	soro de queijo	ext leved	14	0,28	
<i>Lb. paracasei</i> No 8	sorgo doce		106	0,79	10
	sorgo doce	ext leved + pep	91	0,91	10
<i>Lb. Pentosus</i>	glicose	ext leved	45	0,90	2,3
	glicose	MRS	46	0,92	2,4
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917	sorgo	5% suco de ervilhaca			2,2
	sorgo	15% suco de ervilhaca			2,0
	sorgo	25% suco de ervilhaca			2,8
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	melaço hidr, SSF		16	0,81	
	melaço hidr, SSF	ext leved + pep	14	0,70	
	glicose	0,25% ext leved + 0,5% triptona	57	0,81	
	glicose	0,5% ext leved + 1% triptona	58	0,95	
	madeira hidrolisada	ext leved + pep	27	0,96	2,3
	madeira hidrolisada, SSF	ext leved + pep	29	1,0	1,5
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 11443	glicose	0,4% ext leved	53	0,66	2,8
	glicose	0,8% ext leved	53	0,66	3,7
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	glicose		25	0,83	0,2
	glicose	0,2% ext leved	34	1,1	0,5
	glicose	1% ext leved	26	0,81	2,6

continua

continuação

Microrganismo	Substrato	Nutrientes	AL g/L	Y _{AL/tot} g/g	Q _v g/(Lh)
<i>Lb. salivarius</i> sp. <i>salivarius</i> ATCC 11742	soja		4,2	0,76	
	melaço de soja	ext leved	5,5	0,85	
<i>Lb. lactis</i> IFO 12007 + <i>Aspergillus awamori</i> IFO 4033	amido de batata		25	0,50	0,72
	amido de batata	ext leved + triptona	10	0,20	0,43
<i>Lb. lactis</i> JO-1 JCM 7638	glicose, alimentação contínuoínua		28	0,56	2,0
<i>Lb. lactis</i> IO-1 JCM 7683	glicose	0,3% ext leved	24	0,96	1,2
	glicose	0,5% ext leved	37	0,74	2,1
	glicose	1% ext leved	43	0,86	2,3
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> AS211	farinha hidr de trigo, SSF		95	0,77	1,7
	farinha hidr de trigo, SSF	ext leved	107	0,91	2,4
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	farinha hidr de trigo, SSF		96	0,76	3,0
	farinha hidr de trigo, SSF	ext leved	106	0,88	3,3
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	farinha hidr de trigo, SSF		90	0,98	1,5
	farinha hidr de trigo, SSF	ext leved	87	0,96	3,3
	farinha de trigo + glicose		75	1,0	2,1
	farinha de trigo				
	farinha hidr de trigo		80	1,0	
	farinha hidr de trigo + protease		43		1,5
	farinha hidr de trigo + protease	vitaminas	46		2,4
	farinha hidr de trigo + protease	aminoácidos	53		2,8

Abreviações como na Tabela 2.4 e: ext leved = extrato de levedura; pep = peptona; AMM = água de maceração de milho; SSF = sacarificação e fermentação simultâneas; UF = ultrafiltrado.

Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.4- Processos contínuos e descontínuos

O ácido láctico é geralmente produzido em batelada, porém vários outros processos são utilizados, como batelada alimentada e processos semicontínuos (Tabela 2.6). Segundo Hofvendahl e Hahn-Hagerdal (2000), o processo em batelada leva a maiores concentrações de produto na maioria dos casos, pois há um consumo praticamente total do substrato, enquanto que nos processos contínuos permanece uma concentração residual. Por outro lado, o processo contínuo geralmente leva a maiores produtividades, principalmente se conduzidos em altas taxas de diluição.

Tabela 2.6 - Influência do modo de fermentação sobre a produção do ácido láctico.

Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	AL g/L	$Y_{AL/tot}$ g/g	Q_v g/(Lh)
<i>Ent. faecium</i>	batelada	alfafa	27	0,91	
	semicontínuo	alfafa	30	0,99	
<i>Lb. casei</i> L100	batelada, imob.	amido de milho	50	0,83	
	contínuo, imob.	amido de milho	40	0,67	
<i>Lb. casei</i> SU No 22	batelada	soro de queijo	22	0,44	
	batelada alim	soro de queijo	45	0,45	
<i>Lb. delbrueckii</i> IFO 3534	batelada	glicose	83	0,83	1,5
	contínuo	glicose	55	0,55	5,3
<i>Lb. delbrueckii</i> MIX several strains	batelada	milho hidr + cevada	85	0,87	
	contínuo	milho hidr + cevada	71	0,73	
<i>Lb. delbrueckii</i> NCIM-2365	batelada, imob	glicose	90	0,90	
	contínuo, imob	glicose	75	0,75	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>Bulgaricus</i>	batelada	soro de queijo	44	0,95	
	contínuo	soro de queijo	13	0,28	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	batelada, imob	soro de queijo	50	1,0	0,65
	contínuo, imob	soro de queijo	9,5	0,19	12
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> Ch H 2217	batelada	soro de queijo	115	0,86	
	contínuo	soro de queijo	117	0,87	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NRRL B-548	batelada	lactose	45	0,90	11
	contínuo	lactose	39	0,78	2,2

continua

continuação

Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	AL g/L	Y_{AL/tot} g/g	Q_v g/(Lh)
<i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009	batelada	soro de queijo	49	1,1	1,3
	contínuo	soro de queijo	48	1,2	2,7
<i>Lb. helveticus</i> L89	batelada	soro de queijo			3,1
	contínuo, imob	soro de queijo			29
<i>Lb. helveticus</i> NCDO 1844	batelada, dial	soro de queijo	47	1,2	
	contínuo, dial	soro de queijo	125	3,1	
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	batelada	sacarose	77	0,73	1,7
	contínuo, extração	sacarose	80	0,74	8,0
	batelada	glicose	80	0,89	5,1
	contínuo, recirc, extração	glicose	47	0,48	4,2
	batelada	glicose	38	0,76	
	contínuo	glicose	10	0,20	
<i>Lb. lactis</i> 65.1	batelada	glicose	39	0,75	
	contínuo	glicose	28	0,56	
<i>Lb. lactis</i> IFO 12007	batelada, imob	amido de batata	25	0,50	0,72
	contínuo, imob	amido de batata	10	0,20	0,43
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	batelada, extração	glicose	0,29	0,30	
	batelada repetida, extração	glicose	0,50	0,40	
<i>Str. thermophilus</i>	batelada	lactose	40		7,1
	batelada alim	lactose	39		1,4

Abreviações como na Tabela 2.5 e: dial = eletrodialise; imob = células imobilizadas; alim = alimentada. Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.5- Imobilização e recirculação de células

As bactérias do ácido láctico podem ser recirculadas ou imobilizadas em suportes sólidos para se aumentar a densidade celular do meio. A imobilização de células não tem contribuído para aumentar a concentração e a produtividade do ácido láctico (KAUFMAN *et al.*, 1996). Por outro lado, a recirculação aumenta sensivelmente a concentração de produto, assim como o rendimento das fermentações (ISHIZAKI; VONKTAVEESUK, 1996; YOO *et al.*, 1997). Alguns resultados sobre os efeitos da imobilização e da recirculação de células são exibidos na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 - Influência da recirculação de células sobre a produção de ácido láctico.

Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	AL g/L	$Y_{AL/tot}$ g/g	Q_v g/(Lh)
<i>Lb. casei</i>	contínuo, imob	soro de queijo	22	0,44	7,3
	contínuo, imob, recirc	soro de queijo	28	0,57	9,4
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	contínuo	glicose	26	0,65	
	contínuo, recirc	glicose	32	0,80	
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	contínuo	glicose	17	0,68	5,1
	contínuo, recirc	glicose	47	0,48	4,2
<i>Lb. lactis</i> IO-1 JCM 7683	contínuo	glicose	27	0,54	3,4
	contínuo, recirc	glicose	45	0,90	10

Abreviações como na Tabela 2.6 e: recirc = recirculação de células.

Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.6- pH

O pH pode ser ajustado no início da fermentação e em seguida mantido sem controle, decrescendo à medida que o ácido é formado, ou pode ser controlado durante o processo, pela adição de uma base ou pela extração do ácido. O controle do pH leva a melhores resultados do que as fermentações não controladas, como pode ser observado na Tabela 2.8. Segundo Kanshket (1987), o pH ótimo para as bactérias do ácido láctico varia entre 5,0 e 7,0.

Tabela 2.8 - Influência do pH inicial e do controle do pH na produção do ácido láctico.

Microrganismo	Substrato	pH inicial	Controle do pH	AL g/L	$Y_{AL/tot}$ g/g	Q_v g/(Lh)
<i>Ent. faecium</i>	alfafa	6,2	não	8,3	0,27	
	alfafa	5,8	NH ₄ OH	27	0,90	
<i>Lb. amylophilus</i> ATCC 49845	glicose	5,4	titr NaOH			0,70
	glicose	6,0	titr NaOH			1,6
	glicose	6,5	titr NaOH			1,2
	glicose	7,1	titr NaOH			1,0
	glicose	7,8	titr NaOH			0,90
	glicose	4,2	NaOH	10	0,12	1,0
<i>Lb. delbrueckii</i> IAM 1928	glicose	6,2	NaOH	36	0,42	6,5
	glicose	6,2	não, extração	27	0,32	2,9

continua

continuação

Microrganismo	Substrato	pH inicial	Controle do pH	AL g/L	Y _{AL/tot} g/g	Q _v g/(Lh)
<i>Lb. delbrueckii</i> IFO 3534	glicose		não	5,6	0,06	2,3
	glicose		CaCO ₃	55	0,55	5,3
	glicose	5,5	titr, dial	53	0,53	5,3
	glicose	5,0	titr NaOH	81	0,79	2,4
	glicose	5,5	titr NaOH	92	0,89	1,9
	glicose	5,5	titr, dial	88	0,81	4,3
	glicose	6,0	titr NaOH	81	0,78	4,5
	glicose	6,5	titr NaOH	54	0,52	1,5
	glicose	7,0	titr NaOH	49	0,47	1,4
	celulose	4,2	CaCO ₃	15	0,30	
	celulose	5,0	CaCO ₃	26	0,52	
	celulose	5,9	CaCO ₃	18	0,36	
<i>Lb. delbrueckii</i> MIX várias cepas	milho hidr + cevada	5,0	Na ₂ CO ₃	59	0,61	
	milho hidr + cevada	5,5	Na ₂ CO ₃	87	0,90	
	milho hidr + cevada	5,8	Na ₂ CO ₃	85	0,87	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	sorgo	5,5	NH ₃			3,5
	sorgo	6,0	NH ₃			4,5
	sorgo	6,5	NH ₃			2,3
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 55163	soro de queijo	5,4	NH ₄ OH	35	0,45	
	soro de queijo	6,0	NH ₄ OH	50	0,64	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 369	soro de queijo	3,5	não	25	0,48	
	soro de queijo	4,5	não	25	0,48	
	soro de queijo	5,5	não	31	0,60	
	soro de queijo	6,5	não	35	0,67	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NRRL B-548	lactose	4,5	titr NH ₄ OH	25	0,50	0,68
	lactose	5,0	titr NH ₄ OH	45	0,90	3,1
	lactose	5,6	titr NH ₄ OH	45	0,90	11
	celulose	4,2	NH ₄ OH	27	0,27	0,23
	celulose	5,0	NH ₄ OH	52	0,58	0,43
	celulose	5,8	NH ₄ OH	33	0,33	

continua

continuação

Microrganismo	Substrato	pH inicial	Controle do pH	AL g/L	Y _{AL/tot} g/g	Q _v g/(Lh)
<i>Lb. helveticus</i> NCDO 1844	soro de queijo	5,6	titr NaOH	31	0,78	1,3
	soro de queijo	5,6	titr NaOH, dial	47	1,2	1,1
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917	sorgo	5,5	NH ₃			2,1
	sorgo	6,0	NH ₃			2,0
	sorgo	6,5	NH ₃			2,8
	sorgo	7,0	NH ₃			5,1
	sorgo	7,5	NH ₃			1,9
	sorgo	7,5	NH ₃			1,9
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	sacarose	6,0	titr NaOH	77	0,73	1,7
	sacarose	6,0	titr NaOH, dial	80	0,74	8,0
	glicose	5,0	NaOH	65	0,65	2,3
	glicose	5,5	NaOH	78	0,78	3,9
	glicose	6,0	NaOH	79	0,79	4,9
	glicose	6,5	NaOH	78	0,78	4,9
	glicose	4,2	sim	25	0,91	2,5
	glicose	4,2	sim, extração	19	0,79	0,91
	glicose	6,0	NH ₄ OH	71		1,3
	glicose	6,0	extração	77		5,4
	celulose	4,3	NH ₄ OH	45		0,31
	celulose	4,3	NH ₄ OH, extração	28		0,96
	glicose	5,5	NH ₄			16
	glicose	6,3	NH ₄			23
	glicose	7,5	NH ₄			17
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	glicose	6,2	não	7,5	0,21	0,30
	glicose	6,2	CaCO ₃	26	0,81	2,6
<i>Lb. salivarius</i> sp. <i>salivarius</i> ATCC 11742	melaço de soja	5,6	titr NaOH	5,5	0,85	
	melaço de soja	6,0	titr NaOH	5,4	0,79	
	melaço de soja	6,4	titr NaOH	4,9	0,82	
<i>Lb. lactis</i> 65.1	glicose	6,5	não	5,1	1,0	
	glicose	6,5	não, extração	5,7	1,1	
	glicose	6,5	não	3,5	0,18	0,87
	glicose	6,5	NaOH	19	0,81	1,7
	glicose	6,5	não, extração	14	0,70	10

continua

continuação

Microrganismo	Substrato	pH inicial	Controle do pH	AL g/L	$Y_{AL/tot}$ g/g	Q_v g/(Lh)
<i>Lb. lactis</i> IO-1 JCM 7683	glicose	6,0	NaOH	45	0,90	15
	glicose	6,0	NaOH, dial	35	0,70	3,0
	glicose	6,0	sim	60	0,80	4,0
	glicose	6,0	sim, dial	66	0,88	2,4
	glicose	6,0	não, dial	60	0,75	5,1
	glicose	6,0	NaOH, dial	60	0,75	
	glicose	6,0	NaOH	50	0,85	
	glicose	6,0	NaOH, dial	62	0,88	
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	glicose	5,0	titr NaOH	5,4	0,92	1,7
	glicose	5,8	titr NaOH	5,3	0,90	3,4
	glicose	6,5	titr NaOH	4,9	0,86	2,5
	maltose	5,0	titr NaOH	5,1	1,0	0,37
	maltose	5,8	titr NaOH	4,2	0,82	1,2
	maltose	6,5	titr NaOH	3,2	0,70	1,0
	farinha hidr de trigo	6,0	não	3,3	0,02	0,47
	farinha hidr de trigo	6,0	NaOH	96	0,76	3,0
	farinha hidr de trigo	4,0	titr NaOH	7,0	0,41	0,23
	farinha hidr de trigo	5,0	titr NaOH	20	0,11	0,42
	farinha hidr de trigo	6,0	titr NaOH	105	0,58	2,9
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CNRZ 2125	lactose + citrato	5,0	titr NaOH	7,0	0,13	0,83
	lactose + citrato	5,5	titr NaOH	37	0,71	1,9
	lactose + citrato	6,0	titr NaOH	37	0,71	4,5
	lactose + citrato	6,5	titr NaOH	38	0,73	7,7

Abreviações como na Tabela 2.7 e: titr = titulação.

Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.7- Temperatura

Há poucos estudos sobre o efeito da temperatura na produção de ácido láctico. Como pode ser visto na Tabela 2.9, a temperatura na qual se atinge a máxima concentração de produto (g/L) pode ser diferente daquela onde a produtividade é máxima (g/L·h). Para o *Lb. amylophilus*, por exemplo, Hofvendahl e Hahn-Hagerdal (2000) relataram que a máxima concentração foi atingida à 35°C, enquanto que a máxima produtividade ocorreu à 25°C.

Tabela 2.9 - Influência da temperatura sobre a produção do ácido láctico.

Microrganismo	Temp °C	Substrato	AL g/L	Y _{AL/tot} g/g	Q _v g/L.h
<i>Lb. amylophilus</i> ATCC 49845	25	amido	26	0,52	0,54
	28	amido	29	0,58	0,44
	35	amido	30	0,60	0,33
<i>Lb. casei</i> NRRL B-441	30	glicose	80	0,89	3,2
	37	glicose	80	0,89	5,6
	41	glicose	82	0,91	5,6
	45	glicose	42	0,47	1,2
	37	amido hidr cevada	140	0,98	
<i>Lb. paracasei</i> No 8	41	amido hidr cevada	117	0,82	
	30	sorgo doce			1,5
	36	sorgo doce			1,9
	44	sorgo doce			2,2
	30	glicose	67	0,74	3,3
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	37	glicose	70	0,78	3,3
	41	glicose	68	0,76	3,5
	45	glicose	75	0,83	3,3
	30	glicose	4,9	0,86	2,5
<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	35	glicose	5,2	0,88	2,9
	37	glicose	5,2	0,88	1,8
	40	glicose	1,2	0,20	
	30	maltose	3,2	0,70	1,0
	35	maltose	3,7	0,73	1,2
	37	maltose	4,0	0,80	1,1
	30	glicose	60	1,3	2,2
	34	glicose	65	1,5	2,8
	37	glicose	60	1,5	2,3
	40	glicose	50	1,2	1,5

Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.8- Formação de subprodutos

Na produção fermentativa do ácido láctico pode haver a formação de subprodutos como ácido acético, etanol, ácido fórmico e dióxido de carbono, dependendo da cepa utilizada e das condições do processo (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Uma produção industrial eficiente deve evitar ou minimizar a formação desses subprodutos. A Tabela 2.10 mostra o efeito de vários parâmetros de processo sobre a formação dessas substâncias. Os processos em batelada apresentaram uma maior eficiência do que os demais. Tal eficiência torna-se ainda maior quando a fermentação é anaeróbia.

As diferentes fontes de carbono podem levar a diferentes percentuais de subprodutos. Para o *Lc. lactis*, Hofvendahl e Hahn-Hagerdal (2000) mostraram que a utilização da maltose produziu 67% de ácido láctico, enquanto que a utilização da glicose elevou esse percentual

para 93%. Segundo estes autores, a utilização de pentoses resultou em maiores formações de ácido acético e etanol, conseqüentemente diminuindo a produção de ácido láctico.

Tabela 2.10 - Efeito dos parâmetros do processo sobre a formação de subprodutos.

Parâmetro estudado	Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	Substrato (g/L) + Nutrientes	pH ou T (°C)	AL g/L	Hac g/L	EtOH g/L	Hfo g/L	AL/tot g/g
carbon + nutr	Lb. IMET 11466	batelada	glicose	centeio hydr + 1/20 MRS		92	traço			
		batelada	glicose	MRS		93	0			1,0
carbon	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	batelada alim, recirc	alfa-celulose			45	1,0			0,98
		batelada alim, recirc	celulose de grama			28	0,5			0,98
	<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 49435	batelada	glicose			4,9	0,10	0,065	0,20	0,93
		batelada	maltose			3,2	0,49	0,36	0,72	0,67
conc	<i>Lb. amylophilus</i> ATCC 49845	batelada	amido	50		29	0	0	0	1,0
		batelada	amido	70		45	0	0	0	1,0
		batelada	amido	100		53	0	0	0	1,0
	<i>Lb. lactis</i> IO-1 JCM 7683	batelada	xilose	29		12	9,1			0,57
		batelada	xilose	49		25	9,7			0,72
		batelada	xilose	130		22	7,9			0,74
		batelada	xilose	160		27	7,3			0,70
	<i>Lb. helveticus</i>	contínuo	lactose	37		35	1,0		presente	
		contínuo	lactose	127		48	1,5		presente	
nutr	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	batelada	amido	farinha hydr de trigo		18		10	0,64	18
		batelada	amido	farinha hydr de trigo + ext leved		26			15	0,63
nutr, O ₂	<i>Lb. plantarum</i> H4	batelada, aer	glicose + citrato			3,2	3,1			0,51
		batelada, aer	glicose + citrato	NaCl 6%		4,2	1,7			0,71
		batelada, aer	glicose + citrato	NaCl 8%		4,2	0,79			0,84
		batelada, ana	glicose + citrato			10	1,3			0,88
		batelada, ana	glicose + citrato	NaCl 6%		4,5	0,58			0,89
		batelada, ana	glicose + citrato	NaCl 8%		5,5	0,56			0,91

continua

continuação

Parâmetro estudado	Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	Substrato (g/L) + Nutrientes	pH ou T (°C)	AL g/L	Hac g/L	EtOH g/L	Hfo g/L	AL/tot g/g
nutr, pH	<i>Lb. plantarum</i> MOP 3	batelada	glu+fru+malate	HAc 49 mM	4,1	9,1	0	0		1,0
		batelada	glu+fru+malato	HAc 20 mM + NaCl 3%	4,5	8,6	0	0		1,0
		batelada	glu+fru+malato	HAc 20 mM + NaCl 6%	4,5	6,6	0	0		1,0
		batelada	glu+fru+malato	NaCl 6%	5,5	7,3	0	0		1,0
		batelada	glu+fru+malato	HAc 0,7 mM	6,0	13	0	0		1,0
mode	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	batelada	alfa-celulose			13	0			1,0
		batelada alim, recirc	alfa-celulose			45	1,0			0,98
recirc	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	contínuo	glicose	40		32	0,44	0,29	0,66	0,96
		contínuo, recirc 59%	glicose	40		32	0,66	0,45	1,1	0,94
		contínuo, recirc 79%	glicose	40		31	0,9	0,30	1,5	0,91
		contínuo, recirc 78%	glicose	40		32	0,49		0,74	0,95
pH	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	batelada	glicose		5,0	65	0,35		0,10	0,99
		batelada	glicose		5,5	78	0,33		0,40	0,99
		batelada	glicose		6,0	79	0,35		0,40	0,99
		batelada	glicose		6,5	78	0,39		0,51	0,99
	<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	batelada	glicose		5,0	5,4	0,02 ₈	0,20	0	0,96
		batelada	glicose		5,8	5,3	0,06 ₇	0	0,16	0,96
		batelada	glicose		6,5	4,9	0,10	0,065	0,20	0,93
		batelada	maltose		5,0	5,1	0,09 ₈	0,065	0,19	0,94
		batelada	maltose		5,8	4,2	0,33	0,24	0,54	0,79
		batelada	maltose		6,5	3,2	0,49	0,36	0,72	0,67
		batelada	glicose		4,0	18	0,90	15	1,0	0,46
		batelada	glicose		5,0	68	2,0	21	0,90	0,93
		batelada	glicose		6,0	56	1,5	2,4	0,60	0,93

Abreviações como na Tabela 2.8 e: carbon = fonte de carbono; nutr = nutrientes; conc = concentração do substrato; O₂ = aeração; T = temperatura; ana = anaeróbio; aer = aeróbio; fru = frutose; Hac = ácido acético; EtOH = etanol; Hfo = ácido fórmico; AL/tot = g AL por g do total de produtos. Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.9- Formação de isômeros

A maioria das bactérias do ácido láctico produz apenas uma forma isomérica do ácido, porém às vezes pode ocorrer a formação do outro isômero. O que determina a forma isomérica do ácido láctico é a forma isomérica da enzima lactato desidrogenase, presente na bactéria. O *Lb. lactis* e o *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* ATCC 55163 produzem somente a forma L-. O *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* DSM 2129 produz apenas a forma D- (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Há varios estudos sobre os efeitos dos parâmetros da fermentação sobre a forma da molécula do ácido láctico. Alguns resultados desses estudos são exibidos na Tabela 2.11. Pode-se concluir que a quantidade do isômero predominante pode ser incrementada com o aumento do pH e da quantidade de substrato. Processos em batelada também favorecem a formação do isômero predominante. Altas temperaturas e pH não controlado desfavorecem a produção de apenas um isômero.

Tabela 2.11 - Efeito dos parâmetros do processo sobre a forma isomérica do ácido láctico produzido.

Parâmetro estudado	Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	Substr (g/L) + Nutrientes	pH ou T (°C)	% L-AL
carbon, conc	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> CBS 743.84	batelada	soro de queijo UF	43		<1
		batelada	soro de queijo centr	93		7
		batelada	soro de queijo centr	78		<10
carbon, nutr, T	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> CBS 743.84	batelada	lactose	soro de queijo + leite+ ext leved	37	<1
		batelada	lactose	ext leved + triptona	44	3
carbon	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> DSM 2129	batelada	glicose			0
		batelada	lactose			0
conc	<i>Lb. amylophilus</i> ATCC 49845	batelada	amido	50		93
		batelada	amido	70		93
		batelada	amido	100		93
	<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	batelada	glicose	85		96
		batelada	glicose	174		99
	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	batelada	glicose	50		95
		batelada	glicose	70		95

continua

continuação

Parâmetro estudado	Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	Substr (g/L) + Nutrientes	pH ou T (°C)	% L-AL
conc, recirc	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	contínuo, recirc 78%	glicose	40		96
		contínuo, recirc 96%	glicose	80		97
nutr	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 9649	batelada	glicose	ext leved 1%		0
		batelada	glicose	ext leved 5%		0
		batelada	amido	farinha hidr de trigo		94
		batelada	amido	farinha hidr de trigo + ext leved		95
		batelada	amido	farinha hidr de trigo		91
	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	batelada	amido	farinha hidr de trigo + ext leved		95
		batelada	lactose	soro de queijo + ext leved		100
		batelada	lactose	soro de queijo + soy flour		100
	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	batelada	glicose	ext leved 0,25% + triptona 0,5%		95
		batelada	glicose	ext leved 0,5% + triptona 1%		95
		batelada	glicose	ext leved 0,75% + triptona 1,5%		95
		batelada	glicose	ext leved 1% + triptona 2%		95
		batelada	glicose	ext leved 1,5% + triptona 3%		95
		batelada	glicose	ext leved 2% + triptona 4%		95
		batelada	glicose	ext leved 0,2%		98
		batelada	glicose	ext leved 1%		97
		batelada	amido	farinha hidr de trigo		94
		batelada	amido	farinha hidr de trigo + ext leved		100

continua

continuação

Parâmetro estudado	Microrganismo	Modo de Fermentação	Substrato	Substr (g/L) + Nutrientes	pH ou T (°C)	% L-AL
nutr, O ₂	<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	batelada	glicose	farinha hidr de trigo		99
		batelada	glicose	unfarinha hidr de trigo		98
		batelada	amido	farinha hidr de trigo		100
		batelada	amido	farinha hidr de trigo + ext leveled		100
	<i>Lb. plantarum</i> H4	batelada, aer	glicose+citrato			48
		batelada, aer	glicose + citrato	NaCl 6%		44
		batelada, aer	glicose + citrato	NaCl 8%		43
		batelada, ana	glicose + citrato			45
		batelada, ana	glicose + citrato	NaCl 6%		36
		batelada, ana	glicose + citrato	NaCl 8%		33
mode	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> DSM 2129	batelada	glicose			0
		contínuo	glicose + lactose			0
	<i>Lb. salivarius</i> sp. <i>salivarius</i> ATCC 11742	batelada	glicose			90
		contínuo	glicose			86
recirc	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	contínuo, recirc 51%	glicose			96
		contínuo, recirc 79%	glicose			95
		contínuo, recirc 78%	glicose			96
		contínuo, recirc 96%	glicose			97
pH	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 55163	batelada	lactose		5,4	100
		batelada	lactose		6,0	100
	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	batelada	glicose		5,0	98
		batelada	glicose		5,5	98
		batelada	glicose		6,0	98
		batelada	glicose		6,5	97
	<i>Lb. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	batelada	amido		6,0 inicial	97
		batelada	amido		6,0	100
		batelada	glicose		6,0	99
		batelada	glicose		5,0	99
		batelada	glicose		3,0	97

Abreviações como na Tabela 2.10 e: centr = centrifugado; % L-AL = % de L-ácido láctico.

Fonte: Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000.

2.4.10- Densidade celular

Na fermentação láctica, os maiores valores de densidade celular atingidos já relatados na literatura (até 103 g massa seca/L) foram devidos à recirculação de células. Entretanto, altos valores (60-77 g/L) já foram conseguidos sem recirculação (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Os parâmetros do processo determinam um maior ou menor crescimento celular. Para *Lc. lactis* e *Lb. delbrueckii*, temperaturas abaixo de 30°C e pH < 5 levam a uma baixa densidade celular (VENKATESH *et al.*, 1993). A utilização de maltose, lactose ou manose produz densidades celulares maiores do que aquelas conseguidas com a glicose. Frutose, celulose e xilose são menos eficientes (EL SABAENY, 1996).

2.5 – Cinética e modelagem das fermentações

2.5.1 - Introdução

Em uma modelagem matemática deve-se analisar, da forma mais abrangente e integrada possível, os principais fenômenos que caracterizam as interações entre a população microbiana, o meio ambiente e o tipo de processo fermentativo (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Admite-se, idealmente, que a modelagem de uma fermentação deveria prever o resultado das milhares de transformações químicas que ocorrem em um meio de cultivo, pela ação de uma população microbiana. Sem dúvida, uma descrição completa de todas as vias e interações metabólicas pertinentes ao desenvolvimento microbiano seria extremamente complexa e até mesmo impossível. Felizmente, sabe-se que muitos problemas podem ser estudados usando uma média das várias propriedades das diversas variáveis em questão. Neste sentido, é importante lembrar que o modelo ainda pode ser válido se somente um número limitado de mecanismos governantes são considerados em detalhe. Portanto, na elaboração de modelos de processos fermentativos são, geralmente, introduzidas simplificações, de maneira a se obter modelos passíveis de serem manuseados e generalizados (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

2.5.2 – O modelo logístico de crescimento microbiano

Os primeiros modelos desenvolvidos para o crescimento de microrganismos não levavam em conta a dependência da concentração de nutrientes. Atualmente, tais modelos são aplicados quando o substrato limitante não pode ser identificado. O mais simples deles é o modelo de MALTHUS (1789):

$$\frac{dN}{dt} = (b_t - d_t)N \quad (2.1)$$

N = nº total de indivíduos de uma população.

dN/dt = velocidade de crescimento populacional.

b_t = taxa específica de natalidade (nº de nascimentos/nº total de indivíduos).

d_t = taxa específica de mortalidade (nº de mortes/nº total de indivíduos).

Este modelo foi apresentado por Malthus em seu tratado “An Essay on the Principle of Population” e representa o primeiro tratamento teórico da Dinâmica Populacional (GOMES, 2003). Adaptado ao crescimento microbiano, a Equação 2.1 torna-se:

$$\frac{dX}{dt} = (b_t - d_t)X \quad (2.2)$$

ou

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \quad (2.3)$$

dX/dt = velocidade de crescimento microbiano (g células/ L.h).

$\mu_{\max}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}).

X = concentração celular (g células/L).

A solução da Equação 2.3 é dada por:

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} t} \quad (2.4)$$

X_0 = concentração celular no instante $t = 0$.

Este modelo prevê um crescimento ilimitado (crescimento Malthusiano). No entanto, nenhuma população pode crescer indefinidamente. Mais cedo ou mais tarde, chega-se em um ponto onde as limitações de alimento e espaço obrigam a população a entrar em um processo de auto-regulação. A teoria clássica da Dinâmica Populacional ensina que a densidade das populações tende para um valor máximo, em função dos recursos espaciais e energéticos

disponíveis no meio. Se, em um dado instante, a densidade populacional for menor do que a máxima, a população cresce utilizando o excesso de recursos disponíveis. Por outro lado, se a densidade ultrapassar o valor máximo, a população diminui pois os recursos são insuficientes para mantê-la (GOMES, 2003).

O matemático belga VERLHUST (1838) apresentou a segunda grande contribuição para o desenvolvimento da Dinâmica Populacional. Ele defendeu que as taxas de natalidade e mortalidade variam de acordo com a própria densidade populacional. Se essa densidade subir acima de níveis sustentáveis pelo meio, deve ocorrer uma retroação negativa sobre a taxa de natalidade, diminuindo-a, ou sobre a taxa de mortalidade, aumentando-a. Inversamente, quando a população está em níveis abaixo da capacidade de sustentação do meio, a taxa de natalidade deve aumentar, ou a de mortalidade, diminuir.

A forma analítica mais simples de exprimir estas idéias é admitir que b_t e d_t (Equação 2.2) são funções lineares de X :

$$b_t = b_0 - pX ; \quad d_t = d_0 + qX \quad (2.5)$$

b_0 = taxa de natalidade máxima; d_0 = taxa de mortalidade mínima

p, q = declives das retas. Medem a rapidez com que a natalidade e a mortalidade variam em função da densidade populacional.

A diferença entre b_0 e d_0 representa a taxa intrínseca de crescimento populacional ou parâmetro Malthusiano. Para o crescimento microbiano, $b_0 - d_0$ é igual a $\mu_{\max}$. Substituindo a Equação 2.5 na Equação 2.2, obtém-se:

$$\frac{dX}{dt} = [\mu_{\max} - (p + q)X]X \quad (2.6)$$

dX/dt se anula quando $X = 0$ ou $X = \mu_{\max} / (p+q)$. Este segundo ponto corresponde a uma situação em que a velocidade de crescimento é nula e, portanto, a população permanece constante. Este ponto é normalmente representado por K . Substituindo $(p+q)$ por $\mu_{\max}/K$, a Equação 2.6 torna-se:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{K} \right) \quad (2.7)$$

que é conhecida como *equação logística de crescimento*. A forma integrada desta equação é dada por:

$$X = \frac{X_0 K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_0 (e^{\mu_{\max} t} - 1)} \quad (2.8)$$

A constante K é conhecida como densidade de saturação ou capacidade de suporte logístico, e representa o valor teórico máximo que a concentração celular pode atingir em um determinado meio.

O modelo logístico de crescimento baseia-se em algumas pressuposições que podem não ser satisfeitas em algumas populações: (i) existe uma distribuição inicial estável de idades entre os indivíduos; (ii) a velocidade específica máxima de crescimento é alcançada nas condições existentes; (iii) a relação entre as taxas específicas de natalidade e morte e a densidade populacional é linear. As discrepâncias entre estas suposições e as características reais da população podem tornar inadequada a adoção deste modelo.

A equação logística é um dos modelos não estruturados mais utilizados para descrever o crescimento microbiano. No entanto, com o intuito de melhorar a qualidade do ajuste de seus resultados experimentais, alguns autores têm proposto modificações neste modelo. Gibson *et al.* (1987) apresentaram um modelo com quatro parâmetros:

$$\log N = A + C/(1 + \exp(-B(t - M))) \quad (2.9)$$

Uma versão assimétrica da equação logística foi proposta por Baranyi e Roberts (1994):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \mu_{\max} N(t) \left(1 - \left[\frac{N(t)}{N_{\max}} \right] \right)^m \quad (2.10)$$

Buchanan *et al.* (1997) apresentaram uma versão discreta do modelo:

$$\begin{aligned} \log \frac{N}{N_0} &= 0, & t &\leq t_{\text{lag}} \\ \log \frac{N}{N_0} &= r(t - t_{\text{lag}}) & t_{\text{lag}} &\leq t \leq t_{\text{max}} \\ \log \frac{N}{N_0} &= r(t_{\text{max}} - t_{\text{lag}}) & t &> t_{\text{max}} \end{aligned} \quad (2.11)$$

Amrane e Prigent (1999) apresentaram um modelo denominado de *equação logística complementada*:

$$X = X_0 \exp \left[\mu_{\max} t - \frac{\mu_{\max}}{d} \left(\ln \frac{\mu_{\max} - c + c \cdot \exp(d \cdot t)}{\mu_{\max}} \right) \right] \quad (2.12)$$

Para um melhor ajuste dos dados experimentais obtidos durante a fase lag, Fujikawa *et al.* (2004), apresentaram a seguinte modificação:

$$\frac{dN}{dt} = rN \left[1 - \frac{N}{N_{\max}} \right] \cdot \left[1 - \frac{N_{\min}}{N} \right]^c \quad (2.13)$$

na qual $N_{\min}$ é o tamanho inicial da população.

Utilizando critérios estatísticos, McKellar e Lu (2004) apud Corradini *et al.* (2006) relataram que todos os modelos descritos acima ajustam-se de maneira similar ao crescimento dos microrganismos.

2.5.3 - A Equação de Luedeking e Piret

Luedeking e Piret (1959) estudaram a fermentação da glicose a ácido láctico em seis diferentes valores de pH: 4.5, 4.8, 5.2, 5.4, 5.6 e 6.0. As fermentações foram conduzidas à 45°C. O microrganismo utilizado foi a bactéria láctica homofermentativa *Lactobacillus delbrueckii* NRRL-B445. O meio consistia de uma solução aquosa contendo 5% de dextrose anidra, 3% de extrato de levedura e sais minerais. O oxigênio foi eliminado através da injeção contínua de CO₂ no interior do fermentador. A análise feita por Luedeking e Piret sobre os resultados obtidos é resumida a seguir.

Crescimento como uma função do pH

O tempo de fermentação cresceu acentuadamente à medida que o pH diminuiu. Outros efeitos causados pela diminuição do pH foram observados: (i) a velocidade específica de crescimento da fase logarítmica caiu acentuadamente; (ii) o tempo de duração da fase de crescimento logarítmica diminuiu constantemente, de 8 horas a pH 6,0 até um pequeno valor não mensurável a pH 4,5; (iii) a fase logarítmica terminou com valores sucessivamente menores de densidade bacteriana; (iv) a fermentação atingiu sua máxima velocidade de crescimento (dN/dt) cada vez mais tarde dentro do ciclo de crescimento; (v) a densidade bacteriana máxima é atingida a pH 5,4; (vi) mudanças nas formas das curvas de velocidade de crescimento, velocidade específica de crescimento e síntese de produto também ocorreram a pH 5.4.

Relação entre crescimento e síntese do ácido

Como é freqüentemente assumido, se a velocidade de produção do ácido é proporcional ao número de bactérias presentes, então as bactérias deverão manter o mesmo nível de atividade metabólica e $(1/N)(dP/dt)$ deverá ser constante durante a fermentação. Observou-se que $(1/N)(dP/dt)$ não se manteve constante em nenhuma das fermentações,

exceto brevemente durante a fase logarítmica de crescimento. Portanto a consideração feita anteriormente não é válida. Uma segunda consideração comumente feita é a da velocidade de produção do ácido ser proporcional à velocidade de crescimento. Os resultados desses autores mostraram que essa consideração também é inadequada. Após atingirem os seus valores máximos, as curvas de dN/dt e dP/dt em função de t divergiram tão amplamente que tornou-se impossível estabelecer uma relação de proporcionalidade entre elas.

Uma correlação razoável pode ser obtida se for assumido que a velocidade de produção do ácido está relacionada com a velocidade de crescimento e com a quantidade de bactérias, através da expressão:

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dN}{dt} + BN \quad (2.14)$$

A = coeficiente da formação do produto associada ao crescimento (g ácido láctico/g células).

B = coeficiente da formação do produto não associada ao crescimento (g ácido láctico/g células·h).

Na equação original apresentada pelos autores, estes coeficientes são representados pelas letras gregas minúsculas α e β . Como neste trabalho α representa nível de significância estatística, optou-se pela utilização das letras A e B.

É mais fácil verificar a validade da Equação 2.5.14 fazendo a seguinte modificação:

$$\frac{1}{N} \frac{dP}{dt} = \frac{A}{N} \frac{dN}{dt} + B \quad (2.15)$$

$$\frac{1}{N} \frac{dP}{dt} = Ak + B \quad (2.16)$$

Quando os valores experimentais de $(1/N)(dP/dt)$ em função de k são plotados, obtém-se uma linha reta, o que tende a confirmar a validade das Equações 2.15 e 2.16. Então a velocidade de produção de ácido láctico não é uma função somente da densidade bacteriana ou somente do crescimento, e sim dos dois fatores em conjunto.

As constantes A e B são determinadas através da relação linear entre $(1/N)dP/dt$ e $(1/N)dN/dt$; A é o coeficiente angular e B é o coeficiente linear da reta obtida. Os parâmetros A e B variam com o pH; B torna-se maior com o aumento do pH e A, menor.

As Equações 2.15 e 2.16 sugerem que a produção de ácido láctico está relacionada a dois processos. No primeiro, a célula converte glicose a ácido láctico para obter a energia requerida para formar novo protoplasma. A velocidade de produção por célula é representada por Ak e, portanto, proporcional ao crescimento. No segundo processo, a velocidade de

produção por célula é constante a um dado pH. No início da fermentação, quando a velocidade específica de crescimento é alta, o primeiro termo da equação é o mais importante, enquanto que, aproximando-se do final da fermentação, o segundo termo torna-se mais importante. Para células latentes, onde supostamente não ocorre crescimento, o primeiro termo deve ser igual a zero e todo o ácido láctico é produzido de acordo com o segundo termo da equação, a constante B.

A equação de Luedeking e Piret é amplamente utilizada na modelagem das fermentações lácticas. Entretanto, esta expressão não prevê o término da formação do produto, quando ocorre a exaustão da fonte de carbono, no final da fermentação. Segundo a equação de Luedeking e Piret, a formação do produto aumenta continuamente com o passar do tempo. Portanto, alguns autores sugerem modificações nessa equação. Como exemplo, pode-se citar o modelo de Amrane e Prigent (1999):

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX}{dt} + BX(1 - e^{F\mu}) \quad (2.17)$$

O termo $(1 - e^{F\mu})$ é responsável pela inflexão da curva do produto, no final da fermentação.

Mais tarde, com a mesma finalidade do trabalho anterior, Amrane (2001) propôs um novo modelo:

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX}{dt} + BX \left[1 - \frac{S_{res}}{S} \right] \quad (2.18)$$

no qual S_{res} é a concentração residual do substrato.

Guerra e Pastrana (2002), estudando a produção de pediocina pelo *Pediococcus acidilactici*, sugeriu modificações na equação de Luedeking e Piret, que dizem respeito à variação da formação do produto com o pH:

$$\mu_p = (A\mu_x + B)(1 + \delta \cdot rpH) \quad (2.19)$$

$$\mu_p = (A\mu_x + B)\exp(\delta \cdot rpH) \quad (2.20)$$

$rpH = d(pH)/dt$ e δ é uma constante.

Schepers *et al.* (2002) também apresentaram uma mudança no modelo de Luedeking Piret, em função do pH:

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX}{dt} + (B + \beta \cdot pH)X \quad (2.21)$$

2.6 – A otimização da produção fermentativa do ácido láctico utilizando a metodologia da superfície de resposta

A metodologia da superfície de resposta (ou MSR) é uma técnica estatística útil na otimização de uma resposta influenciada por muitas variáveis independentes (MONTGOMERY, 1991), como é o caso deste trabalho. A seguir são descritos alguns trabalhos disponíveis na literatura, onde os autores utilizaram esta técnica na otimização da produção fermentativa do ácido láctico.

Krishnan *et al.* (1998), estudaram a otimização de um meio para a produção de ácido láctico, utilizando o *Lactobacillus plantarum* (NCIM 2084). As variáveis eram as concentrações de extrato de farelo de trigo, amido liquefeito, nitrato de amônio e acetato de sódio. Foi utilizado um planejamento composto central com quatro réplicas no centro, num total de 28 experimentos. Os efeitos quadráticos e de interação foram mais notáveis do que os lineares. As concentrações ótimas obtidas foram 9,99% para o amido, 0,05% para o trigo, 2,48% para o nitrato de amônio e 0,08% para o acetato de sódio. Nessas condições, a conversão do amido foi de 92% e a concentração de ácido láctico atingiu 72,9 g/L. Os autores concluíram que o extrato de levedura pode ser substituído por uma mistura de extrato de farelo de trigo e nitrato de amônio.

Hujanen *et al.* (2001) otimizaram as condições operacionais de pH e temperatura, na fermentação homoláctica da glicose pelo *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Os autores também apresentaram o extrato de malte como uma alternativa para substituir o extrato de levedura. Os experimentos foram realizados segundo um planejamento composto central, com quatro réplicas no centro. Os valores ótimos encontrados para as variáveis analisadas foram pH aproximadamente igual a 6,3 e temperatura igual a 35°C.

Schepers *et al.* (2002) investigaram os efeitos do pH, das concentrações de soro de queijo e de extrato de levedura sobre o crescimento do *Lactobacillus helveticus* e sobre a produção de ácido láctico. Os resultados mostraram que a velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\max}$, depende principalmente do pH, com um valor ótimo de 0,7 h⁻¹ no pH 5,5. A concentração do soro não teve influência direta sobre $\mu_{\max}$, mas mostrou uma forte interação com o pH. A adição de extrato de levedura causou um forte efeito positivo sobre $\mu_{\max}$. A concentração celular máxima, $X_{\max}$, sofreu forte influência do pH e da concentração de extrato de levedura, bem como das interações dessas variáveis com a concentração do soro de queijo.

Mi-Young *et al.* (2003) realizaram a otimização de um meio para o crescimento do *Lactobacillus casei* KH-1 e a produção de ácido láctico. As variáveis foram as concentrações de extrato de levedura, água de maceração de milho e glicose. Uma superfície de resposta foi ajustada, utilizando-se o planejamento de Box-Behnken. O crescimento e a produção de ácido láctico foram fortemente afetados pela concentração de glicose. As condições ótimas para o crescimento e para a produção de ácido foram, respectivamente, 1,276% e 0,697% (extrato de levedura), 3,505% e 1,708% (água de maceração de milho) e 2,390% e 2,215% (glicose).

Téllez-Luis *et al.* (2003) estudaram a otimização de um meio de fermentação de baixo custo, à base de água de maceração de milho, para a produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B445. O efeito do tempo de fermentação também foi considerado. A máxima concentração de ácido láctico, 93,4 g/L, foi conseguida com 15 g/L de água de maceração de milho e 6 g/L de extrato de levedura, em 80 horas de fermentação. Entretanto, a produtividade máxima foi atingida com 15 g/L de água de maceração de milho, 6 g/L de extrato de levedura e 8,9 g/L de peptona, após 24 horas.

Bustos *et al.* (2004) estudaram a otimização de um meio de baixo custo para a produção do ácido D(-)-láctico, utilizando uma cepa do *Lactobacillus coryniformis*. O meio era composto por água de maceração de milho, suplementado com extrato de levedura e peptona. O tempo também foi analisado como uma variável do processo. A máxima concentração de ácido láctico, 58,9 g/L, foi atingida com 5 g/L de água de maceração de milho, 3,6 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de peptona, após 96 horas de fermentação.

Liu *et al.* (2004) realizaram a otimização de um meio composto por soro de queijo suplementado, para a produção simultânea de ácido láctico e nisina. Os autores investigaram sete variáveis: temperatura, pH, e concentrações de extrato de levedura, peptona, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e Tween-80. Um planejamento Plackett-Burman identificou as concentrações de extrato de levedura, fosfato de potássio e sulfato de magnésio como as variáveis significativas do processo. Um planejamento composto central foi desenvolvido para essas variáveis. As concentrações máximas de ácido láctico (19,3 g/L) e de nisina (92,9 g/L) ocorreram quando as concentrações de extrato de levedura, fosfato de potássio e sulfato de magnésio foram iguais a 11,89 g/L, 0,61 g/L e 0,59 g/L, respectivamente.

Naveena *et al.* (2005) estudaram a otimização de um meio à base de farelo de trigo, para a produção do ácido L(+) –láctico utilizando o *Lactobacillus amylophilus*. A fermentação foi conduzida em estado sólido. Nas condições ótimas, foi conseguido 36 g de ácido láctico por 100 g de farelo de trigo.

2.7 - Estimação de parâmetros em modelos não lineares

2.7.1- O método dos mínimos quadrados

Assim como neste estudo, a maioria dos problemas em Engenharia recai em tratamentos com modelos não lineares. Nestes casos, alguns cuidados devem ser tomados quando se deseja estimar parâmetros, pois em determinadas situações as estimativas podem não ser válidas estatisticamente (BARROZO, 1995). Neste item serão descritas algumas técnicas, citadas na literatura específica, que tratam da avaliação das propriedades estatísticas dos estimadores de mínimos quadrados.

Seja um modelo de regressão representado pela seguinte equação:

$$Y_i = f(X_i, \theta) + \varepsilon_i \quad (2.22)$$

Na qual Y_i é a resposta para a i -ésima observação, X_i , θ e ε_i são respectivamente os vetores das variáveis independentes, dos parâmetros e dos resíduos. A função que representa a soma dos quadrados da diferença entre a resposta e a função esperança, pode ser apresentada como:

$$S(\theta) = \sum_1^n (Y_i - f(X_i, \theta))^2 \quad (2.23)$$

Por definição, o estimador de mínimos quadrados θ é o valor que minimiza a função $S(\theta)$, sendo, portanto, a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) igual à $S(\theta)$. Entretanto, para que esses estimadores tenham validade, seja o modelo linear ou não linear, devem ser observadas as seguintes condições (BARROZO, 1995):

- a) o modelo deve ser correto, ou seja, deve incluir todas as variáveis que influenciam o fenômeno e não apresenta nenhuma variável desnecessária;
- b) os resíduos são independentes da função esperança $f(X_i, \theta)$ e das variáveis.
- c) os resíduos têm distribuição normal, com média zero e variância constante;

Vários métodos iterativos são propostos na literatura para determinação das estimativas de mínimos quadrados. Os mais utilizados são o método de Gauss-Newton e suas versões modificadas, o método “Steepest-Descent” e o algoritmo desenvolvido por Marquadt, que pode ser visto como uma combinação entre os métodos de Gauss-Newton e “Steepest-Descent” (MAZUCHELI, 2002).

Em um modelo de regressão linear, os estimadores de mínimos quadrados dos parâmetros são não-viciados, normalmente distribuídos e possuem variância mínima possível entre qualquer outra classe de estimadores. Estas propriedades são aceitas como as melhores que uma classe de estimadores pode apresentar (SEARLE, 1971 apud MAZUCHELI, 2002).

Podem existir outros estimadores, também não viciados, porém menos eficientes devido a suas variâncias excederem a variância dos estimadores de mínimos quadrados (MAZUCHELI, 2002).

No caso de modelos não lineares, a validade das inferências estatísticas tais como regiões de confiança, nível de significância, intervalo de confiança dos parâmetros etc. só ocorrem na condição assintótica, ou seja, para uma amostra com grande número de dados, e mesmo nesta situação os resultados são considerados como aproximados. O tamanho da amostra necessário para a validade dessas aproximações depende do modelo em consideração (RATKOWSKY, 1983).

Quando, em modelos não lineares, $\hat{\theta}$, o estimador de mínimos quadrados de θ , apresenta um pequeno vício e uma distribuição próxima da normal, então diz-se que $\hat{\theta}$ exibe um comportamento “próximo do linear”, e os valores “aproximados” dos vários testes e intervalos de confiança são considerados válidos (ACHCAR, 1994 apud BARROZO, 1995).

Uma questão importante em regressão não linear é a localização do ponto de mínimo. Nenhum dos algoritmos citados pode garantir convergência para um mínimo global, podendo ocorrer situações em que os valores estimados são na verdade mínimos locais, que variam conforme o “chute inicial”. Assim, na prática, devem ser realizados vários testes partindo-se de valores iniciais diferentes e os resultados devem ser comparados. Este procedimento ajuda a prevenir possíveis soluções locais do problema (BARROZO, 1995).

2.7.2 - Medidas de não linearidade

Diferente dos modelos de regressão lineares, nos quais a validade das inferências é avaliada principalmente por meio de diagnósticos de regressão, nos modelos não lineares deve-se avaliar, além dos diagnósticos usuais, a extensão do comportamento não linear do modelo adotado. Diagnósticos usuais de regressão são ferramentas extensamente descritas na literatura e amplamente utilizadas. Por outro lado, medidas de não linearidade, em princípio, não são tão conhecidas, e requerem algum esforço nas suas obtenções (MAZUCHELI, 2002).

Medidas de não linearidade são expressões que indicam se o grau de não linearidade, em um problema de estimação não linear, é pequeno o suficiente para justificar a utilização dos resultados usuais da teoria dos modelos lineares como aproximação para os não lineares.

Box (1971) apud Mazuchelli (2002) desenvolveu uma metodologia para determinar os vícios dos estimadores de mínimos quadrados de modelos não lineares. Gillis e Ratkowsky

(1978) apud Mazuchelli (2002), através de simulações, concluíram que a medida de vício de Box não só o estima de maneira correta, como também fornece uma boa indicação da extensão do comportamento não linear do modelo.

Bates e Watts (1980) apud Mazuchelli(2002) desenvolveram uma medida de não linearidade a partir de conceitos de geometria diferencial. Estes autores separaram a não linearidade de um modelo em duas componentes: intrínseca (IN) e devida ao efeito de parâmetros (PE). A primeira é uma característica do modelo e a segunda depende da maneira em que os parâmetros aparecem no modelo, podendo ser reduzida por reparametrizações, o que não é possível na não linearidade intrínseca (IN). Estas medidas baseiam-se na magnitude da derivada segunda do modelo em relação aos parâmetros, o que difere o caso linear do não linear. Ratkowsky (1983) fornece um programa Fortran para o cálculo das medidas de curvatura de Bates e Watts e do vício de Box.

Uma das maneiras de avaliar as propriedades dos estimadores de mínimos quadrados de modelos não lineares é através de estudos de simulação (RATKOWSKY, 1983). Na prática, para uma melhor garantia da validade das várias inferências estatísticas, deve-se combinar essas técnicas, isto é, utilizá-las conjuntamente nas aplicações. O uso desta metodologia pode ser muito útil na discriminação de modelos rivais. A seguir serão descritos com mais detalhes as medidas de curvatura de Bates e Watts, a medida de vício de Box e os estudos de simulação de Ratkowsky .

2.7.2.1 - Medidas de curvatura de Bates e Watts

Seja um espaço amostral de dimensão n (número de dados) e um espaço de estimação (ou “locus de solução”) de dimensão p (número de parâmetros), onde suas coordenadas são dadas pela função esperança. A solução de mínimos quadrados é o ponto do locus de solução que se encontra mais próximo do vetor das respostas (Y). Uma característica importante dos modelos lineares é que tomando-se valores de θ igualmente espaçados, então os pontos correspondentes no locus de solução também são igualmente espaçados. Para $n=3$ e $p=2$, por exemplo, se o modelo é linear, o locus de solução é um plano e, conseqüentemente, se tomarmos retas paralelas e eqüidistantes no espaço paramétrico então teremos também retas paralelas e eqüidistantes no locus de solução.

A não linearidade intrínseca (IN), definida por Bates e Watts , mede a curvatura do locus de solução no espaço amostral. É obvio que no caso linear o valor dessa medida é zero

(BARROZO, 1995). Em um modelo não linear, onde $n=3$ e $p=2$, como no exemplo anterior, o locus de solução não é mais um plano e sim uma superfície curva. Além disso, os pontos do locus de solução correspondentes a $\Delta\theta = \text{constante}$ não são mais necessariamente igualmente espaçados (BARROZO, 1995).

Como foi visto, os pontos do locus de solução em torno de $\hat{\theta}$ e o tipo de espaçamento existente entre os pontos do locus correspondentes a $\Delta\theta = \text{constante}$, diferem o comportamento dos modelos lineares e não lineares. Assim, quanto maior a curvatura do locus de solução nas vizinhanças de $\hat{\theta}$, ou seja, quanto mais o locus se afasta da reta tangente em $\hat{\theta}$, maior será o que Bates e Watts definem por não linearidade intrínseca do modelo (IN). Além disso, quanto mais desiguais forem os espaçamentos maior será a não linearidade causada pela parametrização (PE) (BARROZO, 1995).

O equacionamento dessas medidas pode ser resumidamente apresentado da seguinte forma: seja o modelo de regressão representado pela Equação 2.7.1. A matriz das primeiras derivadas da função esperança em relação aos parâmetros, $\dot{V}$ ($n \times p$), tem os seguintes elementos:

$$\left\{ \dot{V} \right\}_{ij} = \left[\left(\frac{\partial f(X_i, \theta)}{\partial \theta_j} \right) \right] \quad i=1,2, \dots, n \quad j=1,2, \dots, p \quad (2.24)$$

O arranjo das segundas derivadas da função esperança, $\ddot{V}$, de dimensão ($n \times p \times p$), tem seus elementos representados da seguinte forma:

$$\left\{ \ddot{V} \right\}_{ijq} = \left[\left(\frac{\partial^2 f(X_i, \theta)}{\partial \theta_j \partial \theta_q} \right) \right] \quad \begin{cases} i = 1,2, \dots, n \\ j = 1,2, \dots, p \\ q = 1,2, \dots, p \end{cases} \quad (2.25)$$

O problema pode ser padronizado dividindo-se ambas as matrizes pelo raio padronizado (ρ), obtendo-se desta forma as matrizes $\dot{V}$ e $\ddot{V}$. A expressão que fornece ρ é a seguinte:

$$\rho = s\sqrt{p} \quad (2.26)$$

s^2 é o estimador da variância dado por:

$$s^2 = \text{SQR} / (n - p) \quad (2.27)$$

Uma simplificação possível de ser realizada é a transformação de coordenadas do espaço amostral, tal que os p primeiros vetores coordenados sejam paralelos ao plano tangente

e os (n-p) últimos sejam ortogonais ao plano tangente. Isto pode ser feito multiplicando-se todos os vetores no espaço amostral por uma matriz ortogonal $\mathbf{Q}^T$, tal que $\mathbf{Q}$ seja parte de uma decomposição **QR** de $\dot{\mathbf{V}}$ da forma:

$$\dot{\mathbf{V}} = \mathbf{QR} = \mathbf{Q} \begin{bmatrix} \mathbf{R} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix} \quad (2.28)$$

Onde $\mathbf{R}$ é uma matriz triangular superior, com dimensão (p x p) e a matriz de zeros ($\mathbf{0}$) tem dimensão (n-p) x p.

As coordenadas no espaço paramétrico também são transformadas de θ para ϕ através da seguinte expressão:

$$\phi = \mathbf{R}(\theta - \hat{\theta}) \quad (2.29)$$

A relação entre as matrizes de segundas derivadas nas coordenadas ϕ e θ é dada por:

$$\ddot{\mathbf{U}} = \mathbf{L}^T \ddot{\mathbf{V}} \mathbf{L} \quad (2.30)$$

onde $\mathbf{L}$ é a inversa da matriz $\mathbf{R}$.

Chega-se finalmente ao arranjo aceleração, $\ddot{\mathbf{A}}$, com dimensões (n x p x p) através da seguinte relação:

$$\ddot{\mathbf{A}} = \mathbf{Q}^T \ddot{\mathbf{U}} = \ddot{\mathbf{A}}^{\text{PE}} \mid \ddot{\mathbf{A}}^{\text{IN}} \quad (2.31)$$

$\ddot{\mathbf{A}}^{\text{PE}}$ são as p primeiras faces de $\ddot{\mathbf{A}}$ e representa a porção devida a efeitos de parâmetros, e $\ddot{\mathbf{A}}^{\text{IN}}$ são as últimas (n-p) faces de $\ddot{\mathbf{A}}$ e representa a parte intrínseca. Os valores de curvatura (IN) e (PE) são dados pelos valores máximos encontrados nas respectivas matrizes (BARROZO).

Para que a significância estatística dos efeitos (IN) e (PE) possa ser avaliada, comparam-se os valores obtidos com o raio de curvatura da região de confiança 100(1- α)%, que é dado por: $\frac{1}{2} \sqrt{F(p, n-p, \alpha)}$, onde F é a estatística de fisher e α o nível de significância. Por exemplo, para $\alpha = 0.05$, caso (IN) < $\frac{1}{2} \sqrt{F}$ e (PE) < $\frac{1}{2} \sqrt{F}$, pode-se dizer que temos uma aproximação linear satisfatória sobre uma região de confiança de 95% (BARROZO, 1995).

2.7.2.2 - Medida de vício de Box

A equação proposta por Box para avaliar o vício dos parametros estimados por mínimos quadrados é a seguinte:

$$\text{Vício}(\hat{\theta}) = -\frac{s^2}{2} \left(\sum_{i=1}^n \dot{\mathbf{V}}_i \dot{\mathbf{V}}_i^T \right)^{-1} \sum_{u=1}^n \dot{\mathbf{V}}_u \text{tr} \left[\left(\sum_{i=1}^n \dot{\mathbf{V}}_i \dot{\mathbf{V}}_i^T \right)^{-1} \ddot{\mathbf{V}}_u \right] \quad (2.32)$$

O termo tr é o traço da matriz e $\text{Vício}(\theta)$ é um vetor $p \times 1$ que representa a discrepância entre as estimativas de mínimos quadrados dos parâmetros e seus verdadeiros valores. É comum encontrar o vício expresso através da seguinte percentagem:

$$\% \text{Vício}(\hat{\theta}) = \frac{100 \cdot \text{Vício}(\hat{\theta})}{\hat{\theta}} \quad (2.33)$$

Considera-se Vício acima de 1% como um indicador do comportamento não linear dos parâmetros. A importância em avaliar os vícios é devido essa medida indicar quais parâmetros do modelo são os responsáveis pela não linearidade. Essa análise pode apontar para possíveis reparametrizações do modelo, caso a não linearidade intrínseca (IN) não seja significativa (BARROZO, 1995).

2.7.3 - Estudo de simulação

Ratkowsky (1983) propôs uma metodologia para investigar o comportamento não linear de um modelo através da análise das propriedades amostrais dos estimadores de mínimos quadrados, onde seus princípios serão descritos nos próximos parágrafos.

A partir de um conjunto de dados originais (n observações) e de um modelo de interesse, pode-se estimar por mínimos quadrados os respectivos parâmetros e a variância residual (s^2). Sendo o modelo de regressão da forma da Equação 2.7.1, resíduos ε_i são gerados pseudo-aleatoriamente através de uma normal com média zero e variância s^2 , $N(0, s^2)$. Com os estimadores obtidos pelos dados originais e os resíduos gerados pela normal, pode-se produzir uma amostra com n observações. Este procedimento é repetido N vezes, sendo que para cada amostra simulada obtêm-se as estimativas dos parâmetros por mínimos quadrados de modelos não lineares (BARROZO, 1995).

A distribuição das N estimativas dos parâmetros podem ser examinadas através dos testes usuais (SEBER; WILD, 1989 apud BARROZO, 1995), ou pelos histogramas de cada parâmetro, que revela com clareza o comportamento não normal dos estimadores. A seguir serão apresentadas algumas medidas importantes para uma análise da distribuição marginal dos parâmetros.

O primeiro passo para se obter as medidas usuais é determinar os quatro primeiros momentos amostrais:

$$m_1 = \bar{\theta} \quad \text{média amostral} \quad (2.34)$$

$$m_2 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (\theta_j - \bar{\theta})^2 \quad \text{variância amostral} \quad (2.35)$$

$$m_3 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (\theta_j - \bar{\theta})^3 \quad (2.36)$$

$$m_4 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (\theta_j - \bar{\theta})^4 \quad (2.37)$$

$\bar{\theta}$ é a média amostral dos N parâmetros estimados e θ é o valor do parâmetro estimado pelos dados originais.

As medidas recomendadas são oriundas dos momentos. São elas o Vício (%) e os coeficientes Skewness (g_1) e Kurtosis (g_2), que podem ser representados respectivamente pelas seguintes equações:

$$\begin{aligned} g_1 &= m_3 / m_2^{3/2} \\ g_2 &= m_4 / m_2^2 \end{aligned} \quad (2.38)$$

Os coeficientes de Skewness e Kurtosis medem a assimetria e o espalhamento, respectivamente. Servem, portanto, para verificar a normalidade da distribuição dos parâmetros. No caso de uma normal típica, os valores destes coeficientes são 0 e 3, respectivamente (BARROZO, 1995).

2.7.4 - Resultados inferenciais

A partir da verificação da aproximação linear do modelo através das medidas de não linearidade, mencionadas no item anterior, pode-se obter algumas inferências estatísticas especialmente úteis na discriminação de modelos rivais, como a razão F, o coeficiente de correlação e os intervalos de confiança dos parâmetros, que podem ser obtidos a partir das seguintes equações:

Razão F

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n \hat{Y}_i^2 / p}{\text{SQR} / (n - p)} \quad (2.39)$$

SQR é a soma de quadrados dos resíduos, dada por:

$$SQR = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (2.40)$$

Coefficiente de correlação R

$$R^2 = \frac{S_{yy} - SQR}{S_{yy}} \quad (2.41)$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 \quad (2.42)$$

Intervalos de confiança dos parâmetros

$$\hat{\theta} \pm s_e t(n-p, \alpha/2) \quad (2.43)$$

onde s_e é o desvio padrão do parâmetro estimado e $t(n-p, \alpha/2)$ é a estatística t – Student, com $n-p$ graus de liberdade.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Planejamento dos experimentos

Para se estudar a influência das variáveis (i) temperatura, (ii) pH, (iii) concentração de lactose e (iv) concentração de extrato de levedura na síntese do ácido láctico pelo *Lactobacillus helveticus*, optou-se por um planejamento fatorial composto central com três réplicas no centro, perfazendo um total de 27 experimentos (Tabela 3.1). O valor escolhido para o nível extremo do planejamento foi igual a 1,55. Este valor foi selecionado de modo a se obter um planejamento ortogonal, onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si. O planejamento experimental foi feito utilizando-se o *software Statistica 5*.

Tabela 3.1 – Planejamento composto central, com variáveis independentes codificadas.

X_1 = concentração de lactose; X_2 = concentração do extrato de levedura; X_3 = temperatura; X_4 = pH.

X_1	X_2	X_3	X_4
-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1
-1	1	-1	-1
1	1	-1	-1
-1	-1	1	-1
1	-1	1	-1
-1	1	1	-1
1	1	1	-1
-1	-1	-1	1
1	-1	-1	1
-1	1	-1	1
1	1	-1	1
-1	-1	1	1
1	-1	1	1
-1	1	1	1
1	1	1	1
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
-1,55	0	0	0
1,55	0	0	0
0	-1,55	0	0
0	1,55	0	0
0	0	-1,55	0
0	0	1,55	0
0	0	0	-1,55
0	0	0	1,55

As variáveis independentes foram codificadas segundo as relações:

$$X_1 = \frac{CL - 70}{15} \quad (3.1)$$

$$X_2 = \frac{YE - 12,37}{8} \quad (3.1)$$

$$X_3 = \frac{T - 40}{4} \quad (3.1)$$

$$X_4 = pH - 6 \quad (3.4)$$

CL = concentração de lactose, g/L.

YE = concentração de extrato de levedura, g/L.

T = temperatura, °C.

pH = corresponde ao próprio valor do pH do meio.

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores reais das variáveis independentes codificadas.

	Xi				
	-1,55	-1	0	1	1,55
CL(g/L)	46,8	55	70	85	93,2
YE (g/L)	0	4,37	12,37	20,37	24,74
T (°C)	33,8	36	40	44	46,2
pH	4,5	5	6	7	7,5

3.2 – Microrganismo

O *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 foi adquirido junto à fundação André Tosello (Campinas-SP). A escolha deste microrganismo baseou-se no fato dele ter sido apontado por Tango e Ghaly (1999a) como o mais eficiente na síntese de ácido láctico a partir da lactose. As cepas encontravam-se em dois tubos (*slants*) contendo meio ágar-MRS (DIFCO 0881 com 18 g/L de ágar). A cultura foi repicada em caldo MRS e em ágar-MRS. Esses meios foram esterilizados em autoclave, à 121 °C por 15 minutos, antes da sua utilização.

A primeira repicagem das células foi feita adicionando-se 1,0 mL de uma solução estéril de NaCl 0,8% em cada *slant*. A superfície do meio foi friccionada suavemente com um bastão de vidro. Desse modo, formou-se aproximadamente 2,0 mL de uma suspensão bacteriana. Metade desta suspensão foi repicada em 10 *slants* contendo ágar-MRS. Os *slants* foram mantidos em incubadora (Marconi, modelo 890), à 37°C por 24 horas, e depois foram mantidos sob refrigeração. Novas repicagens foram feitas a cada 15 dias.

A outra metade da suspensão bacteriana foi repicada em um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo MRS. O erlenmeyer foi mantido em incubadora, à 37°C e 120 rpm, por 24 horas. Em seguida, o conteúdo do erlenmeyer foi igualmente distribuído em 50 tubos com 0,4 mL de glicerol cada um. Os tubos contendo o glicerol foram previamente esterilizados em autoclave à 121°C por 15 minutos. Por fim, os tubos seguiram para congelamento, formando assim uma cultura estoque.

3.3 - Preparo e padronização do inóculo

Para o preparo do inóculo, um tubo da cultura estoque era descongelado e o seu conteúdo inserido em um erlenmeyer contendo 200 mL de caldo MRS, previamente esterilizado em autoclave à 121 °C por 15 minutos. O inóculo seguia para uma incubadora (Marconi, modelo 890), onde permanecia à 37°C e 120 rpm por 24 horas. Após esse período, retirava-se uma amostra de 1 mL e inseria-se em um espectrofotômetro (Thermo Spectronic modelo Genesys 10), onde media-se a sua absorbância no comprimento de onda de 650 nm. A concentração de células do inóculo era então calculada utilizando-se uma curva de crescimento, que relacionava a absorbância com a concentração de biomassa. O procedimento utilizado para a construção da curva de crescimento encontra-se no Apêndice B.

No intervalo de tempo escolhido para a incubação do inóculo, a concentração celular sempre atingiu um valor em torno de $1,0 \times 10^7$ células/mL ou 0,1 g/L, com exceção das vezes em que não houve crescimento e o preparo do inóculo teve de ser refeito. Neste trabalho, optou-se por utilizar essa concentração celular com base no estudo publicado por Tango e Ghaly (1999b).

3.4 - Preparo do meio de fermentação

O meio de fermentação era constituído por soro de queijo em pó reconstituído, suplementado com extrato de levedura. O soro foi fornecido pelo laticínio Vigor (São Gonçalo do Sapucaí – MG) e o extrato de levedura pela Micromed Meios de Cultura (Duque de Caxias-RJ).

Para cada fermentação, 225 g de soro em pó eram dissolvidos em água até o volume final de 1,5 L. A solução resultante era aquecida até atingir o ponto de ebulição, no qual permanecia por 5 minutos. Este processo provocava a coagulação das proteínas. Em seguida, a solução era resfriada naturalmente até atingir a temperatura ambiente, e então filtrada com um coador de café para a remoção das proteínas. Ao final desta etapa eram obtidos 900-1000 mL de soro desproteinado, com uma concentração de lactose de 160-180 g/L. O teor de lactose era determinado pelo método DNS (Apêndice A).

O volume de soro desproteinado utilizado nas fermentações era uma função da concentração de lactose desejada em cada fermentação, e foi calculado utilizando-se a lei da diluição de soluções:

$$V_1 = (CL)V_2 / C_1 \quad (3.5)$$

V_1 = volume de soro desproteinado (L).

CL = concentração inicial de lactose em uma dada fermentação (g/L), de acordo com a Tabela 3.1.

$V_2 = 2,0$ L = volume do meio em cada fermentação.

C_1 = concentração de lactose no soro (g/L).

Caso V_1 , calculado pela fórmula acima, fosse maior do que o volume de soro disponível, era necessário a adição de lactose sintética ao soro. Para isto, foi utilizada lactose monohidratada. A quantidade de lactose adicionada era calculada pela equação:

$$M_{lac} = 2 CL - C_1 V_{disp} \quad (3.6)$$

M_{lac} = Massa de lactose (g).

V_{disp} = volume disponível de permeado (L).

Por fim, adicionava-se o extrato de levedura e água até o volume de 1800 mL. O extrato de levedura era adicionado de acordo com cada experimento, segundo a Tabela 3.3. Os cálculos eram feitos para um volume final de 2,0 L (1800 mL de meio + 200 mL de inóculo).

O meio era inserido dentro do fermentador e então esterilizado em autoclave, operando à 121°C por 20 minutos. Após resfriamento, 200 mL de inóculo eram transferidos para o fermentador e iniciava-se a fermentação.

3.5 - Fermentações

Os experimentos foram realizados em um fermentador NBS Bioflo 110 (Figura 3.1), com volume útil de 2,0 L e controles de agitação, temperatura e pH. As fermentações foram conduzidas em agitação de 200 rpm, por 32 horas. Este período foi escolhido com base nos estudos publicados por Tango e Ghaly (1999c) e Schepers *et al.* (2002). As concentrações iniciais de lactose e de extrato de levedura, bem como os valores de pH e temperatura variaram de acordo com cada fermentação, conforme a Tabela 3.1. O controle do pH foi feito utilizando-se soluções de H₂SO₄ 10% (v/v) e NaOH 6 N.

3.6 - Metodologia analítica

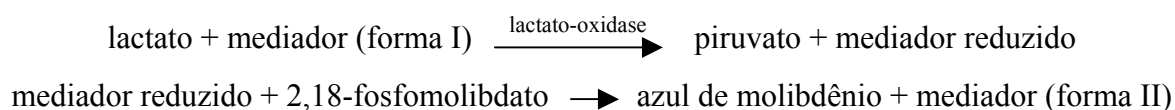
Para as análises das concentrações de biomassa, lactose e ácido láctico, uma amostra de 5 mL era retirada do meio em fermentação a cada 2 horas. As amostras eram centrifugadas a 15000 rpm por 6 minutos, em uma centrífuga Beckman Coulter modelo Avanti J-25.

Lactose

Após a centrifugação da amostra, retiravam-se 2,0 mL do sobrenadante e determinava-se o teor de lactose pelo método DNS, de acordo com o procedimento descrito no Apêndice A. Este procedimento foi feito em duplicata.

Ácido láctico

Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante era utilizada para a análise da concentração de ácido láctico. As análises eram feitas através de um analisador de ácido láctico, Accutrend Lactate (Roche, Germany). Neste equipamento, o lactato é determinado indiretamente por fotometria de reflexão à 657 nm, após a reação colorimétrica de um mediador da lactato-oxidase:



Antes da introdução no analisador, as amostras eram diluídas para que a concentração do ácido láctico permanecesse abaixo do limite máximo suportado pelo equipamento, que é de 1,6 g/L. Este procedimento era feito por tentativa e erro. Por fim, inseria-se 25 µL de amostras diluídas no equipamento e o resultado era obtido após 60 segundos.

Concentração celular

A concentração celular foi determinada através de medidas de densidade óptica, no comprimento de onda de 650 nm. Após a centrifugação da amostra e separação do sobrenadante, o precipitado era lavado duas vezes com água deionizada e então diluído, antes da sua introdução no espectrofotômetro. A diluição era feita de modo que a absorbância permanecesse na faixa de 0,1-0,7 unidades de absorbância. Neste intervalo é possível obter uma relação linear entre a absorbância e a concentração celular. A medida da absorbância era convertida em concentração celular (g massa seca/litro de meio) através de uma curva de calibração. A curva de calibração foi construída de acordo com o procedimento descrito no Apêndice C.

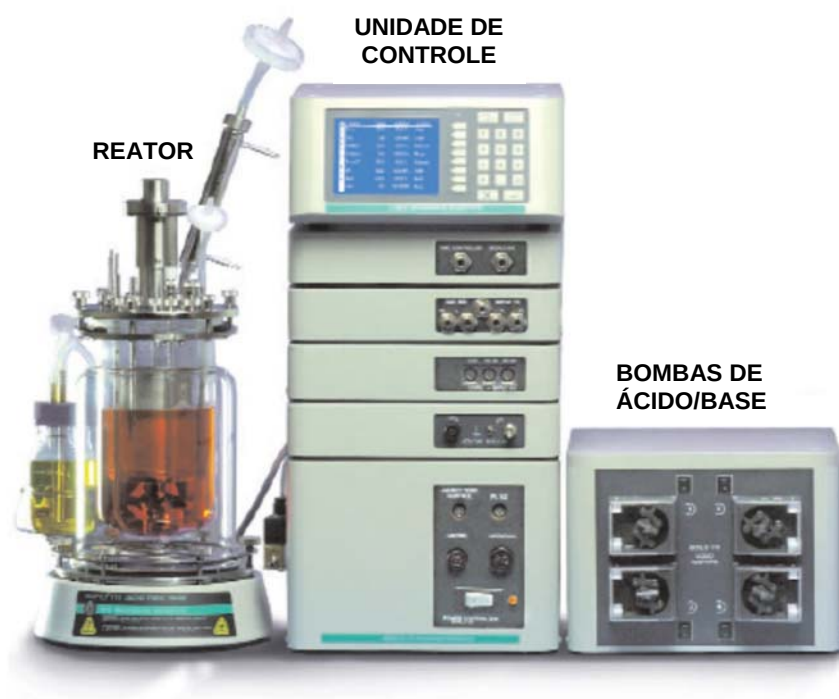


Figura 3.1 – Ilustração da montagem experimental.

3.7 - Análise estatística

Por meio da técnica da superfície de resposta é possível identificar os efeitos das variáveis estudadas de forma isolada, bem como das interações entre as mesmas e das contribuições quadráticas. Sendo assim é possível obter por regressão múltipla uma equação empírica de previsão da resposta, em função das variáveis estudadas. Esta equação tem portanto a seguinte forma:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k \beta_{jm} x_j x_m + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 \quad (3.7)$$

$j < m$

η = concentração de ácido láctico (g/L)

x = variáveis independentes

k = nº de variáveis independentes

$\beta_0, \beta_j, \beta_{ij}, \beta_{jj}$ = parâmetros do modelo

Neste trabalho, as variáveis independentes são a temperatura, o pH e as concentrações de lactose e de extrato de levedura e portanto $k=4$.

A superfície de resposta ajustada é dada por

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k b_{jm} x_j x_m + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \quad (3.8)$$

b_0, b_j, b_{jm}, b_{jj} são os estimadores de $\beta_0, \beta_j, \beta_{jm}, \beta_{jj}$.

Utilizando-se notação matricial, a Equação 3.8 pode ser expressa por:

$$\hat{y} = b_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'B\mathbf{x} \quad (3.9)$$

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix}, \quad \mathbf{b} = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_k \end{bmatrix}, \quad B = \begin{bmatrix} b_{11} & b_{12}/2 & \cdots & b_{1k}/2 \\ b_{21}/2 & b_{22} & \cdots & b_{2k}/2 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ \cdots & \cdots & b_{k-1,k}/2 & \cdots \\ \cdots & \cdots & \cdots & b_{kk} \end{bmatrix}$$

O ponto de máxima resposta, se existir, será dado por um conjunto de condições ($x_1, x_2, \dots, x_k$)

que tornam as derivadas parciais $\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1}, \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_2}, \dots, \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_k}$ iguais a zero. Diferenciando a Equação

3.9 em relação ao vetor $\mathbf{x}$ e igualando a zero, obtém-se o ponto estacionário $\mathbf{x}_0$:

$$\mathbf{x}_0 = -B^{-1} \frac{\mathbf{b}}{2} = \begin{bmatrix} x_{10} \\ x_{20} \\ \vdots \\ x_{k0} \end{bmatrix} \quad (3.10)$$

O ponto estacionário $\mathbf{x}_0$ pode representar um ponto de máxima ou de mínima resposta, ou ainda um ponto de sela da superfície ajustada. Para se determinar a natureza do ponto estacionário, deve-se realizar uma translação da superfície ajustada da origem ($x_1 = 0, x_2 = 0, \dots, x_k = 0$) até o ponto estacionário $\mathbf{x}_0$. A superfície de resposta é então expressa por novas variáveis $w_1, w_2, \dots, w_k$, cujos eixos correspondem aos eixos principais do sistema de contornos (Figura 3.2). A função em termos dessas novas variáveis é chamada de *forma canônica* da superfície ajustada e é dada por:

$$\hat{y} = \hat{y}_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3.11)$$

$\hat{y}_0$ é a resposta estimada no ponto estacionário e λ_i são as raízes características da matriz B . A redução da superfície de resposta ajustada para a forma canônica é chamada de *análise canônica*.

A resposta $\hat{y}_0$ (Equação 3.9) pode ser escrita em termos de $b_0, \mathbf{x}_0$ e do vetor $\mathbf{b}$:

$$\hat{y}_0 = b_0 + \mathbf{x}_0' \mathbf{b} + \mathbf{x}_0' B \mathbf{x}_0 \quad (3.12)$$

Combinando as Equações 3.10 e 3.7.12 e rearranjando:

$$\hat{y}_0 = b_0 + \mathbf{x}_0' \mathbf{b} / 2 \quad (3.13)$$

Devido à translação de eixos, a Equação 3.9 deve ser reescrita em termos de um novo vetor, $\mathbf{z}$, tal que $\mathbf{z} = \mathbf{x} - \mathbf{x}_0$:

$$\begin{aligned} \hat{y} &= b_0 + (\mathbf{z}' + \mathbf{x}_0') \mathbf{b} + (\mathbf{z}' + \mathbf{x}_0') B (\mathbf{z} + \mathbf{x}_0) \\ &= b_0 + \mathbf{x}_0' \mathbf{b} + \mathbf{x}_0' B \mathbf{x}_0 + \mathbf{z}' \mathbf{b} + \mathbf{z}' B \mathbf{x}_0 + \mathbf{x}_0' B \mathbf{z} + \mathbf{z}' B \mathbf{z} \end{aligned} \quad (3.14)$$

Considerando-se que $\mathbf{z}' B \mathbf{x}_0 = \mathbf{x}_0' B \mathbf{z}$ e que os três primeiros termos representam a resposta avaliada no ponto estacionário, a Equação 3.14 pode ser escrita como:

$$\begin{aligned} \hat{y} &= \hat{y}_0 + \mathbf{z}' (\mathbf{b} + 2B\mathbf{x}_0) + \mathbf{z}' B \mathbf{z} \\ &= \hat{y}_0 + \mathbf{z}' B \mathbf{z} \end{aligned} \quad (3.15)$$

A Equação 3.15 representa a superfície de resposta ajustada, após a translação para a nova origem ($x_1 = 0, x_2 = 0, \dots, x_k = 0$).

Existe uma transformação ortogonal $\mathbf{z} = M\mathbf{w}$ tal que

$$\begin{aligned}\mathbf{z}'B\mathbf{z} &= \mathbf{w}'M'BM\mathbf{w} \\ &= \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2\end{aligned}\quad (3.16)$$

M é uma matriz $k \times k$ ortogonal ($M'M = I_k$) que contém os autovetores normalizados associados às raízes características λ_i . A determinação da matriz M é importante pois a transformação $\mathbf{w} = M'\mathbf{z}$ permite relacionar as variáveis $\mathbf{z}_i$ com as variáveis canônicas $\mathbf{w}_i$.

A natureza do ponto estacionário é determinada através da análise das raízes características fornecidas pela Equação 3.16. A Figura 3.2 pode ser utilizada para como exemplo ilustrativo para essa análise, onde $k = 2$. Se $\lambda_i < 0$, um deslocamento a partir do ponto estacionário em qualquer direção implicará em um decréscimo na resposta $\hat{y}$. Neste caso, $\mathbf{x}_0$ é um ponto de máximo. Caso $\lambda_i > 0$, um deslocamento a partir do ponto estacionário em qualquer direção implicará em um acréscimo na resposta $\hat{y}$. Neste caso, $\mathbf{x}_0$ representa um ponto de mínimo. Se as raízes características possuírem sinais diferentes, então $\mathbf{x}_0$ é um ponto de sela. (JEFF WU; HAMADA, 2000)

Neste trabalho, a análise canônica foi realizada através de uma rotina implementada no *software Maple 7*. A determinação dos parâmetros de regressão do modelo (Equação 3.7.2) foi feita utilizando-se o *software Statistica 5*.

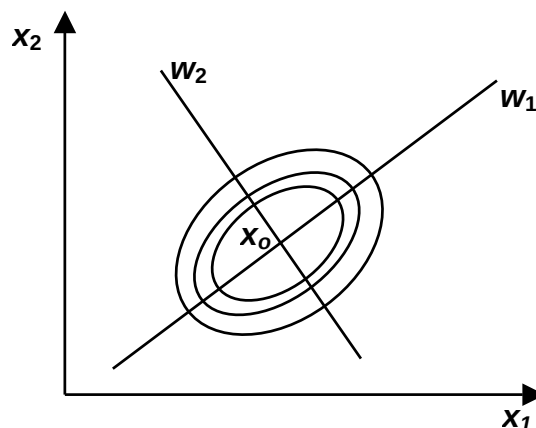


Figura 3.2 – Forma canônica para uma superfície de resposta em duas variáveis.

3.8 – Modelagem da produção fermentativa do ácido láctico

3.8.1 – Modelo de crescimento

Neste trabalho, optou-se pelo modelo logístico para descrever o crescimento do *Lactobacillus helveticus* durante a fermentação do soro de queijo:

$$X = \frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o (e^{\mu_{\max} t} - 1)} \quad (3.17)$$

Esta equação foi escolhida por possuir um sólido embasamento teórico e uma completa dedução matemática, além de mostrar-se adequada para descrever o crescimento de microrganismos em vários estudos (WACHENHEIM *et al.*, 2003; CORRADINI *et al.*, 2006).

A concentração celular X (inclusive no início da fermentação, X_o) em função do tempo t foi obtida experimentalmente, através de medidas de densidade óptica à 650 nm. Os resultados foram convertidos em gramas de células por litro de meio, utilizando-se uma curva de calibração. O procedimento detalhado desta etapa encontra-se no Apêndice C.

Os parâmetros K e $\mu_{\max}$ foram obtidos através de estimação não linear, utilizando-se o *software* Statistica 5.0. As medidas de não linearidade destes parâmetros foram determinadas através de um programa desenvolvido em Fortran, escrito originalmente por RATKOWSKY (1983). Os cálculos seguem a metodologia descrita nos Itens 2.9.2.1 e 2.9.2.2. A listagem do programa, modificado apropriadamente para este estudo, encontra-se no Anexo A.

A velocidade instantânea de crescimento celular foi obtida derivando-se a Equação 2.8 em relação ao tempo de fermentação t :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o (e^{\mu_{\max} t} - 1)} - \frac{X_o^2 K \mu_{\max} (e^{\mu_{\max} t})^2}{(K + X_o (e^{\mu_{\max} t} - 1))^2} \quad (3.18)$$

Os resultados da concentração celular em função do tempo e das medidas de não linearidade, obtidos pelo modelo logístico, foram comparados com os obtidos pelo modelo de crescimento proposto por Amrane (Equação 2.12):

$$X = X_o \exp \left[\mu_{\max} t - \frac{\mu_{\max}}{d} \left(\ln \frac{\mu_{\max} - c + c \cdot \exp(d \cdot t)}{\mu_{\max}} \right) \right] \quad (2.12)$$

Onde os parâmetros $\mu_{\max}$, c e d foram determinados por estimação não linear.

3.8.2 – Modelo de formação do produto

Para descrever a formação do produto, optou-se pelo modelo clássico de Luedeking e Piret (1959):

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX}{dt} + BX \quad (3.19)$$

Que combinada com as Equações 3.17 e 3.18 resulta em:

$$\frac{dP}{dt} = A \left(\frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1)} - \frac{X_o^2 K \mu_{\max} (e^{\mu_{\max} t})^2}{(K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1))^2} \right) + B \frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1)} \quad (3.20)$$

Cálculo de A e B

Os parâmetros A e B foram calculados através de regressão dos resultados de X, dX/dt e dP/dt, utilizando a Equação 3.19. Os valores de X e dX/dt utilizados nessa estimação foram calculados através das Equações 3.17 e 3.18, respectivamente. Para se obter os valores de dP/dt, inicialmente tentou-se encontrar uma função que melhor representasse a concentração do produto em função do tempo, já que equações polinomiais não se ajustam bem nas fases lag e estacionária. Portanto, a seguinte equação empírica foi ajustada aos resultados experimentais:

$$P = \frac{K_p}{K_p e^{-r \cdot t} + 1} \quad (3.21)$$

Esta equação descreve uma curva sigmoideal, semelhante à curva descrita pelo modelo logístico. Os parâmetros K_p e r correspondem, respectivamente, à concentração teórica máxima do produto e ao valor máximo de $(1/P)(dP/dt)$, e foram estimados por regressão não linear. Os valores de dP/dt utilizados na estimação dos parâmetros A e B foram obtidos derivando-se a Equação 3.21 em relação ao tempo:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{K_p^2 r e^{-rt}}{(K_p e^{-rt} + 1)^2} \quad (3.22)$$

3.8.3 – Modelo de consumo do substrato

Neste estudo, o substrato utilizado, além de ser uma fonte de carbono, também propicia energia para as células. Logo, a taxa de consumo desse substrato para fins de manutenção celular deve ser levada em consideração (CASABLANCAS; SANTÍN, 1998) e o modelo de consumo de substrato proposto por Pirt pode ser aplicado (BONOMI; SCHIMIDELL, 2001):

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{X/S}^*} \frac{dX}{dt} + m_S X \right) \quad (3.23)$$

m_S = coeficiente de consumo específico para manutenção de energia (h^{-1}).

$Y_{X/S}^*$ = fator real de conversão de substrato para células (g células/g substrato).

Vale ressaltar que, quando o valor de m_S é muito pequeno, $Y_{X/S}^* = Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S$.

A Combinação das Equações 3.17, 3.18 e 3.23 resulta em:

$$-\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1)} - \frac{X_o^2 K \mu_{\max} (e^{\mu_{\max} t})^2}{(K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1))^2} + m_S \frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1)} \right) \quad (3.24)$$

Os parâmetros $Y_{X/S}$ e m_S foram calculados através de regressão dos resultados de X , dX/dt e dS/dt , utilizando a Equação 3.23. Os valores de X e dX/dt utilizados nessa estimativa foram calculados através das Equações 3.17 e 3.18, respectivamente. Para se obter os valores de dS/dt , inicialmente tentou-se encontrar uma função que melhor representasse a concentração do substrato em função do tempo, já que equações polinomiais não se ajustam bem nas fases lag e estacionária. Portanto, a seguinte equação empírica foi ajustada aos resultados experimentais:

$$S = K_o e^{-(a \cdot t)^2} \quad (3.25)$$

O parâmetro K_o representa a concentração inicial de substrato, e a é um parâmetro de ajuste empírico, de dimensão h^{-1} .

Os valores de dS/dt utilizados na estimativa dos parâmetros $Y_{X/S}$ e m_S foram obtidos derivando-se a Equação 3.25 em relação ao tempo:

$$\frac{dS}{dt} = -2t K_o a^2 e^{-(at)^2} \quad (3.26)$$

Neste trabalho, escolheu-se as Equações 3.17, 3.18 e 3.24 para descrever o crescimento do microrganismo e as velocidades de formação do produto e de consumo de substrato, durante a fermentação homoláctica do soro de queijo pelo *Lactobacillus helveticus*.