



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ALEXANDRE DE ARAUJO GUILHERME

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus*  
*casei* NRRL B-442 EM SUCO DE CAJU CLARIFICADO**

FORTALEZA  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALEXANDRE DE ARAUJO GUILHERME

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus casei* NRRL B-442 EM SUCO DE CAJU CLARIFICADO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sueli Rodrigues

G974o Guilherme, Alexandre de Araújo  
Otimização da produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei* NRRL  
B-442 em suco de caju clarificado / Alexandre de Araújo Guilherme, 2009.  
120f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes  
Co-orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues  
Área de concentração: Reatores químicos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2009.

1. Caju 2. *Lactobacillus casei* NRRL B-442 3. Bioprocessos  
4. Modelagem 5. Otimização I. Fernandes, Fabiano André Narciso (orient.)  
II. Rodrigues, Sueli (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará –  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química IV. Título

CDD 660

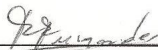
ALEXANDRE DE ARAUJO GUILHERME

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus casei* NRRL B-442 EM SUCO DE CAJU CLARIFICADO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 21/08/09.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dra. Sueli Rodrigues (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dra. Telma Teixeira Franco  
Universidade Estadual de Campinas - FEQ/UNICAMP



Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CNPAT

*Dedico este trabalho de pesquisa ao meu pai, **Antonio Guilherme**, por ter sido minha referência de vida acadêmica e por ter doado sua vida em prol dos mais necessitados e à minha mãe, **Maria Eliane**, por todo amor e paciência dedicada à nossa família.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por nos conceder a vida com infinitos propósitos, sendo um deles a oportunidade da evolução espiritual.

Aos meus pais, Antonio Guilherme e Maria Eliane, por estarem sempre presentes nos momentos de alegrias e de dificuldades, por toda a educação e princípios ensinados até o presente.

Ao casal de professores: Dr. Fabiano Fernandes e Dra. Sueli Rodrigues, por me receberem de braços abertos quando tinha pretensões de realizar este trabalho, pela paciente orientação e oportunidade de sempre estar aprendendo dentro do laboratório e realizando novos projetos.

Ao meu irmão Eliezer por acompanhar meus pais nos momentos de dificuldades enquanto eu tive que trabalhar na minha dissertação de mestrado.

Ao meu padrinho Evandro por ser como um segundo pai para mim.

À Suelane por estar comigo há cinco anos nesta caminhada e pela paciência dedicada a mim. E aos seus pais por serem como uma segunda família.

A todos que acreditam na minha capacidade e apóiam meus estudos.

Aos amigos que conheci durante a caminhada da vida, em especial: Gleiciane, Hipólito, Bruno, João, Laura, Daniele, Rômulo, Adalta, Lopes, Sanderson e Thaís.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia Vegetal Prof. Dr. Fernando Monteiro (*in memoriam*) e à estudante Neuza Félix por terem sido meus primeiros contatos em um laboratório, e pela amizade fora da universidade.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia com quem tive dois anos de convivência, Profa. Suzana Silveira, Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Melo, Prof<sup>a</sup>. Juliana e aos amigos Alysson, Natacha, Denise, Rafaela, Vanessa, Talita, Sarah, Gardênia, Eliane, Simone, Gleicy, Fernanda e Rivalda por terem participado do meu crescimento acadêmico e pela amizade.

Ao Dr. Gustavo Saavedra e à Prof<sup>a</sup>. Dra. Sueli Rodrigues por me concederem o primeiro projeto de pesquisa da minha carreira acadêmica.

Aos antigos e atuais companheiros do Laboratório de Biotecnologia: Talita, Anita, Carla, Anaisa, Luiz Carlos, Simone, Raquel, Mauro, Imilena, Cristiane, Soraya, Ana Laura, Tatiana Maciel, Mayra, Samara, Thatyane Vidal, Jonas, Tiago, Isabel, Jéssica, Rosane, Jamile e Carolinne; pelo companheirismo, ajuda e amizade no ambiente de trabalho e fora da universidade.

Agradeço em especial as minhas duas amigas Cláudia e Mariana que participaram deste projeto ao qual se dividiu em três dissertações distintas. Agradeço pela amizade dentro e fora do laboratório e toda a ajuda durante as realizações dos experimentos que duravam madrugadas inteiras.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química que me receberam de braços abertos na Pós-graduação, em especial Jocélia, Tigressa Helena, Valdez, Juan Sancho, Joucyane, Imilena, Fracielle, Leonardo, Alexandre, Diôgo, Vivian, Leise, Darlane, Mirela, Cícero, Eveline, Elaine, Enio, Larissa, Yguatiara e Andréa.

Aos os professores do Departamento de Engenharia Química, pela competência, pelos ensinamentos e colaboração durante o curso de mestrado.

À secretária do curso de Pós-Graduação, Maria, por sua dedicação e ajuda no decorrer do curso e pela amizade.

À Universidade Federal do Ceará, pela possibilidade de cursar o mestrado e seguir a carreira acadêmica.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo durante todo o curso e pelo apoio financeiro.

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo fornecimento do suco de caju utilizado neste experimento, e pelo suporte técnico.

Aos membros da banca examinadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Telma Teixeira Franco e Dr. Gustavo Saavedra Pinto que aceitaram o convite para participar da banca de avaliação deste trabalho.



*“O preconceito é uma pedra no caminho onde  
passa a evolução da humanidade.”*

*(Alexandre Guilherme)*

## RESUMO

O ácido láctico é um composto com diversas aplicações industriais, dos quais as indústrias química, farmacêutica, de alimentos, de polímeros, têxtil e de curtume podem ser citadas além de ser reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA). Tem se tornado um importante monômero na indústria de plásticos, sendo polimerizado em plástico biodegradável. Pode ser obtido industrialmente através de síntese química ou processo fermentativo. No entanto, é mais comumente produzido via processo fermentativo através de matérias-primas renováveis e resíduos da agroindústria. O pedúnculo do caju possui um alto valor nutricional em termos de vitaminas, sais minerais e açúcares e estima-se que 88% de sua produção seja perdida devido sua alta perecibilidade sendo, portanto, um substrato em potencial para processos fermentativos. O objetivo deste trabalho foi a otimização da produção de ácido láctico via fermentação submersa em meio contendo suco de caju clarificado como substrato utilizando o *Lactobacillus casei* NRRL B-442. A partir de dados experimentais sobre temperatura, pH, concentrações de substrato e sulfato de amônia inicial, foi realizado um estudo cinético variando concentrações de substrato inicial de 20 a 60 g/L e mantendo a proporção ideal de 12% de sulfato de amônio em relação aos açúcares redutores totais iniciais. Os ensaios foram realizados em reator batelada CSTR de 1,0 L com 0,5 L de meio reacional. A temperatura foi de 37°C e o pH foi ajustado para 6,5 sendo controlado durante o processo. A partir dos dados experimentais, um modelo fenomenológico foi desenvolvido e um programa computacional foi criado utilizando Linguagem Fortran 90. O modelo foi validado estatisticamente segundo o valor de F de Fisher. Com o modelo representativo do sistema, foi possível realizar otimizações em batelada e batelada alimentada para a fermentação láctica. Os processos em batelada e batelada alimentada foram comparados entre si levando em consideração a eficiência final, a produção de ácido láctico e os custos com matéria-prima e reagentes utilizados comparando com os custos de venda final do ácido láctico no mercado. Para a otimização em batelada, pôde-se verificar que a fermentação que apresentou melhores resultados foi a que partiu de um inóculo com 0,3 g/L e concentração de açúcares redutores totais iniciais de 50 g/L finalizando o processo com 39,31 g/L de ácido láctico e apresentando uma eficiência de 72,2%. Em relação ao processo em batelada alimentada, conclui-se que a simulação que apresentou melhores resultados foi a que partiu de um inóculo de 0,3 g/L com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais, uma vazão de 3 L/h e uma concentração de suco de caju clarificado concentrado alimentado de 200 g/L obtendo 38,0 g/L de ácido láctico e uma eficiência de 63,8%. Portanto, para a fermentação láctica utilizando o *Lactobacillus casei* NRRL B-442 tendo o suco e caju clarificado como substrato, o processo em batelada foi o mais vantajoso.

Palavras-chave: caju, ácido láctico, *Lactobacillus casei* NRRL B-442, estudo cinético, modelagem e otimização.

## ABSTRACT

Lactic acid is a compound that has several industrial applications in the chemical, pharmaceutical, food, polymer, textile and tanning industries. In addition, lactic acid has been recognized as safe by the Food and Drug Administration (FDA). Lactic acid has become an important monomer in the plastic industry where it has been polymerized into biodegradable plastics. It can be obtained industrially by chemical synthesis or fermentation process. It is most commonly produced by fermentation process using raw materials and waste materials of agricultural source. Cashew apple has a high nutritional value in terms of vitamins, minerals and sugars and it is estimated that 88% of its production is lost due to the high spoilage, thus it has great potential as substrate in fermentative processes. This work aimed to optimize lactic acid production by submerged fermentation in a medium containing clarified cashew apple juice as substrate using the *Lactobacillus casei* NRRL B-442. From available information in the literature regarding temperature, pH, initial concentrations of substrate and initial ammonium sulfate, a kinetic study was carried out changing the initial concentration of substrate from 20 to 60 g/L and maintaining the ideal ratio of 12% of ammonium sulfate in relation to the initial total reducing sugars. The experiments were carried out in a batch reactor of 1.0 L with 0.5 L of reaction medium. The temperature was set at 37 °C and the pH was adjusted to 6.5 and controlled during the process. From the experimental data, a phenomenological model was developed and a computer program was built in Fortran 90. The mathematical model was statistically validated according to the F value of the Fisher test. With the representative model of the reaction system, it was possible to accomplish optimizations in batch and fed-batch fermentation for lactic acid production. The results in batch and fed-batch were compared, in relation to the final efficiency of the system, lactic acid production and costs of raw materials and reagents, with the costs of the final price of the lactic acid in the market. For the optimization in batch reaction, it was found that the fermentation which had the best results was obtained from an inoculum of 0.3 g/L and a initial concentration of total reducing sugars of 50 g/L, resulting in the production of 39.31 g/L of lactic acid and an efficiency of 72.2%. Regarding the fed-batch process, the simulations showed that the best results was obtained from an inoculum of 0.3 g/L with 40 g/L of initial total reducing sugars, with a feed of clarified cashew apple juice at flow rate of 3 L/h and a concentration of 200 g/L, resulting in the production of 38.0 g/L of lactic acid concentration and an efficiency of 63.8%. Therefore, for lactic fermentation using *Lactobacillus casei* NRRL B-442 and the clarified cashew juice as substrate and the conditions studied in this work, the process in batch was the most advantageous.

**Keywords:** cashew, lactic acid, *Lactobacillus casei* NRRL B-442, kinetic study, modeling and optimization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Representação gráfica da localização da Biotecnologia Industrial frente às outras áreas de conhecimentos ligadas a processos biológicos.....	25
FIGURA 2	Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas homofermentativas.....	37
FIGURA 3	Fermentador TECNAL, modelo TE-420 de 1,0 L.....	50
FIGURA 4	Resultado experimental do estudo cinético realizado em suco de caju clarificado com meio contendo 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 6 g/L de sulfato de amônio para o crescimento microbiano, produção de ácido láctico bem como o consumo de substrato.....	53
FIGURA 5	Comportamento microbiano estimado pela modelagem para a fermentação láctica no processo em batelada tendo como substrato o suco de caju clarificado utilizando o <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442.....	60
FIGURA 6	Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 2,4 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.....	64
FIGURA 7	Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico ( $\blacksquare$ ) e consumo de substrato ( $\square$ ) para a fermentação com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 2,4 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.....	64
FIGURA 8	Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 3,6 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.....	65
FIGURA 9	Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico ( $\blacksquare$ ) e consumo de substrato ( $\square$ ) para a fermentação com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 3,6 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.....	65

FIGURA 10	Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 4,8 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.....	66
FIGURA 11	Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico (■) e consumo de substrato (□) para a fermentação com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 4,8 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.....	66
FIGURA 12	Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 6,0 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.....	67
FIGURA 13	Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico (■) e consumo de substrato (□) para a fermentação com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 6,0 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.....	67
FIGURA 14	Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 7,2 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.....	68
FIGURA 15	Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico (■) e consumo de substrato (□) para a fermentação com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 7,2 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.....	68
FIGURA 16	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para o processo em batelada otimizado por simulação computacional com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.....	73
FIGURA 17	Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	78

FIGURA 18	Resultados da produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	79
FIGURA 19	Resultados da primeira modelagem para o crescimento microbiano ( $\diamond$ ) e sua regressão não-linear (—).....	94
FIGURA 20	Resultados da primeira modelagem para a produção de ácido láctico (■) e sua regressão não-linear (--) e para o consumo de substrato (□) e sua regressão não-linear (—).....	95
FIGURA 21	Resultados da segunda modelagem para o crescimento microbiano ( $\diamond$ ) e sua regressão não-linear (—).....	96
FIGURA 22	Resultados da segunda modelagem para a produção de ácido láctico (■) e sua regressão não-linear (--) e para o consumo de substrato (□) e sua regressão não-linear (—).....	97
FIGURA 23	Resultados da terceira modelagem para o crescimento microbiano ( $\diamond$ ) e sua regressão não-linear (—).....	98
FIGURA 24	Resultados da terceira modelagem para a produção de ácido láctico (■) e sua regressão não-linear (--) e para o consumo de substrato (□) e sua regressão não-linear (—).....	99
FIGURA 25	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,1 g/L de inóculo.....	100
FIGURA 26	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 70 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,1 g/L de inóculo.....	101
FIGURA 27	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,2 g/L de inóculo.....	102
FIGURA 28	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 70 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,2 g/L de inóculo.....	103
FIGURA 29	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.....	104

FIGURA 30	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.....	105
FIGURA 31	Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 70 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.....	106
FIGURA 32	Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	107
FIGURA 33	Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	108
FIGURA 34	Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 5 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	109
FIGURA 35	Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 5 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	110
FIGURA 36	Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 7 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	111
FIGURA 37	Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 7 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	112
FIGURA 38	Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	113
FIGURA 39	Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	114

FIGURA 40	Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	115
FIGURA 41	Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	116
FIGURA 42	Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 100 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	117
FIGURA 43	Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 100 g/L de suco de caju concentrado alimentado.....	118



## LISTA DE TABELAS

1.	Características química e físico-química do pedúnculo do caju.....	30
2.	Composição de minerais, açúcares redutores totais e proteínas do suco de caju clarificado.....	32
3.	Composição do meio MRS ( <i>Man, Rogosa e Sharpe</i> ).....	47
4.	Resultados da produção de ácido láctico, eficiência e produtividade máxima para o estudo cinético em suco de caju clarificado com <i>L. casei</i> na fermentação láctica.....	54
5.	Resultados das constantes cinéticas para o modelo proposto na quarta modelagem para a fermentação de ácido láctico em suco de caju clarificado utilizando o <i>L. casei</i> .....	63
6.	Resultados para o teste de F de Fisher e do ajuste $R^2$ para do modelo matemático proposto para representar a fermentação láctica utilizando o <i>L. casei</i> em suco de caju clarificado como meio de cultura.....	69
7.	Valores de custo dos reagentes, matéria-prima e água utilizada na fermentação láctica e o custo do ácido láctico a preço de venda final.....	72
8.	Resultados das simulações em batelada para otimização do processo de fermentação láctica.....	72
9.	Combinações de inóculo, açúcares redutores totais iniciais, vazão de alimentação e concentração de alimentação do suco de caju concentrado para as simulações realizadas em batelada alimentada.....	77
10.	Resultados das simulações em batelada alimentada para a otimização da fermentação láctica.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

AL	Ácido lático
ARTA	Açúcares redutores totais adicionados ao processo em batelada alimentada
ARTI	Açúcares redutores totais iniciais
ARTR	Açúcares redutores totais residuais
CAL	Concentração de alimentação de substrato no processo em batelada alimentada
IN	Inóculo no meio de cultura
SA	Sulfato de amônio
SIM	Simulações

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$\mu$	Taxa específica de crescimento microbiano ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{max}$	Taxa máxima específica de crescimento microbiano ( $\text{h}^{-1}$ )
$S$	Substrato consumido ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$K_s$	Constante de saturação de Monod ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X$	Biomassa formada ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$B$	Constante relacionada à competição por substrato entre microrganismo na fase estacionária
$K_i$	Constante de inibição no modelo de Andrews ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$P$	Ácido láctico produzido ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$K_p$	Constante relacionada à inibição pelo lactato no crescimento microbiano ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$Y_{x/s}$	Fator de conversão do substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{p/s}$	Fator de conversão do substrato em produto ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$m$	Constante relacionada ao substrato para manutenção celular ( $\text{h}^{-1}$ )
$Y_{p/x}$	Fator de conversão biomassa em produto ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$\alpha$	Constante de produção de ácido láctico associado à taxa de crescimento celular ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$\beta$	Constante de produção de ácido láctico não-associada à taxa de crescimento celular ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$P_{max}$	Quantidade máxima de lactato que inibe a produção de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X_f$	Biomassa final ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X_0$	Biomassa inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S_f$	Substrato final consumido ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S_0$	Substrato inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$P_f$	Produto final formado ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$P_0$	Produto inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$\eta$	Eficiência do processo (%)
$P_r$	Produtividade em ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$K_c$	Constante relacionada à carência de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$K_e$	Constante relacionada ao excesso de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$C_s$	Constante relacionada à taxa de consumo de substrato ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$K_d$	Constante relacionada à taxa de morte celular ( $\text{h}^{-1}$ )

$F_{cal}$	F de Fisher calculado para as variáveis do modelo
$F_{tab}$	F de Fisher tabelado para os graus de liberdade do modelo
$R^2$	Ajuste do modelo testado
$R\$$	Moeda brasileira (Real)
$US\$$	Moeda norte-americana (Dolar)

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos gerais sobre a Biotecnologia.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Rejeitos industriais com potencial na Indústria de Bioprocessos.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3</b>	<b>Caju.....</b>	<b>28</b>
2.3.1	Aspectos gerais sobre o Caju.....	28
2.3.2	Suco de caju.....	31
<b>2.4</b>	<b>Ácido lático.....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Aspectos gerais sobre o Ácido Lático.....	33
2.4.2	Síntese do ácido lático.....	34
2.4.3	Aplicações do ácido lático.....	35
<b>2.5</b>	<b>Microrganismos produtores de ácido lático.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6</b>	<b><i>Lactobacillus casei</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>2.7</b>	<b>Monitoração e controle de Processos Biotecnológicos.....</b>	<b>38</b>
<b>2.8</b>	<b>Modelos cinéticos aplicado a Processos Fermentativos.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>FERMENTAÇÃO DO SUCO DE CAJU CLARIFICADO E OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Metodologia experimental.....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Obtenção da linhagem de <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442.....	46
3.2.2	Ativação do microrganismo.....	46
3.2.3	Preparo de cultura-estoque de <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442 em glicerol.....	47
3.2.4	Preparo do inóculo para os ensaios cinéticos.....	47
3.2.5	Obtenção do suco de caju clarificado.....	48
3.2.6	Estudo cinético da produção de ácido lático a partir do suco de caju clarificado.....	48
3.2.7	Determinação dos valores de pH.....	51
3.2.8	Determinação dos açúcares redutores totais do suco de caju clarificado e das amostras fermentadas.....	51
3.2.9	Determinação de ácido lático.....	51
3.2.10	Determinação do crescimento microbiano.....	52
3.2.11	Cálculos de eficiência e produtividade para o estudo cinético.....	52
<b>3.3</b>	<b>Resultados do estudo cinético em suco de caju clarificado utilizando o <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442.....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EM BATELADA.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Modelo matemático.....</b>	<b>57</b>
4.2.1	Primeira modelagem.....	57
4.2.2	Segunda modelagem.....	59
4.2.3	Terceira modelagem.....	60
4.2.4	Quarta modelagem.....	61
<b>4.3</b>	<b>Parâmetros cinéticos e ajuste do modelo em batelada.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4</b>	<b>Otimização em batelada.....</b>	<b>70</b>

<b>5</b>	<b>MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EM BATELADA ALIMENTADA.....</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>74</b>
<b>5.2</b>	<b>Modelo matemático.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3</b>	<b>Otimização em batelada alimentada.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE A – Resultados da primeira, segunda e terceira modelagem.....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE B – Resultados das simulações em batelada.....</b>	<b>100</b>
	<b>APÊNDICE C – Resultados das simulações em batelada alimentada.....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O ácido láctico pode ser obtido industrialmente através de síntese química ou processo fermentativo (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2005). Na síntese química, são produzidos misturas racêmicas de D e L-ácido láctico a partir da hidrólise de lactonitrila por ácidos fortes ou outras rotas químicas (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Já, via processo fermentativo, é obtido através da fermentação de matérias-primas renováveis e resíduos da agroindústria podendo ser obtido apenas a forma L- ácido láctico (SILVEIRA, 2009).

É um composto com diversas aplicações industriais, dos quais as indústrias química, farmacêutica, de alimentos, de polímeros, têxtil e de curtume podem ser citadas, além de ser reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA).

Tem se tornado um importante monômero na indústria de plásticos, sendo polimerizado em plástico biodegradável utilizado para confecção de embalagens, incluindo embalagens para alimentos (GAO *et al.*, 2006a; HIRATA *et al.*, 2005). Polímeros a base de ácido láctico são também aplicados na produção de órgãos artificiais biocompatíveis, estruturas autodissolúveis e veiculadores de drogas com liberação controlada (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2005). Também pode ser benéfico para a circulação sanguínea e contribui para o balanço de ácidos e bases no corpo humano (MALBASA; LONCAR; DJURIC, 2007).

A taxa de consumo de ácido láctico tem crescido em média 15 % ao ano e um mercado de aproximadamente 390 mil toneladas/ano foi estimado para 2008 (TONG *et al.*, 2004). A produção de ácido láctico a partir da fermentação microbiana representa mais de 50 % da produção mundial (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2005). Com o objetivo de se reduzir custos industriais, o uso de matérias-primas como soro de leite, melão, amido, beterraba, cana de açúcar e outros produtos ricos em nutrientes, foi estudado para a produção de ácido láctico (ANURADHA *et al.*, 1999; RITCHER; BERTHOLD, 1998; TSAO *et al.*, 1999; VISHNU *et al.*, 2000).

Com o uso de resíduos industriais de baixo custo na indústria de processos fermentativos se obtém produtos a preços competitivos no mercado e uma redução nos rejeitos industriais poluentes do meio ambiente. Aproximadamente 3,5 bilhões de toneladas de resíduos foram produzidos no mundo no início da década (PANDEY *et al.*, 2001).

O cajueiro é uma planta rústica, originária do Brasil, típica de regiões de clima tropical sendo especialmente encontrada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, representando, neste último, grande importância econômica. É responsável pela geração de emprego, renda e impostos, em decorrência dos produtos industrializados oriundos do seu fruto e pseudofruto (PETINARI; TARSITANO, 2002).

É a castanha de caju que apresenta grande valor comercial tanto no Brasil como no exterior, desta forma, o pseudofruto, ou pedúnculo, acaba por ser subutilizado (SANCHO, 2006). Portanto, estima-se que o aproveitamento do pedúnculo para industrialização seja inferior a 12% da produção (LIMA, 2008). Dentre os fatores que influenciam no aproveitamento estão à alta perecibilidade do pedúnculo do caju associada ao curto período da safra e a inexistência de métodos econômicos de preservação da matéria-prima (COSTA, 1999).

No suco de caju encontram-se diversos minerais em sua composição, dos quais se destacam o potássio, zinco, manganês e ferro. O suco apresenta uma considerável quantidade de açúcares redutores e uma pequena fração de proteínas (RABELO, 2008).

O aumento da competição global tem exercido considerável pressão no sentido de se operar de forma mais eficiente com plantas existentes. Para alcançar esse objetivo tem-se utilizado cada vez mais os recursos computacionais que permitem uma melhor monitoração e controle do processo e conseqüentemente, operações mais eficientes nas plantas industriais.

Mesmo assim, a indústria de fermentação apresentou certo atraso na implementação de tecnologia de controle e otimização por certas razões, tais como: processos fermentativos são complexos do ponto de vista reacional, falta de medidas confiáveis em linha de processo e dificuldades de se definir um modelo cinético que forneça a relação entre crescimento microbiano e produto formado (LIM; LEE, 1991). Tais dificuldades fazem com que não se possam obter medidas confiáveis em tempo real (SILVA, 2003).

A modelagem matemática surge como uma valiosa ferramenta para a sua descrição, simplificando a representação do processo, através de pequeno número de expressões cinéticas relativamente simples. Uma vez que os modelos matemáticos fornecem uma relação funcional entre as variáveis do processo, eles são idealmente convenientes para muitas tarefas nos projetos industriais (SILVA, 2003).

Visando redução de custo, desperdícios de matéria-prima e tempo de processo da fermentação láctica utilizando o *Lactobacillus casei* NRRL B-442 como biocatalisador em suco de caju clarificado como substrato, este trabalho teve como objetivos gerais:



- a) Obtenção de um modelo matemático cinético não-estruturado que descrevesse o sistema em batelada a partir de dados cinéticos experimentais;
- b) Obtenção de um modelo matemático cinético não-estruturado em batelada alimentada a partir do modelo obtido do processo em batelada;
- c) Otimizar os processos em batelada e batelada alimentada realizando simulações computacionais a partir dos modelos obtidos;
- d) Comparar as fermentações batelada e batelada alimentada a partir dos dados simulados obtidos para otimizar o processo de fermentação láctica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais sobre a Biotecnologia

Os processos fermentativos vêm sendo aplicados desde a Pré-História na produção de diversos produtos. Há 5000 anos se descobriu a produção de bebidas alcoólicas por fermentação e os Egípcios já faziam uso de pão mofado para curar feridas infectadas (TREVAN, 1990). Com a descoberta de Pasteur por volta de 1850 sobre as contaminações de bactérias acéticas que interferiam no processo de fabricação dos vinhos e cervejas o ramo da dos processos fermentativos já começa a aparecer no horizonte (PELCZAR, 1996). Com a descoberta da Penicilina por Fleming em 1928 (PELCZAR, 1996) surge uma nova área a ser explorada pela biotecnologia, a indústria dos antibióticos. No entanto, sua descoberta não foi valorizada de início. Em 1940, Sir. Howard Florey e Ernst Chain, de Oxford, retomaram as pesquisas de Fleming e conseguiram produzir penicilina com fins terapêuticos em escala industrial, inaugurando uma nova era para a medicina - a era dos antibióticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

A partir do desenvolvimento da indústria dos antibióticos, nas décadas de quarenta e cinquenta, os processos biotecnológicos apresentaram rápido progresso. Inúmeras substâncias com alto valor comercial como enzimas, peptídeos e aminoácidos, ácidos orgânicos, fármacos, vitaminas dentre outros, são produzidas por processos bioquímicos, que muitas vezes são a única forma de obtenção ou se mostram mais viáveis do ponto de vista econômicos quando comparados com as sínteses químicas (SILVA, 2003).

Nos processos fermentativos existem duas formas básicas de bioconversão: uma se faz utilizando enzimas especializadas para o processo escolhido e a outra se faz utilizando células de microrganismos, animais ou vegetais para a produção de um produto específico (TREVAN, 1990). Nos processos fermentativos caracterizados por uso de microrganismos, basicamente se tem a transformação de um substrato que pode ser de natureza protéica, lipídica, ser um carboidrato ou outro componente, em um produto principal requerido, uma gama de produtos secundários e a formação de biomassa celular (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os processos fermentativos, utilizando microrganismos, podem ser realizados de duas principais formas: fermentação líquida, onde a cultura microbiana realiza a conversão estando completamente submersa em um meio líquido ou na superfície deste, e as

fermentações semi-sólidas onde se utiliza uma matriz sólida umedecida com água ou uma solução de nutriente, onde o microrganismo cresce realizando as conversões desejadas (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A aplicabilidade dos processos fermentativos se estende por vários campos, tais como: produção de fármacos e vitaminas, produção de substâncias das mais diversas, produção de gases como fonte renovável de energia, produção de células, produção de bebidas e alimentos fermentados, recuperação de ambientes degradados por poluentes, conhecido como Biorremediação, tratamento de efluentes e até na Lixiviação de metais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

A biotecnologia está passando por uma evolução, com aplicação de conhecimentos e metodologias provenientes de diferentes áreas acadêmicas, tais como; engenharia genética, biologia molecular, química combinatória, engenharia bioquímica, informática dentre outros (SILVA, 2003). A Figura 1 adaptada de um artigo publicado pelo Prof. Rainer Jonas é uma boa representação gráfica da localização da Biotecnologia Industrial frente às outras áreas de conhecimentos ligadas a processos biológicos (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

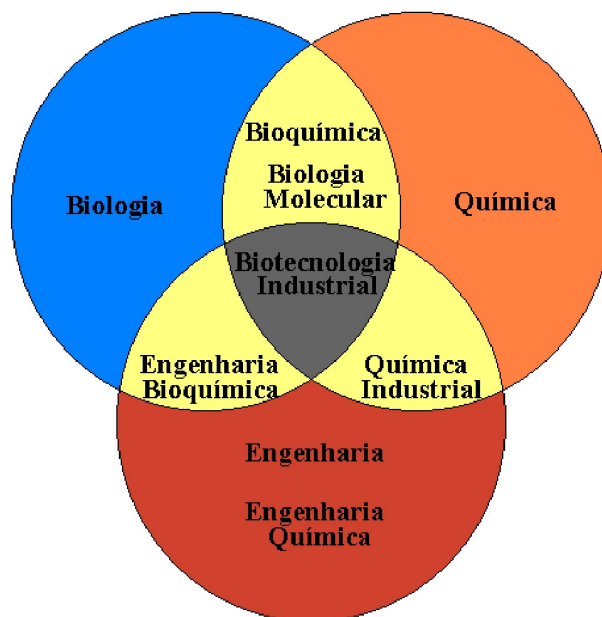


Figura 1 - Representação gráfica da localização da Biotecnologia Industrial frente às outras áreas de conhecimentos ligadas a processos biológicos.

FONTE: SILVA (2003).

## 2.2 Rejeitos industriais com potencial na Indústria de Bioprocessos

Com o uso de resíduos industriais de baixo custo na indústria de processos fermentativos é possível obter produtos a preços competitivos no mercado e uma redução nos rejeitos industriais poluentes do meio ambiente. Aproximadamente 3,5 bilhões de toneladas de resíduos foram produzidos no mundo no início desta década (PANDEY *et al.*, 2001).

Substratos alternativos têm sido estudados para se reduzir o custo de processos fermentativos para a produção de substâncias utilizadas nas indústrias química, farmacêutica, petroquímica e de alimentos (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2005; ADHAM, 2002; EL-SAMRAGY *et al.*, 1996; HANG; WOODAMS, 2000; KUERBANOGU, 2004; KUMASR *et al.*, 2003a; KUMASR *et al.*, 2003b; STREDANSKA *et al.*, 1993; STREDANSKY *et al.*, 1999; TONY *et al.*, 2004; VAZQUEZ *et al.*, 2006). Resíduos e subprodutos da agroindústria são apropriados para processos fermentativos, sendo substratos ricos em carbono, vitaminas, nitrogênio e minerais (HONORATO *et al.*, 2007).

Diversos autores reportaram o uso de substratos alternativos para produção de ácido cítrico tais como: casca de milho, chifre de carneiro, casca de abacaxi, casca de mandioca, bagaço de cana, melaços, etc (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2005; ADHAM, 2002; EL-SAMRAGY *et al.*, 1996; HANG; WOODAMS, 2000; KUERBANOGU, 2004; KUMASR *et al.*, 2003a; KUMASR *et al.*, 2003b).

Na última década tem se observado um crescimento no uso de resíduos da agroindústria como o bagaço da cana de açúcar e, através de diferentes processos, vários produtos tem sido obtidos como álcool, alcalóides, substâncias químicas, metabólitos, cogumelos, enzimas e ração animal enriquecida com microrganismos servindo como fonte de proteínas (PANDEY *et al.*, 2000a).

O melaço de beterraba foi descrito como sendo ótimo para processos fermentativos, devido aos seus constituintes como compostos orgânicos, vitaminas e minerais além de ser um produto de baixo custo (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006).

O bagaço de mandioca tem sido utilizado em processos fermentativos principalmente com fungos filamentosos. Os principais produtos obtidos são aromas e flavorizantes, entretanto também se observa a produção de ácidos orgânicos e cogumelos (PANDEY *et al.*, 2000b). Bagaço de mandioca hidrolisado foi utilizado para a produção de ácido cítrico pela levedura *Candida lipolytica* NRRL Y-1095 (VANDENBERGHE *et al.*, 1998). De forma similar, pode-se obter ácido fumárico a partir do bagaço de mandioca por

*Aspergillus niger* NRRL 2001 e *Candida lipolytica* (VANDENBERGHE *et al.*, 1998, VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

Foi relatado um estudo da produção de probióticos utilizando bactérias lácticas como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* utilizando o suco de beterraba como substrato como forma de substituir os produtos lácteos (YOON; WOODAMS; HANG, 2005).

Com o objetivo de se reduzir custos industriais, o uso de matérias-primas como soro de leite, melaço, amido, beterraba, cana de açúcar e outros produtos ricos em nutrientes, foi estudado para a produção de ácido láctico (ANURADHA *et al.*, 1999; RITCHER; BERTHOLD, 1998; TSAO *et al.*, 1999; VISHNU *et al.*, 2000).

O melaço é conhecido como uma fonte de carbono para fermentações de ácido láctico em escala industrial (WEE *et al.*, 2004). Nandasana e Kumar (2008) estudaram a produção de ácido láctico em melaço encontrando valores de 120 g/L. Caseína, chifre de carneiro e soja hidrolisados por ácidos têm sido usados para a fermentação de ácido láctico por bactérias lácticas (HSIEH; YANG; IANNOTTI, 1999; KWON *et al.*, 2000; KURBANOGLU; KURBANOGLU, 2003; YOO *et al.*, 1997). Gao (2006b) estudou a fermentação láctica a partir do hidrolisado ácido de restos de peixes acrescido de sais minerais e glicose obtendo até 100 g/L de ácido láctico.

Produtos amiláceos crus são um dos maiores fatores econômicos na produção láctica (REDDY, 2008). Espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* têm sido empregadas para a fermentação láctica a partir de substratos amiláceos crus tratados com enzimas (NAVEENA *et al.*, 2003; VISHNU *et al.*, 2002). Entretanto, foi reportado por Altaf *et al.*, (2005); Naveena *et al.*, (2003) e Vishnu *et al.*, (2000) a fermentação láctica a partir de substratos amiláceos com apenas um passo, a fermentação, utilizando uma bactéria amilolítica, o *Lactobacillus amylophilus*, sem necessidade de hidrólise enzimática do substrato amiláceo.

Outros substratos de baixo custo utilizados para a fermentação láctica são a semente de algodão, espiga de milho (VICKROY, 1985), farelo de trigo (NAVEENA *et al.*, 2005a), farinha de centeio (RACCACH; MAMIRO, 1997), açúcar do sorgo (RICHTER; TRAGER, 1994), celulose (VENKATESH, 1997), resíduos de cenoura (PANDEY *et al.*, 2001), e amido de batata (ANURADHA *et al.*, 1999).

Outro meio de cultura de baixo custo utilizado foi o xarope de milho (CSL) para produção de ácido láctico por *Lactobacillus coryniformis*, (BUSTOS *et al.*, 2004 ) e por *Lactobacillus delbrueckii* (TÉLLEZ – LUIS *et al.*, 2003). Foi relatada por Nancib *et al.*,

(2005) a produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* em suco de tâmara suplementado com várias fontes de nitrogênio (extrato de levedura, sulfato de amônia, tripticase de soja, uréia e caseína hidrolisada) e vitaminas do complexo B (ácido fólico, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e piridoxina).

Idris e Suzana (2005) relataram a produção de ácido láctico no líquido resíduo do abacaxi utilizando células de *Lactobacillus delbrueckii* imobilizadas com alginato de cálcio em fermentação batelada. Tachibana e Shindo (2004) utilizaram grãos gastos, que são resíduos da indústria cervejeira, para produção de ácido láctico utilizando o *Lactobacillus rhamnosus* NBRC3532 e NBRC14710 e o *Lactobacillus vaccinostraus* JCM1716. Os grãos usados foram liquidificados por tratamento de explosão de vapor para obtenção de açúcar fermentecível para metabolização por microrganismos.

O caju é apontado como fonte de carbono e de outros nutrientes para ser utilizado como substrato alternativo na produção de ácido láctico, dextranasacarase, oligossacarídeos, manitol e dextrana (HONORATO *et al.*, 2007). O bagaço fibroso do caju se apresenta com um potencial para fermentações semi-sólidas devido aos seus nutrientes e foi estudado por Pontes (2009) para a elaboração de um produto com potencial para uso como ração animal através de enriquecimento protéico do bagaço do caju utilizando o *Aspergillus níger* em fermentação semi-sólida.

## 2.3 Caju

### 2.3.1 Aspectos gerais sobre o Caju

O cajueiro é uma planta rústica, originária do Brasil, sendo típica de regiões de clima tropical. Trata-se de uma árvore popular na América do Sul, encontrada especialmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, representando, neste último, grande importância econômica, por ser responsável pela geração de emprego, renda e impostos, em decorrência dos produtos industrializados oriundos do seu fruto e pseudofruto (PETINARI; TARSITANO, 2002).

Em 2005, o Ceará ofereceu 95 mil toneladas de castanha como matéria-prima para as indústrias, enquanto que o estado do Piauí contribui com 50 mil, Rio Grande do Norte com

40 mil, Bahia com 6 mil e Maranhão com 5 mil toneladas. As exportações giram em torno de 2,0 milhões de caixas de amêndoas de castanha de caju, com 22,68 Kg ao preço médio de US\$ 100 por caixa, destinadas principalmente aos Estados Unidos da América (73% da produção), o Canadá (10%) e o restante para outros países da Europa como Holanda, França, Inglaterra. A cultura do caju no estado do Ceará envolve 57 mil produtores dos quais 76% se enquadram na faixa de 1 a 20 ha, (SINDICAJU, 2009a).

Segundo Aliyu (2008), a castanha de caju é produzida em aproximadamente 32 países com cerca de 2,7 milhões de toneladas produzidas em 2005 tendo sido principalmente produzida no Vietnã (960.800 toneladas), Nigéria (594.000), Índia (460.000), Brasil (147.629) e na Indonésia (122.000 toneladas).

O Brasil é reconhecido pela qualidade de suas amêndoas e pela confiabilidade nos fornecedores. A produção de castanha é distribuída, principalmente, nos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão e Bahia, com uma produção registrada, considerando a entrada da matéria-prima nas fábricas, de 325 mil toneladas (safra 2006/2007), oriunda de 700 mil hectares de área cultivada. As divisas geradas em 2007 com as exportações representaram US\$187 milhões para a região. Deste montante, o Ceará participou com US\$ 136 milhões (72%). A geração de emprego na cadeia produtiva foi de 300 mil postos de trabalho, distribuídos na atividade agrícola, industrial e serviços, em toda região nordeste (TEIXEIRA, 2009).

Em 2008 o Brasil exportou 35,4 mil toneladas de castanha de caju sendo 26 mil toneladas provenientes do Ceará representando 73,4% das exportações de castanha de caju (SINDICAJU, 2009b).

É a castanha de caju que apresenta grande valor comercial tanto no Brasil como no exterior, desta forma, o pseudofruto ou pedúnculo acaba por ser subutilizado. Este, que apresenta cerca de 10 vezes o peso da castanha, representa uma quantidade enorme de matéria-prima perdida anualmente. Valores esses, que chegam a quase um milhão de toneladas anuais no Estado do Ceará (SANCHO, 2006). Em 2007, o Brasil produziu 1.660.000 toneladas de pedúnculo de caju (FAO, 2009).

Deste modo, estima-se que o aproveitamento do pedúnculo para industrialização seja inferior a 12% da produção (LIMA, 2008). Dentre os fatores de influência estão a alta perecibilidade do pedúnculo do caju associada ao curto período da safra e a inexistência de métodos econômicos de preservação da matéria-prima (COSTA, 1999).

Segundo Costa *et al.* (2003), o Brasil é pioneiro e líder no aproveitamento de pedúnculo do caju. A utilização do pedúnculo do caju é considerada como uma boa fonte de

renda, além de apresentar várias opções tecnológicas de industrialização, principalmente quando aproveitado na elaboração de sucos, doces, refrigerantes, vinhos, polpas e outros produtos alimentícios e no consumo “*in natura*”, sendo bastante consumidos nos mercados interno e externo (SANCHO, 2006).

O fruto, a castanha, desenvolve-se por seis a oito semanas após a polinização, com o pedúnculo (maçã ou pseudofruto) desenvolvendo-se mais intensamente durante as duas últimas semanas. O fruto e o pedúnculo caem juntos e espontaneamente após sete a oito semanas (MENEZES; ALVES, 1995).

A composição do caju é bastante complexa e, se por um lado, a presença de vitaminas, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos tornam o caju um alimento importante nestes aspectos, por outro lado é responsável pela sua alta perecibilidade, exigindo cuidados especiais para a estocagem, transporte, limpeza e processamento. Ocorre uma série de transformações físicas e químicas durante o desenvolvimento e maturação do pedúnculo de cajueiro (GALVÃO, 2006). A composição físico-química do pedúnculo varia largamente em função, dentre outras, da variedade, estágio de maturação, tamanho, duração da colheita e variações ambientais regionais (SOUZA *et al*, 2002). Na Tabela 1 são apresentadas as características químicas e físico-químicas do pedúnculo de caju.

Tabela 1 - Características química e físico-química do pedúnculo do caju.

<b>Determinações</b>	<b>Valores</b>
Açúcares redutores totais (%)	8,0
Vitamina C (mg/100mL)	261,0
Acidez Total (em % de ácido cítrico)	0,35
Tanino (%)	0,35
Sólidos solúveis (°Brix)	10,7
Cálcio (mg/100g)	14,7
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (mg/100g)	32,55
Umidade (%)	86,33
pH	3,9

FONTE: SOARES (1986)



O valor nutritivo do pedúnculo de caju revela-se sob a forma de vitaminas e sais minerais (SOUZA *et al*, 2002), possuindo cerca de 156 mg a 387 mg de vitamina C, além de minerais como cálcio, ferro e fósforo. Além de vitaminas, vale ressaltar que, o caju também apresenta em sua composição carotenóides e antocianinas, pigmentos naturais responsáveis por sua coloração característica, que também exercem funções benéficas ao organismo (SANCHO, 2006). Silva e Naves (2001) salientam que o caju é considerado uma ótima fonte de vitamina C e boa fonte de vitaminas do complexo B, como riboflavina e tiamina.

No pedúnculo do caju, os principais açúcares encontrados são: maltose, sacarose, glicose, frutose, celobiose e rafinose. Na maioria dos trabalhos publicados verifica-se uma percentagem muito baixa de açúcares não-redutores. A glicose constitui o principal açúcar presente no pedúnculo do caju, seguido por frutose (PRICE *et al.*, 1975).

### 2.3.2 Suco de caju

Os sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas, também, por serem fontes naturais de carboidratos, carotenóides, vitaminas, minerais e outros componentes importantes. O Brasil consumiu em 2003 aproximadamente 2,2 bilhões de litros de sucos, nas mais diferentes formas. Destes, 579 mil litros são de sucos integrais, com destaque para caju (51%) e maracujá (24%) (PINHEIRO *et al.*, 2006).

Segundo a legislação brasileira que estabelece o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco tropical de caju, o suco de caju clarificado é definido como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.), através de processo tecnológico adequado. O suco de caju clarificado deve obedecer às características (BRASIL, 2000):

- Cor: variando de branco a amarelado;
- Sabor: próprio, levemente ácido e adstringente;
- Aroma: próprio.

A legislação brasileira define os seguintes limites: sólidos solúveis (°Brix a 20°C), mínimo 10; acidez total em ácido cítrico, mínimo 0,3 g/100 g; ácido ascórbico, mínimo 80 mg/100 g; e açúcares totais, naturais do caju, máximo 15 g/100 g (BRASIL, 2000).

O suco de caju é uma complexa mistura de vitaminas, polifenóis, açúcar, sais minerais, ácidos orgânicos, aminoácidos. É uma excelente fonte de vitamina C contendo aproximadamente seis vezes mais vitamina C do que o suco de laranja (VERGARA, 2007).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados referentes a determinação da composição de minerais, açúcares redutores totais e proteínas do suco de caju clarificado, segundo Fontes (2009).

Tabela 2 - Composição de minerais, açúcares redutores totais e proteínas do suco de caju clarificado.

<b>Macronutrientes</b>		<b>Micronutrientes</b>	
<b>Componente</b>	<b>(g/L)</b>	<b>Componente</b>	<b>(mg/L)</b>
Fósforo	1,21 ± 0,01	Cobre	< DL*
Potássio	13,13 ± 0,70	Ferro	6,97 x 10 <sup>-3</sup> ± 2,68 x 10 <sup>-3</sup>
Cálcio	< DL*	Zinco	11,20 x 10 <sup>-3</sup> ± 4,31 x 10 <sup>-3</sup>
Magnésio	1,17 ± 0,07	Manganês	6,40 x 10 <sup>-3</sup> ± 0,35 x 10 <sup>-3</sup>
Sódio	0,09 ± 0,00		
Enxofre	0,81 ± 0,02		
Açúcar redutor total	65,60 ± 6,14		
Proteínas	3,54 x 10 <sup>-4</sup> ± 0,00 x 10 <sup>-4</sup>		

DL\* - Limite de detecção

FONTE: FONTES (2009)

Conforme a Tabela 2 verifica-se que o suco de caju apresenta diversos minerais em sua composição, dos quais se destacam o potássio, zinco, manganês e ferro (FONTES, 2009).

O suco também apresenta uma considerável quantidade de açúcares redutores e uma pequena porção de proteínas, sendo desta forma, necessária a sua complementação com uma fonte de nitrogênio quando se pensa em fermentação láctica (SILVEIRA, 2009).

## 2.4 Ácido láctico

### 2.4.1 Aspectos gerais sobre o Ácido Láctico

O ácido láctico é um produto metabólico celular resultante da produção de ATP onde um mol de glicose é convertido em dois mols de ácido láctico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). Entretanto, outros açúcares podem ser transformados em ácido pirúvico e posteriormente serem reduzido a ácido láctico (LEHNINGER, 2000). Para os processos anaeróbios a fermentação é a via de obtenção de ATP onde se obtém etanol, CO<sub>2</sub>, alcoóis, acetofina, acetona dentre outros compostos, bem como se observa a produção de ácidos orgânicos dos quais o ácido láctico também é produzido (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). O piruvato é reduzido a lactato quando recebe um H<sup>+</sup> do NADH para se oxidar a NAD<sup>+</sup> e continuar a atuar na via glicolítica (LEHNINGER, 2000).

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropiônico, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) é um ácido orgânico de grande ocorrência na natureza (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Foi descoberto e isolado em 1780 pelo Químico Sueco Carl Wilhem Scheele do leite azedo (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Foi o primeiro ácido orgânico a ser produzido comercialmente por fermentação, no início de 1881. Está presente em muitos alimentos naturalmente ou como produto da fermentação microbiana. Também é um dos principais metabólitos intermediários da maioria dos organismos vivos procariontes anaeróbios (DATTA *et al.*, 1995).

O ácido láctico puro é um sólido branco cristalino com baixo ponto de fusão (53°C) e aparece geralmente como forma de solução aquosa levemente concentrada. Normalmente apresenta-se como líquido de cor clara ou amarelado. Possui sabor azedo, é inodoro e solúvel em água, álcool e éter, mas insolúvel em clorofórmio. É um ácido muito corrosivo, portanto, deve-se usar material de alta resistência à corrosão, como por exemplo, aço inoxidável, cerâmica e vidro para seu processo (RASHID, 2008).

Devido à presença de um átomo de carbono assimétrico, existem duas formas opticamente ativas com rotações opostas de luz polarizada L(+) e D(-) ácido láctico (SILVEIRA, 2009).

A taxa de consumo de ácido láctico tem crescido em média em 15% ao ano e um mercado de aproximadamente 390 mil toneladas por ano havia sido projetado para 2008

(TONG *et al.*, 2004). Estima-se que 90% do L-ácido láctico seja produzido por bactérias lácticas todos os anos (WANG *et al.*, 2002).

#### 2.4.2 Síntese do ácido láctico

O ácido láctico pode ser obtido industrialmente através de síntese química ou processo fermentativo (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2005). Na síntese química, são produzidos misturas racêmicas de D e L-ácido láctico a partir da hidrólise de lactonitrila por ácidos fortes ou outras rotas químicas (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Já, via processo fermentativo, é obtido através da fermentação de matérias-primas renováveis e resíduos da agroindústria (SILVEIRA, 2009). É produzido de hexoses pela via Embden Meyerhof-Parnas ou via glicolítica. O ácido pirúvico produzido é reduzido a ácido láctico pela enzima lactato desidrogenase.

A produção de ácido láctico via processo fermentativo tem como principal objetivo permitir um processo mais efetivo e econômico. A via biotecnológica oferece diversas vantagens quando comparada à síntese química, como por exemplo, produto com alta especificidade, como a produção do isômero desejado opticamente puro D ou L-ácido láctico e o uso de recursos renováveis como substrato na fermentação, além do baixo custo do processo (SILVEIRA, 2009).

A produção de ácido láctico a partir da fermentação microbiana representa mais de 50 % da produção mundial (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2005).

O ácido láctico é produzido por bactérias lácticas que necessitam de minerais específicos, vitaminas do complexo B, e diversos aminoácidos para garantir seu crescimento. O extrato de levedura é uma fonte de nutriente comumente utilizada em laboratório para o cultivo de microrganismos. Trata-se de uma fonte muito rica de nutrientes, e segundo diversos autores é a melhor fonte de nitrogênio para o cultivo de bactérias lácticas (NANCIB *et al.*, 2005). Entretanto, quando se pensa em um processo industrial o uso de extrato de levedura pode comprometer a viabilidade econômica do processo devido ao seu alto custo. Dessa forma, tem sido estudada a substituição do extrato de levedura por outras fontes de nutrientes.

O sulfato de amônio se apresentou como substituinte do extrato de levedura quando Silveira (2009) estudou a produção de ácido láctico a partir do suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 6 g/L de extrato de levedura obtendo 46,14

g/L em 24 horas. Já o meio com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 6 g/L de sulfato de amônio apresentou 56,0 g/L em 24 horas de processo.

### 2.4.3 Aplicações do ácido láctico

O ácido láctico é um composto com diversas aplicações industriais, dos quais as indústrias química, farmacêutica, de alimentos, de polímeros, têxtil e de curtume podem ser citadas, além de ser reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA).

Atualmente, se tornou um insumo industrial de larga produção, sendo a produção anual estimada em 100 mil toneladas. O lactato de cálcio é utilizado na indústria de panificação, como suplementação em ração animal e em preparações farmacêuticas (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2005). Na indústria de alimentos é empregado como conservante e acidulante natural de diversos produtos (ALTAF; NAVEENA; REDDY, 2007a).

O produto na forma de L-ácido láctico é ainda empregado para produção de plásticos biodegradáveis, produtos químicos oxigenados, reguladores do crescimento de plantas, solventes não poluentes e intermediários para síntese química (GAO *et al.*, 2005). Tem se tornado um importante monômero na indústria de plásticos, sendo polimerizado em plástico biodegradável utilizado para confecção de embalagens, incluindo embalagens para alimentos (GAO *et al.*, 2006b; HIRATA *et al.*, 2005). Polímeros a base de ácido láctico são também aplicados na produção de órgãos artificiais biocompatíveis, estruturas autodissolúveis e veiculadores de drogas com liberação controlada (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2005). Também pode ser benéfico para a circulação sanguínea e contribui para o balanço de ácidos e bases no corpo humano (MALBASA; LONCAR; DJURIC, 2007).

O isômero L(+)-ácido láctico é preferido para aplicações farmacêuticas e de alimentos porque é um intermediário do metabolismo normal dos mamíferos, portanto, sendo seguro para saúde humana (ZHANG *et al.*, 2008). Já o D(-)-ácido láctico é considerado um isômero não fisiológico, podendo provocar efeitos adversos para os lactentes e doentes que sofrem da síndrome do intestino curto e de falência intestinal (AARNIKUNNAS, 2006; YU *et al.*, 2007). Entretanto, o isômero D-lactato pode ter outras aplicações, como por exemplo, na indústria química (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

## 2.5 Microrganismos produtores de ácido láctico

As bactérias lácticas são cocos e bacilos de longitude variada. Trata-se de um grupo de bactérias fisiologicamente uniforme, de parede Gram-positiva, que utilizam seus substratos, predominantemente açúcares, de maneira fermentativa com formação de ácido láctico (JAGNOW; DAWID, 1991). Carecem de atividade respiratória porque lhes faltam uma enzima chamada citocromo catalase que contem um grupo hemi. Tal enzima participa da cadeia transportadora de elétrons tendo o oxigênio como aceptor final de elétrons (JAGNOW; DAWID, 1991).

A maioria não cresce em meio contendo apenas sais minerais, açúcares e sais de amônia como fonte de nitrogênio. São microrganismos exigentes que necessitam de vitaminas do complexo B como; lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico e ácido fólico, além de vários aminoácidos (JAGNOW; DAWID, 1991).

Apesar de terem o metabolismo anaeróbico, são aerotolerantes e podem formar colônias na presença do ar em meios sólidos (JAGNOW; DAWID, 1991). Utilizam o ácido pirúvico, que é o produto final da via Embden Meyerhof-Parnas para conversão em lactato. São catalase negativa, imóveis e não formadoras de esporos. Possuem alta tolerância a ambientes ácidos e sobrevivem a pH 5,0 ou menos. Sua tolerância a acidez tornam-nas competitivas em relação às outras bactérias. A temperatura ótima de crescimento varia de acordo com o gênero e está entre 20 a 45°C (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007)

Os principais gêneros de bactérias lácticas são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (DAVIDSON *et al.*, 1995; ERCOLINI *et al.*, 2001; JAY, 2000; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; STILES; HOLZAPFEL, 1997).

Existe um grupo de bactérias especiais capazes de fermentar substratos amiláceos para produção de ácido láctico. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus fermentum* são exemplos deste tipo de bactérias ácido lácticas (SANNI *et al.* 2002). Fungos filamentosos também são capazes de produzir ácido láctico como no caso do *Rhizopus arrhizus* (KRISTOFICOVA *et al.*, 1991). Lin *et al.*,(2007) estudaram a produção de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* imobilizado em alginato de cálcio em um reator de leito fluidizado.

As bactérias lácticas fermentam açúcares por vias diferentes podendo ser homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas produzem principalmente o ácido láctico do metabolismo de açúcares pela via glicolítica, (Figura 2).

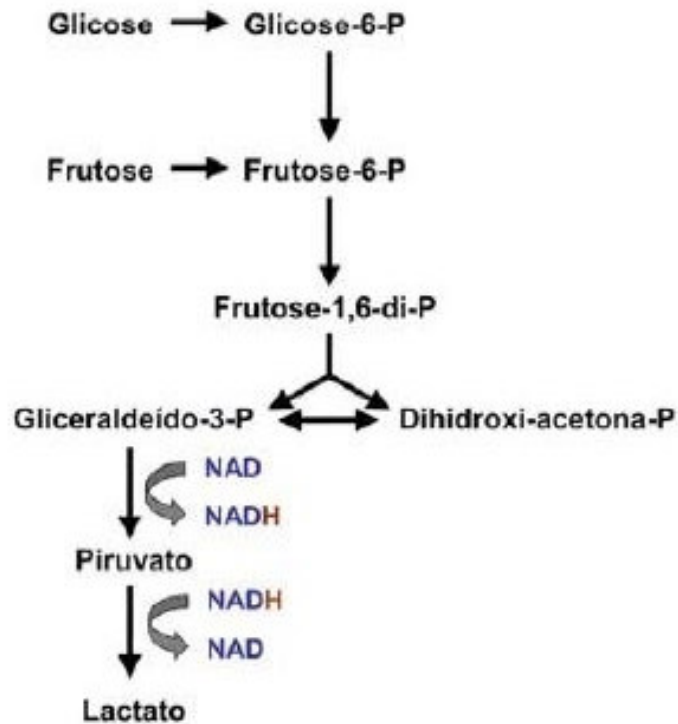


Figura 2 - Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas homofermentativas.

As bactérias heterofermentativas utilizam a via fosfoaldolase, ou via das pentoses para a fermentação das hexoses (WISSELINK *et al.*,2002) e produzem quantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, etanol, diacetil e manitol (COGAN; JORDAN, 1994). Entretanto, essas quantidades podem variar de acordo com os fatores ambientais tais como: tipo de substrato, quantidades de substrato disponível, pH do meio de cultura e temperatura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Por outro lado, as bactérias lácticas homofermentativas produzem 2 mols de ácido láctico da fermentação de hexoses, inclusive frutose (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

Das bactérias homofermentivas pode-se citar as espécies do gênero *Streptolactobacillus* e uma parte dos gêneros *Lactobacillus* e *Sporolactobacillus*. Das bactérias heterofermentativas pode-se citar um grande grupo formado por espécies do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* (JAGNOW; DAWID, 1991; RANDAZZO *et al.*, 2005).

## **2.6 *Lactobacillus casei***

*Lactobacillus casei* é uma bactéria ácido láctica que tem como principal produto o L-ácido láctico, entretanto, pequenas quantidades de D-ácido láctico são produzidas (RICO *et al.*, 2008). Segundo Tanaka (2006) *L. casei* é considerada uma bactéria homofermentativa. É uma bactéria não patogênica (BERNARDEZ, 2008). Tem sido estudado por mais de 70 anos como uso em alimentos probióticos. Dentre os benefícios da utilização deste microrganismo pode-se citar a melhoria da microbiota intestinal, ação anti-tumor, ativação do sistema imunológico, melhor absorção dos ácidos graxos de cadeia curta no trato gastrointestinal e atividade antimicrobiana (KANAZAWA *et al.*, 2005; MATSUZAKI *et al.*, 2004; NAGAO *et al.*, 2000; SPANHAAK *et al.*, 1998; WALTER *et al.*, 2001).

## **2.7 Monitoração e controle de Processos Biotecnológicos**

O aumento da competição global tem exercido considerável pressão no sentido de se operar com plantas existentes de forma mais eficiente. Para alcançar esse objetivo tem-se utilizado cada vez mais os recursos computacionais que permitem uma melhor monitoração e controle do processo e conseqüentemente, operações mais eficientes nas plantas industriais (SILVA, 2003).

Em relação aos processos biotecnológicos, a pressão econômica para melhorar rendimentos, aumentar produtividade e aprimorar o controle de qualidade dos produtos fez com que esses processos fossem pouco a pouco automatizados. Desta forma, os sistemas de



monitoração, além de gerarem os tradicionais dados contendo informações do processo, realizam também tarefas de identificação em linha e controle adaptativo, otimizando o processo fermentativo (SILVA, 2003).

O uso de computadores para controle de processos fermentativos tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas devido ao advento de microprocessadores velozes e de baixo custo. São utilizados na modelagem e simulação dos processos de fermentação visando à otimização, diminuição do custo da matéria-prima e do tempo de produção.

Mesmo assim, a indústria de fermentação apresentou certo atraso na implementação de tecnologia de controle e otimização por certas razões tais como: processos fermentativos são complexos do ponto de vista reacional, falta de medidas confiáveis em linha de processo e dificuldades de se definir um modelo cinético que nos forneça a relação entre crescimento microbiano e produto formado (LIM; LEE, 1991). Tais dificuldades fazem com que não possa obter medidas confiáveis em tempo real (SILVA, 2003).

## **2.8 Modelos cinéticos aplicado a Processos Fermentativos**

Microrganismos são seres de metabolismo complexo, capazes de se adaptar e desenvolver metabolismo diferenciado dependendo das condições ambientais. Dentre os fatores que podem influenciar no metabolismo celular pode-se citar o tipo de substrato, pH do meio, temperatura, concentração de oxigênio, presença de substâncias inibidoras e quantidades de macro e micronutrientes disposta no meio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Naturalmente, quando se pensa na obtenção de um modelo fenomenológico não-estruturado de um processo fermentativo, deve-se lembrar que o modelo pode ser distinto para um mesmo microrganismo e produto se os fatores ambientais forem modificados.

Na proposição de um modelo matemático deve-se considerar ainda um modo de operação, se cultivo em batelada, batelada alimentada ou contínuo (MODAK; LIM, 1992).

De um modo geral, a escolha do modelo cinético do processo depende do nível de complexidade com que se deseja caracterizar a população de células do sistema e deve atender a, pelo menos, um dos seguintes requisitos: discriminar possíveis mecanismos de controle do metabolismo celular, auxiliar no projeto do biorreator e na otimização das

condições de operação (ARAÚJO, 1996). Um modelo básico deve estabelecer uma relação de causa e efeito entre as variáveis substrato, biomassa e produto (SILVA, 2003).

Um dos modelos não estruturados mais simples e mais conhecidos que inclui o efeito da concentração de nutriente, desenvolvido por Jacques Monod em 1942, foi baseado nas observações do crescimento da *E. coli* a várias concentrações de glicose (BLANCH; CLARK, 1997). Neste modelo propôs-se uma relação entre a velocidade específica de crescimento celular  $\mu$  e a concentração de substrato limitante  $S$ . A cinética de crescimento celular de Monod pode ser expressa pela Equação 1.

$$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (1)$$

Onde  $K_s$  é a constante de saturação de Monod, que representa o valor da concentração do nutriente limitante para a qual a velocidade específica de crescimento é a metade de seu valor máximo. Uma baixa constante de saturação implica uma maior duração da fase exponencial. Valores de  $\mu_{\max}$  variam com o tipo de microrganismo e os valores de  $K_s$  dependem da natureza do substrato, segundo Schmidell *et al.*, 2001.

Quando se examina bem o complexo sistema bioquímico das células, torna-se claro que a equação de Monod é uma grande simplificação. No entanto, ela descreve muito bem o comportamento da fase exponencial do crescimento de um grande número de microrganismos. Para um reator em batelada pode-se aplicar a uma modelagem mais simples, (Equação 2) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_s + S} \right) X \quad (2)$$

Outros modelos, Equações de 3 a 7, foram propostos para descrever a relação entre a velocidade específica de crescimento e a concentração do substrato limitante que, para casos particulares, ajustam-se melhor aos dados experimentais. (SILVA, 2003).

Equação de Tessier:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \left( 1 - e^{-\left( \frac{S}{K_s} \right)} \right) \quad (3)$$

A equação de Moser (Equação 4) tem três constantes ( $\mu_{max}$ ,  $K_s$  e  $n$ ) e é a mais geral delas, sendo equivalente a equação de Monod para  $n = 1$ .

Equação de Moser

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max \left( 1 + K_s S^{(-n)} \right)^{-1} \quad (4)$$

A equação de Cotois (Equação 5) representa a competição por substrato entre células na fase estacionária.

Equação de Cotois:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max \left( \frac{S}{BX + S} \right) \quad (5)$$

A velocidade específica de crescimento  $\mu$  pode ser inibida pelos constituintes do meio, tais como substratos e produtos. A inibição causada por excesso desses constituintes pode ser explicada por modificações físico-químicas e metabólicas, tais como força iônica, variação da pressão osmótica, redução da atividade enzimática, etc. Exemplos de inibição pelo substrato e pelo produto são representados pelas equações de Andrews, (Equação 6), e de Jerusalimsky e Neronova, (Equação 7) respectivamente (BAILEY; OLLIS, 1986; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max \left( \frac{S}{K_s + S + \left( \frac{S^n}{K_i} \right)} \right) \quad (6)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \left( \frac{K_p}{K_p + P} \right) \quad (7)$$

Termos relacionados à inibição por excesso de substrato, consumo de diferentes substratos em tempos diferentes, inibição por algum elemento tóxico, inibição por produtos secundários e taxa de morte celular também podem ser adicionados aos modelos básicos na medida em que a modelagem do sistema vai se tornando cada vez mais complexa.

Com relação à cinética de consumo de substrato pode-se obter um modelo que relacione o consumo do substrato com a produção de um produto primário, o crescimento celular e o substrato requerido para a manutenção celular, (Equação 8).

$$\frac{ds}{dt} = - \left( \left( \left( \frac{1}{Y_{x/s}} \right) \frac{dx}{dt} + \left( \frac{1}{Y_{p/s}} \right) \frac{dp}{dt} \right) + mX \right) \quad (8)$$

Monteagudo *et al.* (1994) utilizaram este modelo ao estudar o crescimento microbiano do *Lactobacillus delbrueckii*.

Com relação à cinética de formação de produto, os modelos não-estruturados mais simples referem-se a processos cujos balanços estequiométricos entre as reações permitem a obtenção de fatores de rendimento que relacionam a velocidade de produção com a velocidade de crescimento celular (Equação 9) ou de consumo de substrato (Equação 10) (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$\frac{dp}{dt} = \left( Y_{p/x} \frac{dx}{dt} \right) \quad (9)$$

$$\frac{dp}{dt} = - \left( Y_{p/s} \frac{ds}{dt} \right) \quad (10)$$

Estas equações referem-se a processos cuja produção está associada ao crescimento, como na produção de metabólitos primários. Para metabólitos secundários, um balanço estequiométrico simples resulta em expressões de velocidade de produto relacionadas com a concentração celular e não com a velocidade de crescimento. Um modelo misto utilizado por diversos pesquisadores para representar a velocidade de produção de vários metabólitos foi proposto em 1959 por Leudedking e Piret, (Equação 11), (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$\frac{dp}{dt} = \left( \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \right) \quad (11)$$

Esta equação permite a obtenção de três tipos distintos de formação de produto, um para produção associada ao crescimento celular, outra para produção não associada ao crescimento celular e uma terceira para o comportamento misto. Um termo para inibição da formação do produto pelo próprio produto pode ser adicionado, se necessário, seguindo o modelo formulado por Monteagudo *et al.* (1994) que descreveram este efeito em estudos com o microrganismo *Lactobacillus delbrueckii*, (Equação 12).

$$\frac{dp}{dt} = \left( \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \right) \left( 1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) \quad (12)$$

Este modelo foi acrescido de um termo que indica que a taxa de produção do produto sofre inibição pelo próprio produto formado.

Quando se pretende modelar e simular um processo em batelada alimentada ou contínuo, os termos para variação de volume e a taxa de diluição podem ser adicionadas aos modelos em batelada da fermentação estudada.

Para o cálculo dos fatores de conversão têm-se as seguintes Equações de 13 a 15.

$$Y_{x/s} = \left( \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \right) \quad (13)$$

$$Y_{p/x} = \left( \frac{P_f - P_0}{X_f - X_0} \right) \quad (14)$$

$$Y_{p/s} = \left( \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \right) \quad (15)$$

Conforme solicitado anteriormente, crescimento microbiano é um fenômeno complexo. A modelagem matemática surge como uma valiosa ferramenta para a sua descrição, simplificando a representação do processo, através de pequeno número de expressões cinéticas relativamente simples. Uma vez que os modelos matemáticos fornecem uma relação funcional entre as variáveis do processo, eles são idealmente convenientes para muitas tarefas no projeto de processos (SILVA, 2003), como por exemplo:

- a) Otimização da estrutura da planta e de parâmetros de operação;

- b) Cálculos de perfis de tempo ótimos para adição de substratos e outros nutrientes;
- c) Planejamento de experimentos com o objetivo de obter máxima informação com um mínimo de tempo e gastos;
- d) Projeto de sistemas de controle;
- e) Estimativa de variáveis ou parâmetros que não podem ser medidos, e métodos indiretos de medidas.

Embora possa ser virtualmente impossível simular o sistema bioquímico em sua totalidade, uma compreensão de seus mecanismos básicos ou essenciais pode permitir a construção de um modelo que reflita, pelo menos, os principais aspectos do bioprocessamento. Usando a modelagem é possível simplificar as complexas interações do sistema bioquímico qualitativamente e quantitativamente (BRASS; HOEKS; ROHNER, 1997).

Uma descrição completa da cinética de crescimento de uma cultura envolve o reconhecimento da natureza estruturada de cada célula e a segregação da cultura em células individuais que podem diferir uma da outra. Modelos de crescimento microbiano podem ter estes mesmos atributos. Quando a população é segregada em células individuais que são diferentes uma das outras em termos de algumas características, o modelo é denominado segregado ou estruturado. Este modelo é matematicamente complexo. Por outro lado, no modelo não segregado ou não-estruturado a população celular é representada por suas propriedades médias e pode ser descrito por uma variável somente (BAILEY; OLLIS, 1986). Modelos não segregados têm a vantagem de serem matematicamente simples.

Quando se consideram os detalhes das reações ocorrendo dentro de uma célula tem-se o conceito de estrutura. Modelos estruturados consideram reações individuais ou grupos de reações ocorrendo dentro da célula. Esses modelos, ao nível de componentes moleculares e macromoleculares, que levam em conta mecanismos metabólicos de síntese de proteínas, enzimas e outros bioprodutos, são mais difíceis de serem aplicados, principalmente em função da dificuldade de mensurar metabólitos intracelulares. A biomassa é subdividida em vários componentes e as reações que ocorrem entre estes componentes são descritas, caracterizando representações celulares multicomponentes.

O modelo não-estruturado assume fixa a composição celular. Sendo assim, o crescimento de biomassa, a formação de metabólitos e o consumo de substrato são descritos em termos de somente uma variável celular – e a escolha natural recai na concentração de biomassa,  $X$ . Esse modelo considera apenas algumas propriedades das células, não levando em conta diferenças individuais, desprezando assim detalhes de sua estrutura e diferenças biológicas. O desenvolvimento de um modelo não-estruturado exige essencialmente a

aplicação de três relações básicas ao volume de controle do fermentador, a saber:

- a) Os balanços envolvendo massa total, componentes individuais e, eventualmente, energia;
- b) As velocidades de consumo de substrato, formação de produtos e ainda de transferência de massa e energia;
- c) Relações termodinâmicas e de equilíbrio. Respostas da cultura frente a rápidas e fortes perturbações não podem ser descritas satisfatoriamente por este modelo (SILVA, 2003).

### **3 FERMENTAÇÃO DO SUCO DE CAJU CLARIFICADO E OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.1 Introdução**

Para a obtenção de um modelo matemático fenomenológico, não-estruturado, que fosse capaz de descrever o sistema de fermentação láctica, foi necessária a obtenção de dados cinéticos experimentais. Os dados cinéticos foram obtidos em conjunto com o projeto de dissertação de mestrado de Silveira (2009) onde foi estudada a produção do ácido láctico (AL) a partir de uma fermentação submersa utilizando o *Lactobacillus casei* NRRL B-442, tendo como substrato o suco de caju clarificado.

#### **3.2 Metodologia experimental**

##### 3.2.1 Obtenção da linhagem de *Lactobacillus casei* NRRL B-442

Para os ensaios fermentativos, foi utilizada a cultura liofilizada de *Lactobacillus casei* NRRL B-442, obtida da ARS *Culture Collection* (Peoria, Illinois, USA).

##### 3.2.2 Ativação do microrganismo

A cultura liofilizada de *L. casei* foi transferida para um tubo de ensaio contendo 8 mL de caldo MRS (Tabela 3), previamente esterilizado à temperatura de 121°C, durante 15 minutos. Em seguida, foram transferidas alíquotas deste tubo para quatro Erlenmeyers contendo 50 mL de caldo MRS. Os mesmos foram incubados à temperatura de 37°C em estufa B.O.D. durante 16 horas.



Tabela 3 - Composição do meio MRS (*Man, Rogosa e Sharpe*).

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Peptona	10,0
Extrato de Carne	8,0
Extrato de Levedura	4,0
Glicose	20,0
Sorbinato de monooleato	1,0
Fosfato Dipotássico	2,0
Acetato de Sódio	5,0
Citrato de Amônia	2,0
Sulfato de Magnésio	0,2
Sulfato de Manganês	0,05
pH	6,2

FONTE: SILVA (1997)

### 3.2.3 Preparo de cultura-estoque de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 em glicerol

Para o preparo das culturas-estoque de *L. casei* foram usados tubos de ensaio estéreis onde foram acrescentados, a cada um deles, 2,5 mL de glicerol estéril e 2,5 mL de meio MRS fermentado conforme descrito anteriormente na ativação do microrganismo. As culturas-estoque do microrganismo foram armazenadas à temperatura de -18°C (WILSON; HORNE 1982).

### 3.2.4 Preparo do inóculo para os ensaios cinéticos

O inóculo (IN) foi preparado a partir de um tubo de cultura-estoque em glicerol do *L. casei* transferido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio MRS previamente esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Ao inóculo, foi acrescentado 10 mL de uma solução tampão de fosfato dibásico de potássio (200 g/L; pH 6,5) para manter o pH a 6,5

por um tempo maior, uma vez que em pH abaixo de 5,0 o microrganismo pode perder sua viabilidade. Após esse procedimento, o meio inoculado foi incubado numa estufa bacteriológica à 37°C durante 16 horas. Logo após as 16 horas leu-se a absorbância em espectrofotômetro (Spectrum, modelo SP2000UV) a 590 nm e o pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro (Marconi, modelo PA200), calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme a norma AOAC (1992). Após as 16 horas de incubação, o valor de pH foi de 5,5 e a concentração microbiana foi de 1,58 g/L. Esse inóculo foi adicionado aos meios de cultura para os ensaios cinéticos em quantidades de 63 mL resultando em uma concentração celular inicial de 0,2 g/L no início da fermentação dentro do fermentador com 500 mL de meio de cultura (SILVEIRA, 2009).

### 3.2.5 Obtenção do suco de caju clarificado

O suco de caju clarificado utilizado no processo fermentativo foi obtido junto à Embrapa Agroindústria Tropical, a partir da prensagem mecânica do pedúnculo do caju seguida da clarificação. O processo de clarificação do suco consistiu na adição de gelatina para decantação de sólidos totais e taninos (ABREU, 2006). Neste processo, sobre 50 mL de suco de caju, resultante da presagem da polpa, foram adicionados 5,0 mL de solução de gelatina 1% (p/v). Após 40 minutos, as suspensões foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 42 (COURI *et al.*, 2002).

O suco de caju clarificado “*in natura*” foi estocado congelado a uma temperatura de -18°C para evitar deterioração, uma vez que não foram utilizados aditivos por se tratar de uma matéria-prima para uso em processos fermentativos.

### 3.2.6 Estudo cinético da produção de ácido lático a partir do suco de caju clarificado

Em ensaios realizados por Silveira (2009) para otimização das condições operacionais utilizando planejamentos experimentais, verificou-se que as melhores condições de produção de ácido lático utilizando o *L. casei* no suco de caju clarificado como meio de cultura foram pH 6,5, temperatura de 37°C, 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais

(ARTI) e 6 g/L de sulfato de amônio (SA) como suplemento de nitrogênio e inóculo de 0,2 g/L no fermentador.

A partir dos dados obtidos na otimização da produção de ácido láctico por Silveira (2009), foram realizadas fermentações utilizando o suco de caju clarificado como substrato e o microrganismo *L. casei* para o estudo cinético da produção láctica. Os meios foram feitos variando as concentrações de açúcares redutores totais iniciais de 20, 30, 40, 50 e 60 g/L, a partir da diluição do suco de caju clarificado. As fermentações foram realizadas em duplicata.

Em todos os estudos cinéticos foi mantida a proporção de 12% de fonte de nitrogênio, sulfato de amônio, com relação aos açúcares redutores totais. Foi escolhido para o estudo cinético o pH 6,5 e a temperatura de 37°C por apresentarem melhores resultados tanto no crescimento celular quanto na produtividade em ácido láctico (SILVEIRA, 2009).

Os ensaios foram realizados em batelada em Fermentador (TECNAL, modelo TE-420) com dorna de 1,0 L contendo 0,5 L de substrato. O fermentador possuía um módulo de aeração, um módulo de bomba peristáltica com quatro saídas, um módulo de banho termostaticado e um módulo de medição e atuação com sensor de pH, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, nível de espuma, temperatura e controle de agitação, sendo tudo conectado e um computador e controlado pelo software TECBIOSOFT. Nos experimentos realizados foram utilizados controle de temperatura, agitação e adição de hidróxido de sódio para controle de pH. Na Figura 3 é apresentado o fermentador utilizado nos experimentos.



Figura 3 - Fermentador TECNAL, modelo TE-420 de 1,0 L.

Em valores de pH abaixo de 5,0 o microrganismo pode perder sua viabilidade, portanto, o pH foi controlado em 6,5 com adição de hidróxido de sódio (120 g/L) para manter a viabilidade celular e a produtividade máxima em ácido lático.

As fermentações foram conduzidas com agitação de 150 rpm até que não se observasse valores significativos de substrato para a fermentação e que a produtividade em ácido lático fosse insignificante do ponto de vista econômico. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo regulares de acordo com o desempenho microbiano. Até o final da fase de desaceleração, as amostras foram retiradas a cada hora de fermentação, e após esta fase, as amostras foram coletadas em intervalos maiores, pois já se observava uma quantidade constante de biomassa. Assim, os dados cinéticos apresentaram maior qualidade para a modelagem matemática por descreverem de forma razoável a curva de crescimento microbiano.

A partir das amostras coletadas, as células foram removidas por centrifugação (Sigma, modelo 6-15) a 7500 g por 10 minutos sendo o sobrenadante utilizado para determinação da quantidade de açúcares redutores totais residuais.

### 3.2.7 Determinação dos valores de pH

O pH do suco de caju clarificado e do inóculo foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro (Marconi, modelo PA200), calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme a norma AOAC (1992).

### 3.2.8 Determinação dos açúcares redutores totais do suco de caju clarificado e das amostras fermentadas

O teor de açúcares redutores totais foi determinado pelo método do DNS (MILLER, 1959), que é uma técnica para quantificação de açúcares redutores que consiste na reação da amostra com reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) quando submetido à temperatura de 100 °C por 5 minutos (RODRIGUES, 2003). Para a determinação das concentrações de açúcares foi construída uma curva padrão de calibração através de soluções padrão de glicose em concentrações conhecidas (0,2 a 2,0 g/L).

Para obtenção desta curva de calibração foram adicionados 125 µL de cada solução padrão em um tubo de ensaio contendo 125 µL da solução de DNS, e a mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos, sendo posteriormente, resfriada em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados à mistura 2.250 µL de água destilada e realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro (Spectrum, modelo SP2000UV). O mesmo procedimento foi realizado para determinação de açúcares nas amostras as quais foram previamente diluídas.

### 3.2.9 Determinação de ácido láctico

O ácido láctico foi calculado por balanço estequiométrico considerando o volume de NaOH 3N adicionado ao meio para manter o pH no valor desejado de 6,5. O hidróxido de sódio reagiu com o ácido láctico na proporção de 1:1 neutralizando o meio e formando sais de lactato de sódio e água.

### 3.2.10 Determinação do crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi determinado por densidade ótica no comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro (Spectrum, modelo SP2000UV). Nesta análise, diluiu-se uma alíquota do caldo fermentado, contendo as células, em água destilada e realizou-se a leitura da absorbância contra um branco com água. A concentração de biomassa foi calculada através de uma curva de calibração construída a partir da determinação do peso seco das células seguido de diluição (RODRIGUES, 2003).

### 3.2.11 Cálculos de eficiência e produtividade para o estudo cinético

Para se avaliar os resultados do estudo cinético foram realizados cálculos de eficiência (Equação 16) e de produtividade (Equação 17) para todos os ensaios realizados.

$$\eta = \left( \frac{\text{CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO}}{\text{CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO ESPERADO}} 100 \right) \quad (16)$$

$$P_r = \left( \frac{\text{CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO FORMADO}}{\text{TEMPO DE PROCESSO}} \right) \quad (17)$$

Para o cálculo da eficiência, também foi levado em consideração os ácidos orgânicos que se encontram no suco de caju clarificado na proporção de 8 g/L para 90 g/L de açúcares redutores totais. Como se sabe, esses ácidos orgânicos podem servir como fonte de carbono e energia para o microrganismo quando os açúcares redutores totais estão em baixas concentrações.

### 3.3 Resultados do estudo cinético em suco de caju clarificado utilizando o *Lactobacillus casei* NRRL B-442

Na Figura 4 são apresentados os resultados cinéticos experimentais para o crescimento microbiano, produção de ácido lático e consumo de substrato para o estudo cinético em suco de caju clarificado com meio contendo 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 6 g/L de sulfato de amônio.

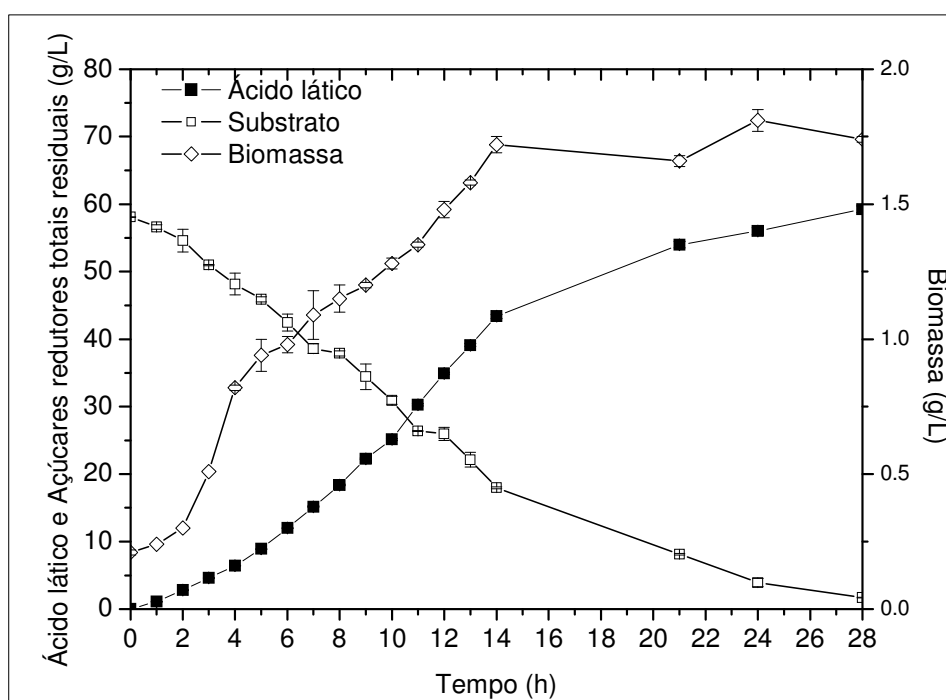


Figura 4 - Resultado experimental do estudo cinético realizado em suco de caju clarificado com meio contendo 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 6 g/L de sulfato de amônio para o crescimento microbiano, produção de ácido lático bem como o consumo de substrato.

O microrganismo iniciou a fermentação láctica com uma pequena taxa de reprodução celular. Em seguida houve uma transição para a fase de crescimento rápido onde a velocidade específica de crescimento foi máxima e chegando à fase de desaceleração. Após a fase de desaceleração o microrganismo entrou na fase estacionária onde a taxa de crescimento celular foi quase nula. Não foi possível observar a fase de declínio uma vez que as análises de crescimento celular foram realizadas em espectrofotometria onde se obtiveram os resultados de células totais, vivas e mortas (Figura 4).

Para os estudos cinéticos com 20, 30, 40 e 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais pôde-se verificar o mesmo perfil de crescimento microbiano, produção de ácido láctico e do consumo de substrato (SILVEIRA, 2009).

Na Tabela 4 são demonstrados os resultados da produção de ácido láctico, da eficiência e da produtividade máxima do estudo cinético para fermentação láctica por fermentação submersa em suco de caju clarificado onde se utilizou o *L. casei* variando as concentrações de açúcares redutores totais iniciais de 20, 30, 40, 50 e 60 g/L com adição de 2,4, 3,6, 4,8, 6,0, e 7,2 g/L de sulfato de amônio no meio de cultura, respectivamente.

Tabela 4 - Resultados da produção de ácido láctico, eficiência e produtividade máxima para o estudo cinético em suco de caju clarificado com *L. casei* na fermentação láctica.

Meio		AL (g/L)	$\eta$ (%)	Produtividade	
ARTI (g/L)	SA (g/L)			Valor (g/L.h)	Tempo (h)
20	2,4	18,6	99,3	1,66	8
30	3,6	28,06	94,4	2,22	10
40	4,8	39,51	96,5	2,63	12
50	6,0	59,26	96,5	3,09	14
60	7,2	49,73	71,5	2,29	12

Pôde-se verificar que o meio com 50 g/L de substrato inicial apresentou uma eficiência em ácido láctico de 96,5%, maior concentração de ácido láctico, 59,26 g/L e a maior produtividade, 3,09 g/L.h em 14 horas de fermentação. Já o meio com 60 g/L de substrato inicial apresentou uma menor eficiência em relação aos outros ensaios estudados e, observando os resultados de Silveira (2009) do estudo cinético, verificou-se que o comportamento microbiano da cinética partindo de 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais apresentou o mesmo perfil das outras cinéticas, porém, em menores proporções, indicando uma possível inibição causada por excesso de substrato a partir desta concentração de substrato inicial.

Maiores detalhes do estudo da produção láctica em suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* estão apresentados na dissertação de Silveira (2009) onde foi realizado planejamentos experimentais para se determinar as concentrações ideais de açúcares redutores totais iniciais e sulfato de amônio, bem como o melhor valor de temperatura e pH de operação. Também foi realizado um estudo cinético variando as fontes de nitrogênio, extrato de levedura e sulfato de amônio e o estudo cinético aqui apresentado que foi realizado em



colaboração. Os resultados foram utilizados para se obter gráficos de velocidades específicas de crescimento microbiano, produção de ácido lático e consumo de substrato. Também foi apresentado gráficos de produtividade e rendimento das cinéticas realizadas e os fatores de conversão para as variáveis estudadas em todas as cinéticas realizadas.

## 4 MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EM BATELADA

### 4.1 Introdução

Um modelo matemático fenomenológico foi proposto para representar a fermentação do ácido láctico utilizando o *L. casei* em suco de caju clarificado como meio de cultura. Os dados experimentais das cinéticas em batelada, obtidos em colaboração com Silveira (2009), foram utilizados para estimar os parâmetros cinéticos das equações que descrevem o processo. Um programa computacional, em linguagem de programação Fortran 90, foi desenvolvido para implementar o modelo matemático e fazer a estimativa dos parâmetros cinéticos. O sistema de equações diferenciais foi integrado numericamente utilizando o método matemático de integração numérica Runge-Kutta de 5ª ordem. Este método de integração pertence à biblioteca numérica IMSL do Fortran 90, o compilador utilizado para a programação dos algoritmos utilizados neste trabalho. A estimativa dos parâmetros foi realizada segundo o método de Levenberg-Marquardt de regressão não-linear.

O uso de um modelo neste caso é importante para uma otimização mais refinada do processo uma vez que existe diferença de resultados e erros experimentais quando se realiza um ensaio cinético mais de uma vez para fazer inferências em escala industrial. Portanto, uma otimização realizada a partir de simulações computacionais economiza tempo e material além de diminuir o erro quando se pensa em inferir esses resultados para a planta de produção.

Quando se faz uma otimização de produção através de um planejamento experimental em laboratório a partir de um modelo empírico, se obtém valores otimizados distribuídos em um espaço amostral, onde o valor ótimo se encontra dentro deste espaço. Quando se faz uma segunda otimização utilizando um modelo fenomenológico tomando como base a otimização realizada pelo planejamento experimental como no caso deste projeto, se consegue reduzir o tamanho deste espaço amostral onde se encontra o valor ótimo teórico de produção em escala industrial.

## 4.2 Modelo matemático

### 4.2.1 Primeira modelagem

A partir de modelagens preliminares, verificou-se que, para que os parâmetros cinéticos fossem bem ajustados, o modelo matemático proposto precisaria ser dividido em duas etapas. A primeira fase da modelagem ocorreu durante as duas primeiras horas onde o microrganismo se encontrava em uma taxa pequena de divisão celular, e a segunda fase considerada após a segunda hora de processo até o fim da fermentação, onde se observou uma maior taxa de crescimento celular.

Após modelagens preliminares, o modelo obtido foi um modelo que continha a taxa de crescimento microbiano constante na primeira etapa da modelagem (Equação 18). Como nos dados experimentais foi visto que existia uma possível inibição pelo excesso de substrato, na segunda fase, o modelo considerou que a taxa de crescimento microbiana foi influenciada pela carência e excesso de substrato (Equação 21). O termo de carência de substrato foi o mesmo termo de saturação de substrato descrito por Monod, onde esse termo tem influência na modelagem quando o substrato se torna escasso para o microrganismo.

Como a taxa de crescimento microbiano foi pequena nas duas primeiras horas de processo, e se observou a produção de ácido lático logo na primeira hora de fermentação, a equação para o consumo de substrato na primeira etapa do modelo foi obtida com a utilização do balanço estequiométrico relacionando substrato com produto (Equação 19). A relação entre substrato, produto e comportamento microbiano não ficou bem estabelecida, gerando, assim, uma constante no segundo momento da modelagem (Equação 21). O consumo constante de substrato também pôde ser observado nos resultados experimentais (SILVEIRA, 2009).

O modelo para a produção de ácido lático levou em consideração a constante  $\alpha$  relacionada ao crescimento associado e a constante  $\beta$  para o crescimento não associado do microrganismo com a produção de ácido lático de acordo com Luedeking & Piret (1959) (Equações 20 e 23), e a mesma equação foi utilizada para as duas fases do modelo.

Primeira etapa do modelo.

$$\frac{dx}{dt} = \mu \quad (18)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{p/s}}\right) \frac{dp}{dt} \quad (19)$$

$$\frac{dp}{dt} = \left(\alpha \frac{dx}{dt} + \beta X\right) \quad (20)$$

Segunda etapa do modelo.

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max\left(\frac{S}{K_c + S}\right) \left(\frac{K_e}{K_e + S}\right) \quad (21)$$

$$\frac{ds}{dt} = -C_s \quad (22)$$

$$\frac{dp}{dt} = \left(\alpha \frac{dx}{dt} + \beta X\right) \quad (23)$$

Os resultados da primeira modelagem, aqui apresentado, utilizando o modelo proposto acima estão apresentados nas Figuras 19 e 20 em apêndice e verificou-se que o modelo não se ajustou bem aos dados experimentais. Melhorias precisaram ser realizadas para obter um modelo que descrevesse de forma representativa o sistema aqui estudado.

#### 4.2.2 Segunda modelagem

Como as medidas de biomassa foram realizadas por espectrofotometria, os valores obtidos foram de células totais (vivas e mortas). Para que o algoritmo em linguagem Fortran 90 estimasse os valores das constantes cinéticas das equações de 18 a 23 que necessitava de dados apenas de células vivas, foi preciso obter um gráfico de morte microbiana a partir de uma quarta equação diferencial acrescentada ao modelo (Equação 24). Na segunda fase do modelo, o termo de morte microbiana foi adicionado à Equação 21 (Equação 25). O programa estimou os dados de células totais a partir dos dados experimentais e ao mesmo tempo, estimou os dados de células mortas para que o modelo ficasse ajustado. E também fez uma subtração destes dados de células totais com os valores estimados de morte microbiana (Equação 24), obtendo o comportamento microbiano estimado de células vivas, utilizado na modelagem do sistema que necessitava apenas do comportamento de células vivas. Se a taxa de morte microbiana não fosse considerada na produção de biomassa, a taxa de crescimento microbiano deveria ser bem maior como é apresentado na Figura 19 em apêndice o que não ocorre de acordo com Silveira (2009), e o tempo do processo deveria ser bem menor. O comportamento estimado do crescimento e morte microbiana é mostrado na Figura 5.

$$\frac{dm}{dt} = K_d X \quad (24)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max\left(\frac{S}{K_c + S}\right)\left(\frac{K_e}{K_e + S}\right) - K_d X \quad (25)$$

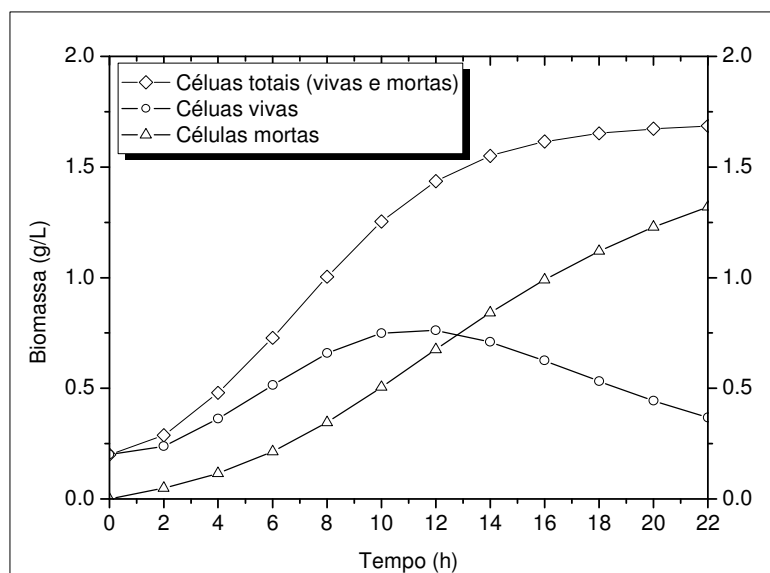


Figura 5 - Comportamento microbiano estimado pela modelagem para a fermentação láctica no processo em batelada tendo como substrato o suco de caju clarificado utilizando o *Lactobacillus casei* NRRL B-442.

Os resultados da segunda modelagem levando em consideração a taxa de morte microbiana estão apresentados nas Figuras 21 e 22 em apêndice e verificou-se que o modelo ainda não ficou bem ajustado necessitando de mais termos matemáticos adicionados às equações diferenciais de forma a tornar o modelo representativo do processo de fermentação láctica.

#### 4.2.3 Terceira modelagem

Como o processo de fermentação láctica foi realizado em pH controlado de 6,5 adicionando hidróxido de sódio, então, existiu a formação de lactato de sódio e acúmulo deste composto no meio reacional. Um termo de inibição deste lactato acumulado foi acrescido ao modelo de produção de ácido láctico nas Equações 20 e 23 (Equação 26) seguindo o modelo formulado por Monteagudo *et al.* (1994), que descreveu este efeito em estudos com o microrganismo *Lactobacillus delbrueckii*. Esta equação foi a mesma para as duas fases do modelo.

$$\frac{dp}{dt} = \left( \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \right) \left( 1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) \quad (26)$$

Os resultados da terceira modelagem levando em consideração a inibição da produção de ácido láctico pelo lactato acumulado são apresentados nas Figuras 23 e 24 em apêndice onde se observou que o modelo ficou bem ajustado para a produção de ácido láctico e consumo de substrato. Entretanto, o modelo ainda não ficou bem ajustado para o comportamento microbiano.

#### 4.2.4 Quarta modelagem

Para tentar solucionar o problema da terceira modelagem, um termo de inibição pelo lactato formado foi adicionado na Equação 25 representando uma inibição do lactato acumulado no crescimento microbiano (Equação 27).

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max \left( \frac{S}{K_c + S} \right) \left( \frac{K_e}{K_e + S} \right) \left( \frac{K_p}{K_p + P} \right) X - K_d X \quad (27)$$

Os resultados da quarta modelagem levando em consideração a inibição pelo lactato acumulado no crescimento microbiano estão apresentados nas Figuras de 6 a 15. Desta forma, o modelo proposto na quarta modelagem se ajustou bem aos dados experimentais necessitando de um teste estatístico que validasse o modelo para o sistema estudado. O modelo final, então, ficou na forma demonstrada nas Equações de 28 a 34.

Primeira etapa do modelo.

$$\frac{dx}{dt} = \mu \quad (28)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{p/s}}\right) \frac{dp}{dt} \quad (29)$$

$$\frac{dp}{dt} = \left(\alpha \frac{dx}{dt} + \beta X\right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (30)$$

Segunda etapa do modelo.

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max\left(\frac{S}{K_c + S}\right) \left(\frac{K_e}{K_e + S}\right) \left(\frac{K_p}{K_p + P}\right) X - K_d X \quad (31)$$

$$\frac{ds}{dt} = -C_s \quad (32)$$

$$\frac{dp}{dt} = \left(\alpha \frac{dx}{dt} + \beta X\right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (33)$$

$$\frac{dm}{dt} = K_d X \quad (34)$$

### 4.3 Parâmetros cinéticos e ajuste do modelo em batelada

Com o modelo proposto na quarta modelagem bem ajustado foi possível obter os valores usuais das constantes cinéticas. Os resultados das constantes cinéticas do processo de fermentação láctica utilizando o *L. casei* em suco de caju clarificado são apresentados na Tabela 5.



Tabela 5 - Resultados das constantes cinéticas para o modelo proposto na quarta modelagem para a fermentação de ácido lático em suco de caju clarificado utilizando o *L. casei*.

Constantes	Valores	Unidades
$\mu$	0,012	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$\mu_{max}$	1,3	$\text{h}^{-1}$
$K_c$	75,8	$\text{g.L}^{-1}$
$K_e$	106,0	$\text{g.L}^{-1}$
$C_s$	1,98	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$K_p$	10	$\text{g.L}^{-1}$
$K_d$	0,066	$\text{h}^{-1}$
$Y_{p/s}$	0,97	$\text{g.g}^{-1}$
$\alpha$	0,26	$\text{g.g}^{-1}$
$\beta$	6,05	$\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$P_{max}$	46,73	$\text{g.L}^{-1}$

Como foi observado que o comportamento microbiano, produção de ácido lático e consumo de açúcares foram bastante semelhantes nos ensaios cinéticos experimentais (SILVEIRA 2009), os valores das constantes também deveriam ser aproximados para cada ajuste individual do modelo, o que de fato ocorreu. Tal fato observado indicou que o metabolismo do *L. casei*, não sofreu alteração significativa devido as variações de substrato inicial, e que o modelo obtido poderia ser usado para extrapolações em simulações variando as quantidades de açúcares redutores iniciais sem que os erros fossem significativos. Nas Figuras de 6 a 15 são apresentados os resultados experimentais das cinéticas em batelada variando as concentrações de açúcares redutores totais iniciais de 20, 30, 40, 50 e 60 g/L acrescentando 12 % de sulfato de amônio em relação a quantidade de carbono em cada batelada, bem como, as regressões não-lineares para os ajustes do modelo para cada cinética realizada para os parâmetros biomassa, produção de ácido lático e consumo de substrato.

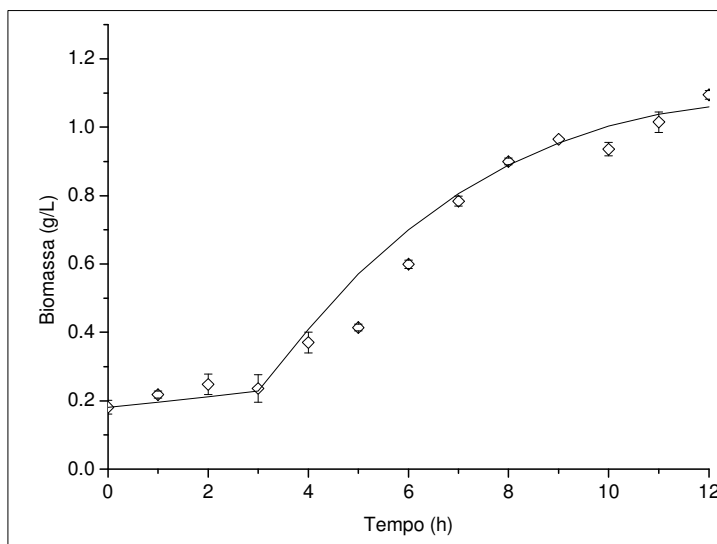


Figura 6 - Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 2,4 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.

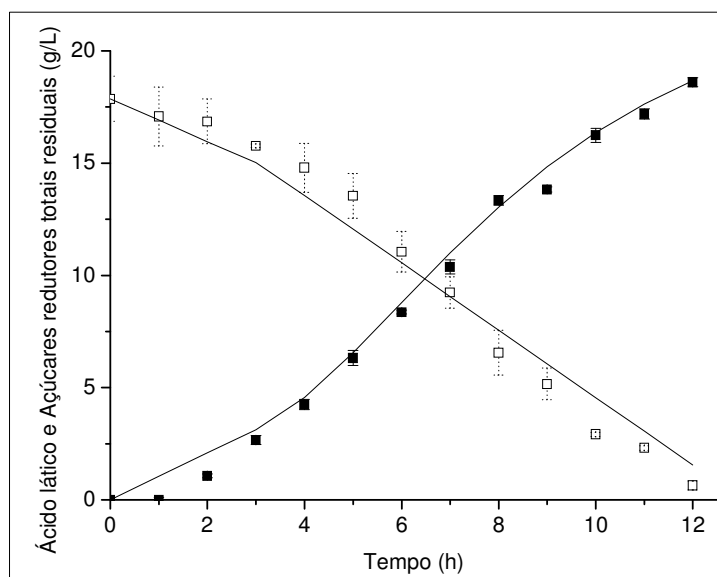


Figura 7 - Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico ( $\blacksquare$ ) e consumo de substrato ( $\square$ ) para a fermentação com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 2,4 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.

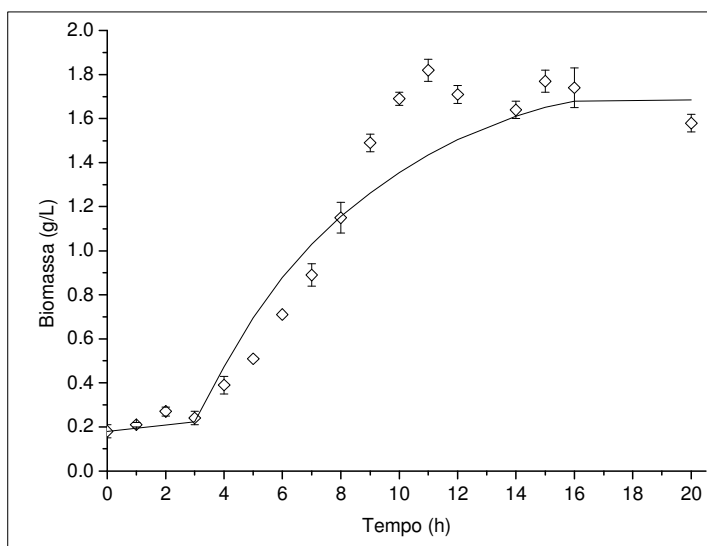


Figura 8 - Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 3,6 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.

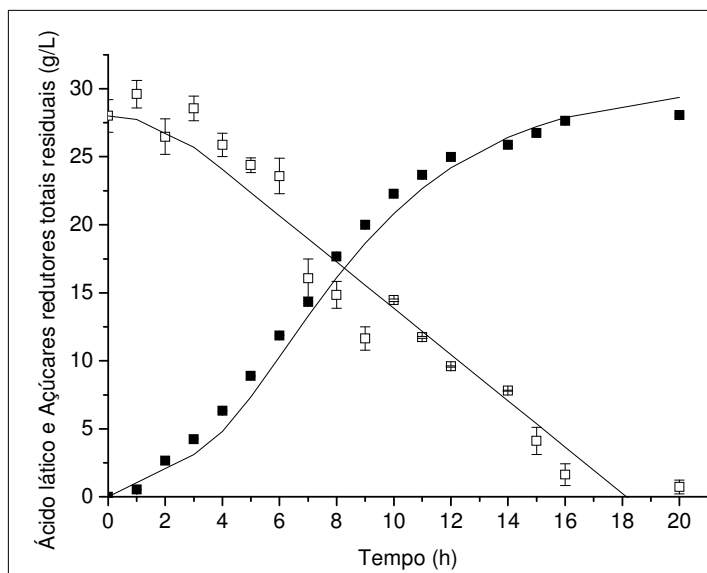


Figura 9 - Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico ( $\blacksquare$ ) e consumo de substrato ( $\square$ ) para a fermentação com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 3,6 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.

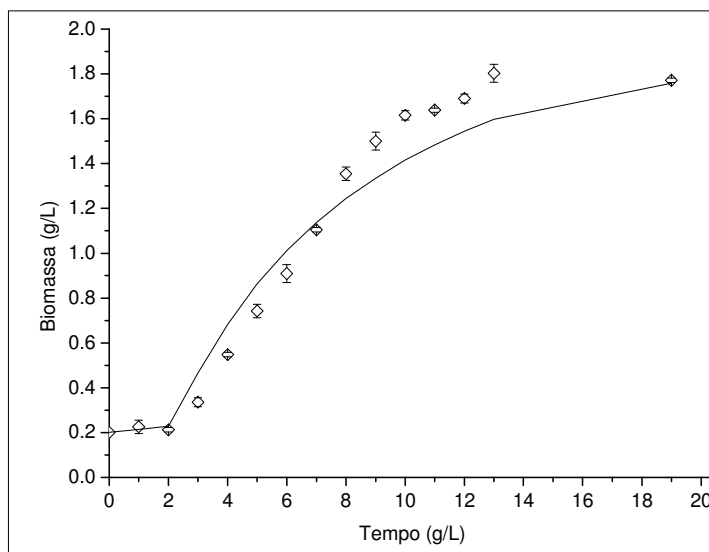


Figura 10 - Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa (◇) para a fermentação com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 4,8 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.

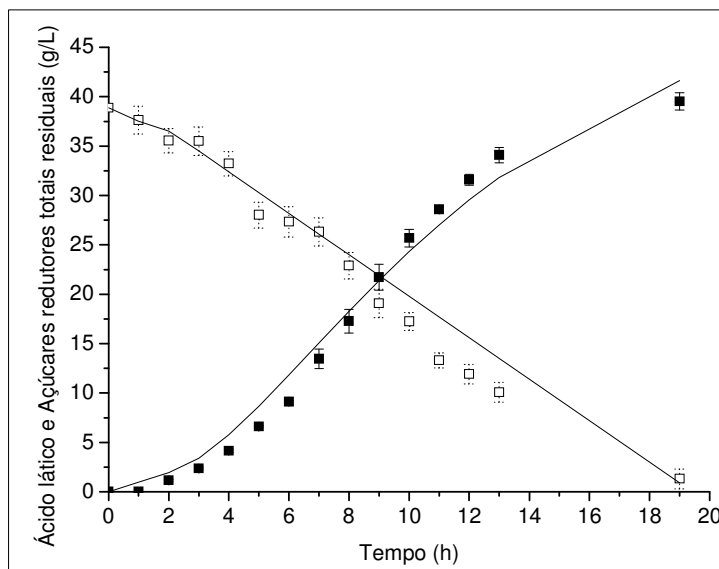


Figura 11 - Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico (■) e consumo de substrato (□) para a fermentação com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 4,8 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.

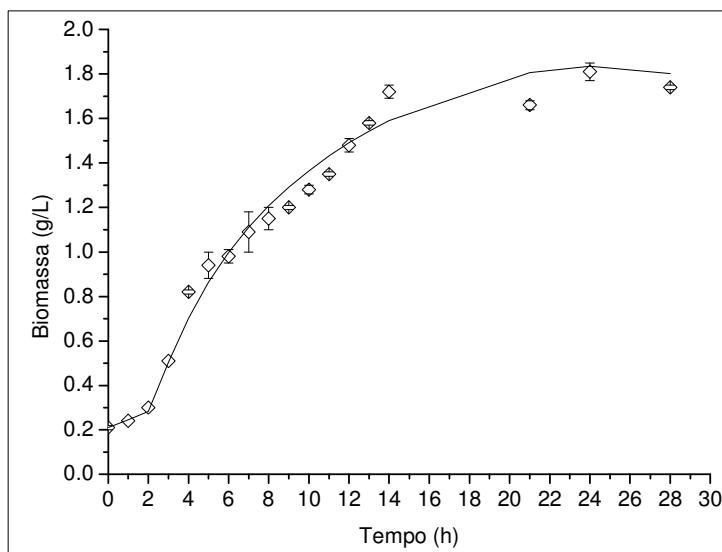


Figura 12 - Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa (◇) para a fermentação com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 6,0 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.

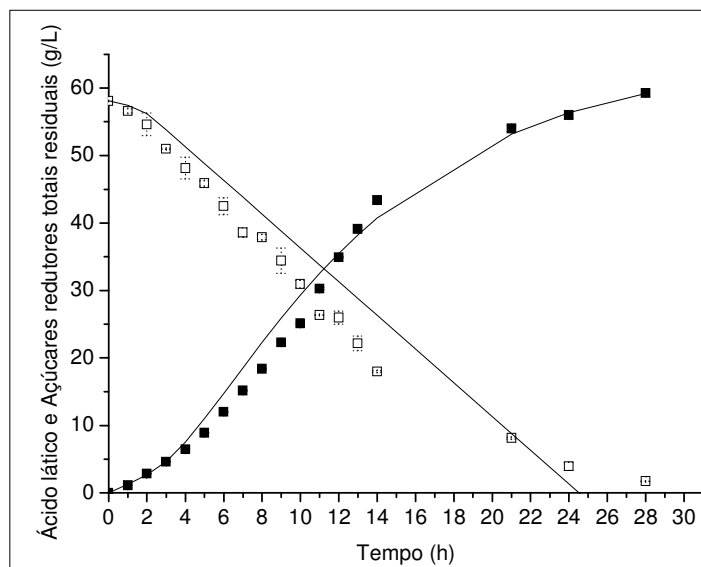


Figura 13 - Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico (■) e consumo de substrato (□) para a fermentação com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 6,0 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.

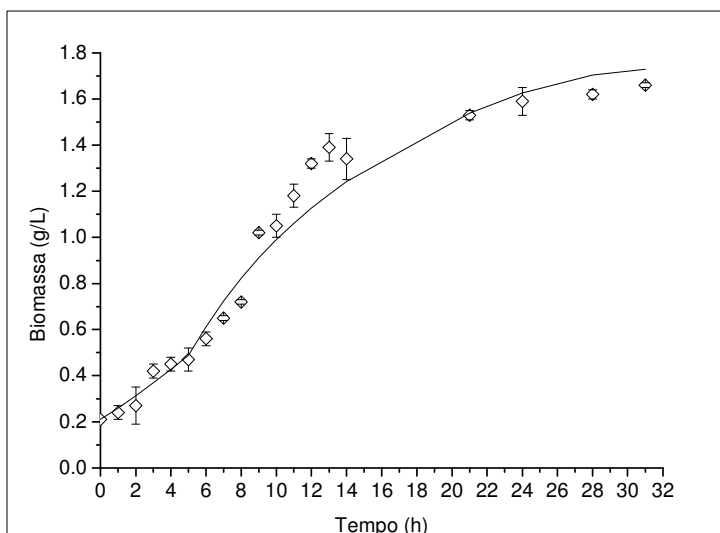


Figura 14 - Resultados experimentais cinéticos de produção de biomassa ( $\diamond$ ) para a fermentação com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 7,2 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e a regressão não-linear (—) para o ajuste do modelo de crescimento microbiano.

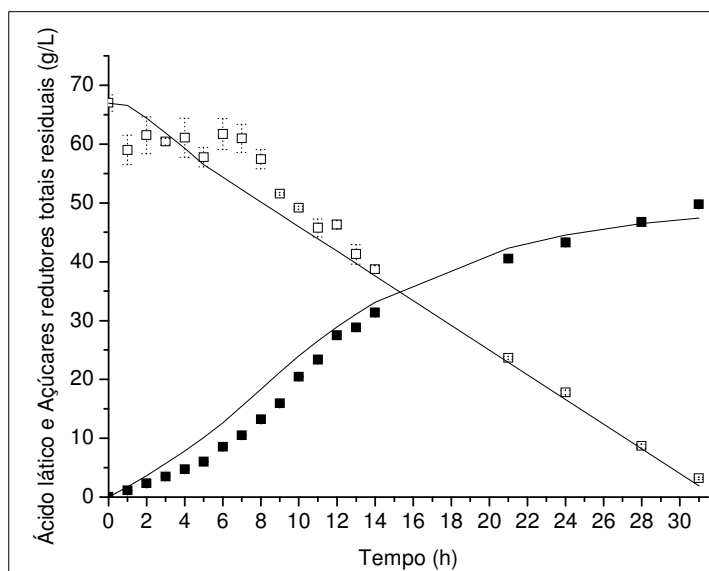


Figura 15 - Resultados experimentais cinéticos de produção de ácido láctico ( $\blacksquare$ ) e consumo de substrato ( $\square$ ) para a fermentação com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais com 7,2 g/L de sulfato de amônio no suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* para fermentação láctica e as regressões não-lineares (—) para os ajustes dos modelos de produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais.

Pelas Figuras de 6 a 15 pôde-se ver que o modelo proposto nas Equações de 28 a 34 se ajustou bem aos dados cinéticos experimentais da fermentação láctica em suco de caju clarificado utilizando o *L. casei* como biocatalisador. A validação estatística do modelo fenomenológico representado pelas equações de 28 a 34 foi realizada obtendo o valor do F de Fisher e o ajuste  $R^2$  para cada variável de cada cinética realizada. Os valores de F calculado devem ser maiores que os valores de F tabelado e o ajuste  $R^2$  deveriam ser próximos de 1.0 para que o modelo fosse representativo estatisticamente. O software utilizado nas análises estatísticas foi o software Statistica 7.0. Na Tabela 6 são apresentados os resultados para os testes estatísticos com propósito de validar o modelo matemático que melhor representou a fermentação láctica aqui estudada.

Tabela 6 - Resultados para o teste de F de Fisher e do ajuste  $R^2$  para do modelo matemático proposto para representar a fermentação láctica utilizando o *L. casei* em suco de caju clarificado como meio de cultura.

	$F_{CAL}$	$R^2$	$F_{TAB}$
<b>20 g/L de ARTI</b>			
Biomassa	405,32	0,97	4,84
Substrato	907,23	0,98	
Ácido láctico	3105,81	0,99	
<b>30 g/L de ARTI</b>			
Biomassa	251,50	0,94	4,54
Substrato	283,07	0,94	
Ácido láctico	2011,96	0,99	
<b>40 g/L de ARTI</b>			
Biomassa	516,33	0,97	4,66
Substrato	663,23	0,97	
Ácido láctico	1137,86	0,98	
<b>50 g/L de ARTI</b>			
Biomassa	969,95	0,98	4,49
Substrato	337,41	0,95	
Ácido láctico	1760,93	0,99	
<b>60 g/L de ARTI</b>			
Biomassa	532,28	0,96	4,45
Substrato	446,21	0,96	
Ácido láctico	1290,61	0,98	

Pôde-se observar que os valores de  $F$  calculado para todos os parâmetros testados (biomassa, ácido láctico e substrato), foram bem acima dos valores de  $F$  tabelado. O ajuste  $R^2$  também foi próximo de 1,0 para todos os parâmetros. Estes dados comprovaram que o modelo testado foi estatisticamente representativo para o sistema estudado.

Com o modelo não-estruturado, proposto para representar o sistema em batelada, bem ajustado e validado estatisticamente, foi possível verificar que: a provável inibição do crescimento microbiano por excesso de substrato, observada nos dados experimentais, a inibição do crescimento celular e produção de ácido láctico causada pelo acúmulo de lactato formado no meio reacional e a taxa de morte microbiana têm significância no processo em batelada.

#### **4.4 Otimização em batelada**

A partir do modelo obtido no sistema operado em batelada, uma otimização do processo foi feita realizando simulações (SIM) computacionais com um algoritmo escrito em linguagem de programação Fortran 90. O sistema de equações diferenciais foi integrado numericamente utilizando o método matemático de integração numérica Runge-Kutta de 5ª ordem. O algoritmo construído permitiu que fosse possível variar os dados de entrada: concentração de inóculo inicial e açúcares redutores totais iniciais e fornecendo os dados de saída, ácido láctico e biomassa produzidos e substrato consumido.

Já que foi possível variar o inóculo nas simulações, o que não foi feito nos ensaios experimentais, sem gasto de tempo, reagentes e equipamentos, a otimização foi realizada variando o inóculo inicial de 0,1 g/L a 0,3 g/L. Para cada inóculo inicial estudado, variou-se o conteúdo de substrato inicial de 10 a 100 g/L visando reduzir custos, tempo e desperdícios de matéria-prima no processo. A dorna industrial considerada para o sistema em batelada tinha 500 L de meio de cultura.

Ressaltando que as otimizações foram realizadas a partir de simulações utilizando o modelo matemático proposto e um programa computacional, portanto, nesta etapa não foi realizado nenhum experimento laboratorial. Entretanto, quando se pensa em reproduzir estas simulações em uma planta industrial, seria necessário utilizar o suco de caju clarificado e concentrado uma vez que o suco de caju clarificado obtido para a realização dos ensaios fermentativos contém concentrações em torno de 65 g/L de açúcares redutores totais não chegando a 100 g/L.



O suco clarificado e concentrado de caju é obtido a partir do suco de caju clarificado por um processo de evaporação a vácuo e alcança concentrações finais de 600 g/L de açúcares redutores totais podendo ser armazenado a temperatura ambiente. Portanto, para a indústria de fermentação, o uso do suco concentrado de caju reduz os custos de produção uma vez que o suco clarificado de caju necessita ser armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$  e ser descongelado para ser fermentado.

Para a comparação entre os processos simulados em batelada foi levado em consideração à eficiência de processo, a quantidade de ácido láctico produzido, a quantidade de matéria-prima desperdiçada, açúcares redutores totais residuais (ARTR), a produtividade e os custos da fermentação láctica em relação aos reagentes, matéria-prima, água para a diluição do suco de caju concentrado e o custo de ácido láctico a preço de venda final para obtenção do lucro final em US\$ (Tabela 8).

Na Tabela 7 são apresentados os custos dos reagentes hidróxido de sódio e sulfato de amônio, bem como o custo da matéria-prima e o custo da água adicionada ao processo de fermentação láctica. Também é apresentado o custo de venda final do ácido láctico 85% (p/v). Os custos do hidróxido de sódio, sulfato de amônio e ácido láctico foram obtidos por cotações junto a empresas fornecedoras. O custo do suco de caju clarificado e concentrado foi obtido junto a Planta Piloto de Embrapa Agroindústria Tropical que fez uma estimativa de quanto custava produzi-lo. O custo da água utilizada na diluição do suco de caju clarificado e concentrado foi obtido junto a Companhia de Água e Esgoto do Ceará, Cagece. Estes custos foram utilizados como um parâmetro adicional para a escolha da melhor simulação, uma vez que os valores de eficiência de processo, a quantidade de ácido láctico produzido, a quantidade de matéria-prima desperdiçada e a produtividade não foram suficientes para tal função. Portanto, não foi realizado nenhum tipo de análise econômica mais específica dos processos para servir como fonte de pesquisa para o setor industrial.

Tabela 7 - Valores de custo dos reagentes, matéria prima e água utilizada na fermentação láctica e o custo do ácido láctico a preço de venda final.

<b>Produto</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor (R\$)</b>	<b>Valor (US\$)</b>
Sulfato de amônio	1 kg	1,13	0.57
Hidróxido de sódio	1 kg	1,85	0.94
Suco de caju a 600 g/L ART	1L	6,2	3.17
Água	1000 L	4,72	2.41
Ácido láctico 85%	1 kg	29,06	14.88

Tabela 8 - Resultados das simulações em batelada para otimização do processo de fermentação láctica.

<b>ART I (g/L)</b>	<b>IN (g/L)</b>	<b><math>\eta</math> (%)</b>	<b><i>Pr</i> (g/L.h)</b>	<b>AL (g/L)</b>	<b>ARTR (g/L)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Custo de Pro. (US\$)</b>	<b>Valor de AL (US\$)</b>	<b>Lucro (US\$)</b>
60	0,1	59,3	1,29	38,73	3,54	30	169.47	285.50	116.03
70	0,1	53,2	1,35	40,52	13,54	30	196.62	301.62	105
60	0,2	63,2	1,37	41,34	2,56	30	170.04	307.73	137.69
70	0,2	55,9	1,42	42,62	12,56	30	197.06	317.11	120.05
60	0,3	65,6	1,42	42,85	1,59	30	170.35	318.89	148.54
70	0,3	57,5	1,46	43,83	11,59	30	197.31	326.04	128.73
50	0,3	72,2	1,57	39,31	1,49	25	142.67	292.54	149.87
40	0,3	77,1	1,68	33,61	1,39	20	114.86	250.11	135.25

Pela Tabela 8, conclui-se que a fermentação que apresentou maior lucro final foi o processo que partiu de um inóculo com 0,3 g/L e a concentração de açúcares redutores totais iniciais de 50 g/L por finalizar o processo com 39,31 g/L de ácido láctico e apenas 1,49 g/L de açúcares redutores totais residuais apresentando uma eficiência de 72,2%. Portanto, o processo em batelada foi otimizado para estas condições iniciais.

Na Figura 16 são apresentados os gráficos de produção de biomassa e ácido láctico, bem como o gráfico de consumo de substrato para a fermentação de 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo. Em apêndice, nas Figuras de 25 a 31 estão

apresentados em forma de gráficos os resultados das outras simulações em batelada. Os perfis de comportamento de microrganismos vivos e mortos foram todos parecidos com o perfil apresentado na Figura 5.

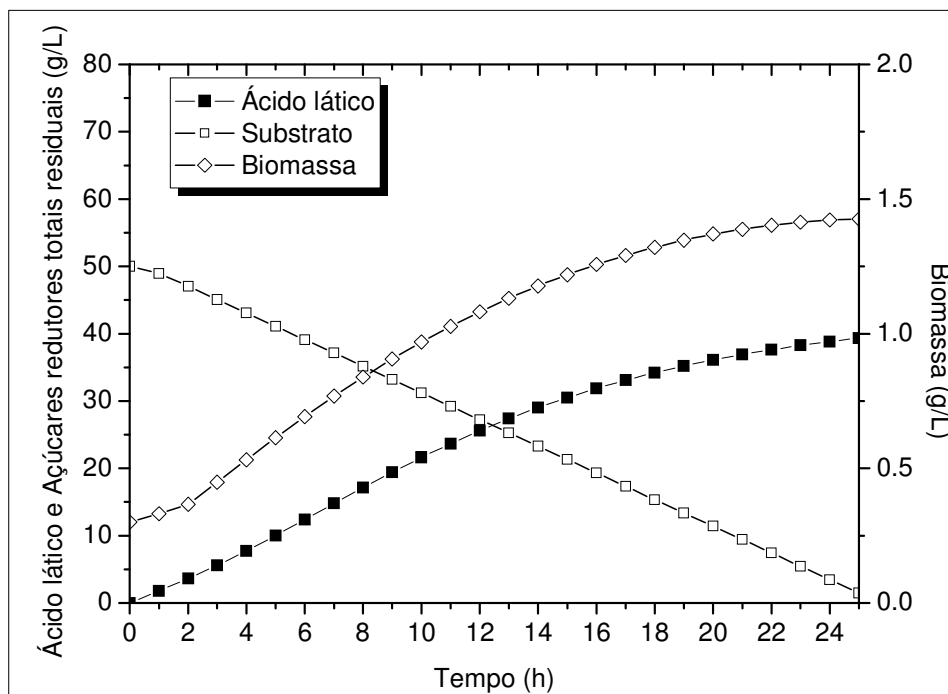


Figura 16 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para o processo em batelada otimizado por simulação computacional com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.

## 5 MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EM BATELADA ALIMENTADA

### 5.1 Introdução

Foi observado, a partir dos dados experimentais (SILVEIRA, 2009) e da modelagem em batelada, que existiu uma inibição do crescimento celular quando se tinha concentrações a partir de 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais. Também foi observado, através da modelagem matemática do sistema em batelada, que o crescimento microbiano e a produção de ácido lático foram inibidos pelo acúmulo de lactato. Desta forma, uma simulação em sistema batelada alimentada foi realizada com as seguintes justificativas:

- a) Trabalhar com baixas concentrações iniciais de açúcares redutores totais com uma alimentação ao longo do processo para evitar a inibição pelo excesso e carência de substrato;
- b) Trabalhar com baixas concentrações iniciais de açúcares redutores totais para tentar reduzir os custos com matéria-prima;
- c) Esperava-se que o aumento crescente do volume da dorna devido à vazão de alimentação diluísse a concentração de lactato acumulado diminuindo, assim, a inibição deste no crescimento microbiano e na produção de ácido lático.

### 5.2 Modelo matemático

O modelo proposto para o sistema em batelada alimentada foi o mesmo modelo proposto para o sistema em batelada, entretanto, levou em consideração a variação crescente do volume da dorna de fermentação, onde a taxa de variação do volume foi dada pela vazão de alimentação, que foi constante. Na Equação 39 foi acrescentado um termo de alimentação do substrato durante o processo. As Equações de 35 a 42 representam matematicamente os sistema de fermentação láctica utilizando o *L. casei* como biocatalisador tendo como substrato o suco de caju clarificado no processo em batelada alimentada.

Primeira etapa do modelo.

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot V \quad (35)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{p/s}}\right) \frac{dp}{dt} \quad (36)$$

$$\frac{dp}{dt} = \left(\alpha \frac{dx}{dt} + \beta X\right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (37)$$

Segunda etapa do modelo.

$$\frac{dx}{dt} = \mu \max \left( \frac{\left(\frac{S}{V}\right)}{K_c + \left(\frac{S}{V}\right)} \right) \left( \frac{K_e}{K_e + \left(\frac{S}{V}\right)} \right) \left( \frac{K_p}{K_p + \left(\frac{P}{V}\right)} \right) X - K_d X \quad (38)$$

$$\frac{ds}{dt} = -C_s + v \cdot C_{at} \quad (39)$$

$$\frac{dp}{dt} = \left(\alpha \frac{dx}{dt} + \beta X\right) \left(1 - \frac{\left(\frac{P}{V}\right)}{P_{\max}}\right) \quad (40)$$

$$\frac{dm}{dt} = K_d X \quad (41)$$

$$\frac{dV}{dt} = v \quad (42)$$

### 5.3 Otimização em batelada alimentada

O algoritmo utilizado na simulação do sistema em batelada alimentada foi o mesmo utilizado para o sistema em batelada com as modificações do modelo para o sistema em batelada alimentada. Entretanto, permitiu que fosse possível variar os dados de entrada, concentração de inóculo inicial, açúcares redutores totais iniciais, a vazão de alimentação e a concentração de açúcares redutores totais do substrato adicionado (CAL) ao longo do processo e fornecendo os dados de saída, ácido láctico e biomassa produzidos, substrato consumido, taxa de morte microbiana e variação do volume da dorna.

O sistema de equações diferenciais foi integrado numericamente da mesma forma como foi realizado nas simulações em batelada.

Para a otimização em batelada alimentada, variou-se o inóculo inicial de 0,1 a 0,3 g/L e substrato inicial, açúcares redutores totais, de 10 a 40 g/L. A alimentação foi iniciada a partir da segunda hora de fermentação para se reduzir custos com gastos da matéria prima, uma vez que se observou, pelos dados experimentais, que pouco substrato foi consumido nas duas primeiras horas de fermentação. A vazão de alimentação foi variada, de acordo com simulações preliminares, de 3, 5 e 7 L/h com as concentrações de meio alimentado de 100, 200 e 300 g/L em relação aos açúcares redutores totais iniciais. O volume de meio de cultura inicial escolhido foi de 500 L. Na Tabela 9 são apresentadas as simulações com as combinações de inóculo, açúcares redutores totais iniciais, vazão de alimentação e concentração de alimentação do suco de caju concentrado para as melhores simulações realizadas em batelada alimentada.

Como foi mencionado na otimização em batelada, na etapa de simulação não houve experimentos laboratoriais. Para reproduzir os dados simulados da otimização do processo em batelada alimentada, em uma planta industrial, seria necessário utilizar o suco de caju clarificado e concentrado como foi explicado no item de otimização do processo em batelada.

Na Tabela 9 - Combinações de inóculo, açúcares redutores totais iniciais, vazão de alimentação e concentração de alimentação do suco de caju concentrado para as simulações realizadas em batelada alimentada.

<b>SIM</b>	<b>IN (g/L)</b>	<b>ARTI (g/L)</b>	<b>VAZÃO (L/h)</b>	<b>CAL (g/L)</b>
1	0,3	20	3	300
2	0,3	20	5	300
3	0,3	20	7	300
4	0,3	30	3	300
5	0,3	30	3	200
6	0,3	40	3	200
7	0,3	30	3	100

Na Tabela 10 são apresentados os resultados das melhores simulações em batelada alimentada em relação à eficiência do processo, a produtividade, a quantidade de ácido lático produzido, as quantidades de açúcares redutores totais adicionados ao processo (ARTA) e os residuais, o custo de produção em relação aos reagentes, matérias-prima e água bem como o valor em ácido lático final e o lucro de cada simulação.

Tabela 10 - Resultados das simulações em batelada alimentada para a otimização da fermentação láctica.

<b>SIM</b>	<b><math>\eta</math> (%)</b>	<b><i>Pr</i> (g/L.h)</b>	<b>AL (g/L)</b>	<b>ARTR (g/L)</b>	<b>ARTA (g/L)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Custo de Pro. (US\$)</b>	<b>Valor AL (US\$)</b>	<b>Lucro (US\$)</b>
1	52,5	1,04	31,29	5,57	43,14	30	197,16	271,99	74,83
2	50,5	1,14	34,23	28,9	65,61	30	287,82	326,03	38,21
3	64,9	1,18	35,61	48,49	84,47	30	387,14	368,91	-18,23
4	61,2	1,21	36,46	14,12	43,14	30	225,06	316,94	91,88
5	60,0	1,2	33,68	1,65	26,97	28	173,39	289,70	116,31
6	63,8	1,26	38,0	8,31	28,76	30	207,38	330,35	122,97
7	74,4	1,51	27,34	2,38	8,75	18	113,43	223,01	109,58

Pela Tabela 10, pôde-se ver que a simulação que apresentou maior lucro foi a que partiu de um inóculo de 0,3 g/L com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais, uma vazão de 3 L/h e uma concentração de suco de caju clarificado concentrado de 200 g/L. Portanto, o processo em batelada alimentada foi otimizado para estas condições. Nas Figuras 17 e 18 são apresentados os resultados em forma de gráficos da simulação otimizada no processo em

batelada alimentada. As outras simulações são apresentados nas Figuras de 32 a 43 na forma gráfica em apêndice.

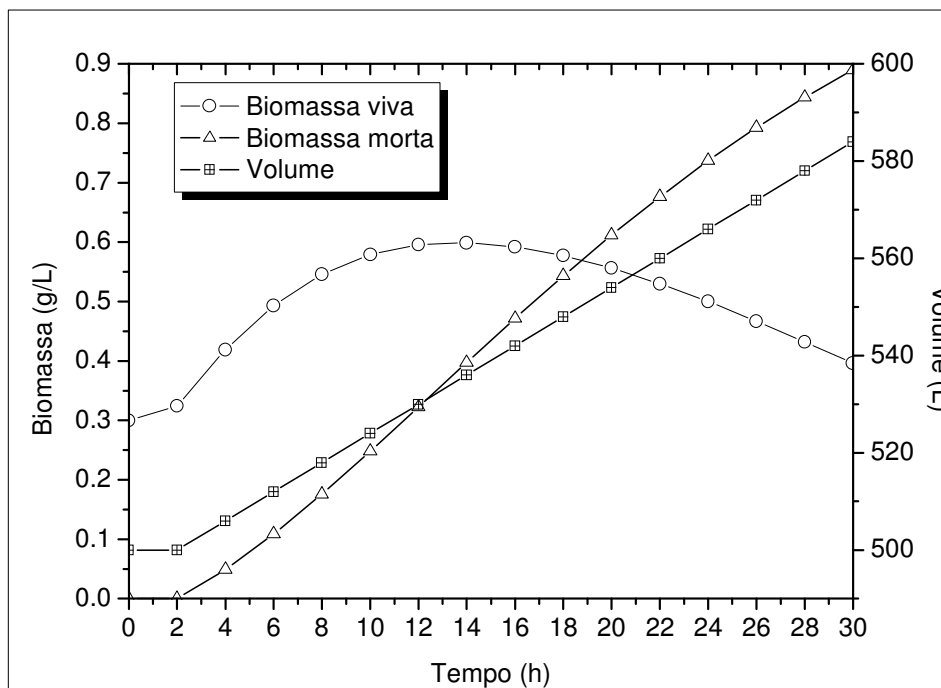


Figura 17 - Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

A partir de Figura 17 verificou-se que a taxa de morte microbiana teve relevância na fermentação em batelada alimentada mesmo com a adição de substrato, e também com a diluição do lactato de sódio formado durante o processo devido ao aumento do volume da dorna durante a alimentação.



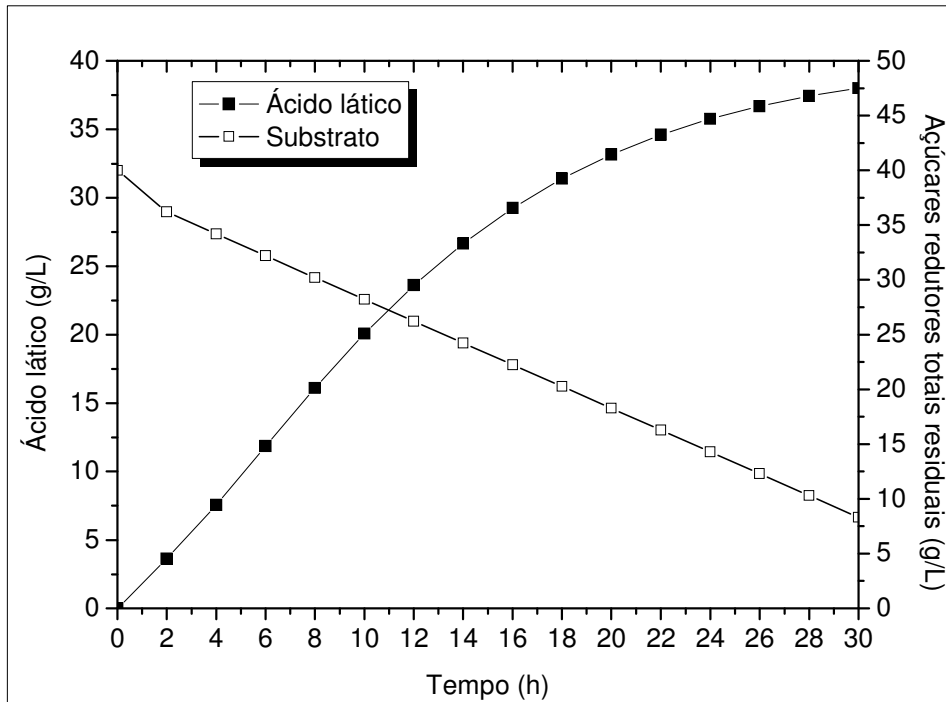


Figura 18 - Resultados da produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores totais na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados para o Teste de F de Fisher conclui-se que o modelo não-estruturado proposto foi bem ajustado para os ensaios cinéticos realizados, e que foi representativo para a fermentação de ácido láctico utilizando o *L. casei* como biocatalisador em suco de caju clarificado como meio de cultura. Desta forma, o modelo aqui proposto pode ser utilizado para vários fins na indústria de fermentação láctica, utilizando as condições aqui estudadas.

A partir da modelagem do sistema em batelada pôde-se verificar que o microrganismo sofreu uma inibição pelo excesso de substrato, pelo acúmulo de lactato no meio reacional que também inibiu a produção de ácido láctico. Também se observou que a taxa de morte para o sistema estudado é relevante nos processos em batelada e no processo em batelada alimentada.

Pelos resultados das simulações para a otimização do processo em batelada e batelada alimentada, conclui-se que o processo em batelada apresentou melhores resultados em termos de lucro final considerando apenas os gastos com os reagentes sulfato de amônio e hidróxido de sódio, matéria-prima suco de caju clarificado e concentrado e a água utilizada nas diluições do suco de caju concentrado. Portanto, a fermentação láctica foi otimizada para um sistema em batelada partindo de 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo em 25 horas de processo, utilizando a linhagem de *L. casei* NRRL B-442 tendo como substrato o suco de caju clarificado e concentrado sendo este acrescentado de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e o pH controlado com adição de hidróxido de sódio durante a fermentação.

A partir da modelagem do sistema aqui estudado, foi possível otimizar a produção de ácido láctico em escala industrial o que conclui-se que esta ferramenta se faz necessário quando se pensa em aumentar a competitividade de uma planta de produção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNIKUNNAS, J. **Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds**. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciências Veterinárias Básicas, Universidade de Helsinki, Helsinque, 2006.

ABREU, F. A. P. **Cajuína**. In: VENTURINI FILHO, W. G. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado. São Paulo: Editora Edgard Blücher, cap. 8. p. 169-184, 2006.

ADHAM, N. Z. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 97-100, 2002.

ALIYU, O. M. Compatibility and fruit-set in cashew (*Anacardium occidentale* L.) **Euphytica**, v. 160, n. 1, p. 25-33, 2008.

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

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

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. *Artrocarpus heterophyllus*: a potential substrate for citric acid biosynthesis using *Aspergillus niger*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v. 38, p. 89-93, 2005.

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

ARASARATNAM, V.; SENTHURAN, A.; BALASUBRAMANIAN, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 482-486, 1996.

ARAÚJO, M. L. G. C. **Estudo Cinético do Processo de Produção de Cefalosporina C com Células Livres e Imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272**. 1996. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry: Vitamins and other nutrients**. Washington: AOAC,1992.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York, USA: McGraw-Hill Book Company, 1986, 984p.

BERNÁRDEZ, P. F.; AMADO, I. R.; CASTRO, L. P.; GUERRA, N. P. Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei subsp. Casei* CECT 4043 in whey, **International Dairy Journal**, v. 18, p. 1057-1065, 2008.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. New York, USA: Marcel Dekker, 1997, 700p.

BRASIL. Instrução normativa nº 136. Estabelece o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de frutas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2000.

BRASS, J. M.; HOEKS, F. W. J. M. M.; ROHNER, M. Application of modelling techniques for the Improvement of Industrial Bioprocess. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 63-72, 1997.

BUSTOS, G.; MOLDE, A.B.; ALONSO, J. L.; VÁZQUEZ, M. Optimization of D- lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. **Food Microbiology**, v. 21, p. 143-148, 2004.

COGAN, T. M.; JORDAN, K. N. Symposium: The dairy *Leuconostoc*. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2704-2707, 1994.

COSTA, M. C. O. **Estudo da estabilidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) preservado pelos processos *hot fill* e asséptico**. 1999. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

COSTA, T. S. A.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina *versus* método do butanol ácido. **Química Nova**, v. 26, n. 5, set./out. 2003.

COURI, S.; MENEZES, L. F.; PINTO, G. A. S.; SOUZA, M. L. M.; FREITAS, S. P. Comparação entre os tratamentos com tanase e com gelatina para clarificação do suco de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Boletim CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 41-54, jan./jun., 2002.

DATTA, R.; TSAI, S.; BONSIGNORE, P.; MOON, S.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivates. **Microbiology Reviews**, v.16, p. 221-231, 1995.

DAVIDSON, B. E.; LLANOS, R. M.; CANCELLA, M. R.; REDMAN, N. C.; HILLIER, A. J. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 763-784, 1995.

EL-SAMRAGY, Y. A.; KHROSHID, M. A.; FODA, M. I.; SHEHATA, A. E. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 411-416, 1996.

ERCOLINI, D.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPPOLA, S. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. **Current Microbiology**, v. 42, p. 199-202, 2001.

FAO, Food and Agriculture Organization production statistics, 2007, Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em 19 jul. 2009.

FONTES, C. P. M. L. **Produção de manitol a partir da fermentação do suco de caju utilizando bactérias lácticas heterofermentativas**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

GALVÃO, A. M. P. **Aproveitamento da fibra de caju (*Anacardium occidentale L.*) na formulação de um produto tipo hambúrguer**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

GAO, M. T.; KOIDE, M.; HIRATA, M.; TAKANASHI, H.; HANO, T. Development of a continuous electro dialysis fermentation system for production of lactic acid from *Lactobacillus rhamnusus*, **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1033-1036, 2005.

GAO, M. T.; HIRATA, M.; TOORISAKA, E.; HANO, T. Study on acid hydrolysis of spent cells for lactic fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 87-91, 2006a.

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

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Corn husks: a potential substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v. 33, p. 523-521, 2000.

HIRATA, M.; GAO, M. T.; TOORISAKA, E.; TAKANASHI, F.; HANO, T. Production of lactic acid by continuous electro-dialysis fermentation with a glucose concentration controller. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 159-163, 2005.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, p. 365-373, 2001.

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONCALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Fermentation of cashew apple juice to produce high added value Products, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1409-1415, 2007.

HSIEH, C. M.; YANG, F. C.; IANNOTTI, E. L. The effect of soy protein hydrolyzates on fermentation by *Lactobacillus amylovorus*. **Process Biochemistry**. v. 34, p. 173-179, 1999.

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

JAGNOW, G.; DAWID, W. **Biotecnología**: Introducción con experimentos modelos. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, 1991.

JAY, J. M. **Fermentation and fermented dairy products**. Modern food microbiology. 6 ed. Gaithersburg, USA: Aspen Publishers, Inc. 2000. p. 113-130.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 524-534, 2007.

KANAZAWA, H.; NAGINO, M.; KAMIYA, S.; KOMATSU, S.; MAYUMI, T.; TAKAGI, K.; ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; NIMURA, Y. Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 390, p. 104-113, 2005.

KISHOR, C.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. C. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design of lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 98-103, 2007.

KRISTOFICOVA, L.; ROSENBERG, M.; VLNOVA, A.; SAJBIDOR, J.; CETRIK, M. Selection of *Rhizopus* strains for L (+) lactic acid and gammalinolenic acid production. **Folia microbiologica**, v. 36, p. 451-455, 1991.

KUERBANOGLU, E. B. Enhancement of citric acid production with ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. **Bioresource Biotechnology**, v. 92, p. 97-101, 2004.

KUMASR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugar cane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1731-1738, 2003a.

KUMASR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1725-1729, 2003b.

KURBANOGLU, E. B.; KURBANOGLU, N. I. Utilization for lactic acid production with a new acid hydrolysis of ram horn waste. **FEMS microbiology letters**, v. 225, p. 29-34, 2003.

KWON, S.; LEE, P. C.; LEE, E. G.; CHANG, Y. K.; CHANG, N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin supplemented soy bean hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 209-215, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Savier, 2000.

LEUDEKING, R.; PIRET, E. L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation Batch Process at Controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v. 4, n. 1, p. 393-412, 1959.

LIM, H. C.; LEE, K. S. **Process Control and Optimization**. In: Bioprocess Monitoring and Control, Hanser ed., Munique: M-N Pons, 1991.

LIMA, J. R. Caracterização físico-química e sensorial de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v. 32, n. 1, p. 191-195, jan./fev, 2008.

LIN, J.; ZHOUB, M.; ZHAOB, X.; LUOC, S.; LUC, Y. Extractive fermentation of l-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed, **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 369-374, 2007.

MALBASA, R.; LONCAR, E.; DJURIC, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses, **Food Chemistry**, v. 106, p. 1039-1045, 2008.

MATSUZAKI, T.; TAKAGI, A.; IKEMURA, H.; MATSUGUCHI, T.; YOKOKURA, T. Antitumor activity and action mechanisms of *Lactobacillus casei* through the regulation of immune responses. **Biofactors**, v. 22, p. 63-66, 2004.

MENEZES, J. B.; ALVES, R. E. **Fisiologia e tecnologia pós-colheita do pedúnculo do caju**. Fortaleza: EMBRAPA/ CNPAT, 1995. 20p.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, p. 426-428, 1959.

MODAK, J. M.; LIM, H. C. Optimal Mode of Operation of Bioreactor for Fermentation Process. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 15/16, p. 3869-3884, 1992.

MONTEAGUDO, J. M.; RINCON, J.; RUDRIGUEZ, L.; FUERTES, J. Optimization of the Conditions of the Fermentation of Beet Molasses of Lactic Acid by *Lactobacillus delbrueckii*. **Acta Biotechnologica**, v. 14, n. 3, p. 251-260, 1994.

NAGAO, F.; NAKAYAMA, M.; MUTO, T.; OKUMURA, K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei strain Shirota* on the immune system in healthy human subjects. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, p. 2706-2708, 2000.

NANCIB, A.; NANCIB, N.; MEZIANE – CHERIF, D.; BOUBENDIR, A.; FICK, M.; BOUDRANT, J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 63-67, 2005.



NANDASANA, A. D.; KUMAR S. Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1, **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 277-284, 2008.

NAVEENA, B. J.; ALTAF, M. D.; BHADRIAH, K.; REDDY, G. Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 485-490, 2005.

NAVEENA, B. J.; VISHNU, C.; ALTAF, M. D.; REDDY, G. Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions. **Journal of scientific & industrial research**, v. 62, p. 453-456, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane Bagasse, **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava Bagasse, **Bioresource Technology**. v. 74, p. 81-87, 2000b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. 2001. Xi. 221 p., ISBN 81-87680-06-7.

PELCZAR, J. R.; MICHAEL, J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, v. 1, 2<sup>o</sup> ed, São Paulo: MAKRON Books, 1996. 524p.

PETINARI, R. A.; TARSITANO, M. A. A. Cashew (*Anacardium occidentale* L.) commercialization in northwest of São Paulo state. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 697-699, dec. 2002. ISSN 0100-2945.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2006.

PONTES, C. R. **Enriquecimento protéico do bagaço de caju através de fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger***. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado e Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

PRICE, R. L.; HOLANDA, L. F. F.; MOURA FÉ, J. A.; MAIA, G. A.; MARTINS, C. B. Constituents of brazilian cashew apple juice. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 5, n. 1-2, p. 61-65, 1975.

RABELO, C. M. **Aproveitamento do pedúnculo do caju para síntese de oligossacarídeos prebióticos**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RACCACH, M.; MAMIRO, T. The effect of temperature on the lactic acid fermentation of rye flour. **Food Microbiology**, v. 4, p. 213-220, 1997.

RANDAZZO, C. L.; HEILIG, H.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P.; CAGGIA, C. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. **Journal of applied microbiology**, v. 99, p. 251-258, 2005.

RASHID, R. **Optimization and modeling of lactic acid production from pineapples wastes**. 2008. 238 f. Tese (Doutorado em Química e Engenharia de Recursos Naturais) – Faculdade de Química e Engenharia de Recursos Naturais. Universidade Tecnológica da Malásia, Malásia, 2008.

REDDY, G.; ALTAF, M. D.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review, **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 22-34, 2008.

RICHTER, K.; BERTHOLD, C. Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 71, p. 181-191, 1998.

RICHTER, K.; TRAGER, A. L(+) Lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid state fermentations. **Acta Biotechnologica**, v. 14, p. 367-378, 1994.

RICO, J.; YEBRA M, J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; DEUTSCHER, J.; MONEDERO, V. Analysis of *ldh* genes in *Lactobacillus casei* BL23: role on lactic acid production, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 579-586, 2008.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142, 2006.

RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor**. 2003. 250 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SANCHO, S. O. **Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. 2006. 137 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SANNI, A.; MORLON-GUYOT, J.; GUYOT, J. P. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. **International journal of food microbiology**, v. 72, p. 53-62, 2002.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial** – v.2 – Engenharia Bioquímica, São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

SILVA, NEUSELY DA.; AMSTALDEN, V. C. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Revisão: Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 135-143, mai./ago. 2001.

SILVA, R. G. **Inferências de variáveis do processo de produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 2003. 238 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

SILVEIRA, M. S. **Utilização do suco de caju clarificado para produção de ácido lático pelo *Lactobacillus casei* B-442**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SINDICAJU. Importância do Caju no Ceará, **SINDICAJU**, Ceará, 21 mai. 2009, Disponível em: <[www.sindicaju.org.br/site/noticia.importancia.caju.html](http://www.sindicaju.org.br/site/noticia.importancia.caju.html)>. Acesso em: 21 mai. 2009a.

SINDICAJU. Exportação de Amêndoas de Castanha de Caju (ACC), **SINDICAJU**, Ceará, 21 mai. 2009, Disponível em: <<http://www.sindicaju.org.br/site/exportacao.html>>. Acesso em: 21 mai. 2009b.

SOUZA, P. A.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; MENDONÇA, V. S. Caracterização química de pedúnculos de caju ‘CCP-76’ em diferentes estádios de desenvolvimento. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2002, Belém. **Resumos...** Belém: SBCTA, 2002. P. 158.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAFSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 899-907, 1998.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Review article: lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International journal of food microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.

STREDANSKA, S.; SLUGEN, D.; STREDANSKY, M.; GREGO, J. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* grown on solid substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 511-513, 1993.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 11-16, 1999.

TACHIBANA, T.; SHINDO, S. Production of L- lactic acid from spent grain, a by – product of beer production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, p. 347-351, 2004.

TANAKA, T.; HOSHINA, M.; TANABE, S.; SAKAI, K.; OHTSUBO, S.; TANIGUCHI, M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation, **Bioresource Technology**, v. 97, p. 211-217, 2006.

TEIXEIRA, A.; J. INDÚSTRIA DE CAJU NO BRASIL, **SINDICAJU**, Ceará, 11 ago. 2007. Disponível em: <<http://www.sindicaju.org.br/site/noticia.industria.html>>. Acesso em: 21 mai. 2009.

TÉLLEZ-LUIS, S. J.; MOLDES, A. B.; ALONSO, J. L.; VÁZQUEZ, M. Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* through response surface methodology. **Food Microbiology and Safety**, v. 68, p. 1454-1458, 2003.

TONG, W. Y.; FU, X. Y.; LEE, S. M.; TU, J.; LUI, J. W.; WEI, D. Z. *et al.* Purification of L(+) lactic acid from fermentation broth with paper sludge as cellulosic feedstock using weak acid anion exchange Amberlit IRA-92. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 89-96, 2004.

TONY, W. Y.; FU, X. Y.; LEE, S. M.; YU, J.; WEI, D. Z. Purification of L (+) lactic acid from fermentation broth with paper sludge as cellulosic feedstock using weak anion exchange Amberlite IRA- 92. **Biochemical engineering journal**, v. 18, p. 89-96, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2000.

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; OULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biotecnología: Principios Biológicos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990. 284p.

TSAO, G. T.; CAO, N. J.; CONG, C. S. Production of multifunctional organic acids from renewable sources. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 243-248, 1999.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; LEBEAULT, J. M.; KRIEGER, N. Cassava wastes hydrolysate an alternative carbon source for citric acid production by *Candida lipolytica*. In: Internatl. Congr. Biotech, Portugal. **Anais do Congresso Internacional de Biotecnologia**, Portugal, 1998.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, in press. 1999.

VAZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources factorial and kinetic studies. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 605-613, 2006.

VENKATESH, K. V. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. **Bioresource Technology**, v. 62, p. 91-98, 1997.

VERGARA, C. M. A. C. **Obtenção de oligossacarídeos prebióticos por processo fermentativo a partir do suco de caju clarificado *in natura***. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

VICKROY, T. B. **Comprehensive biotechnology**, Toronto: Dic Pergamon, 1985.

VISHNU, C.; SEENAYYA, G.; REDDY, G. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 155-158, 2000.

VISHNU, C.; SEENAYYA, G.; REDDY, G. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 429-433, 2002.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, K.; HAMMES, W. P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2578-2585, 2001.

WANG, Q.; NARITA, J. Y.; XIE, W.; OHSUMI, Y.; KUSANO, K.; SHIRAI, Y.; OGAWA, H. Effects of anaerobic/aerobic incubation and storage temperature on preservation and deodorization of kitchen garbage. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 213-220, 2002.

WEE, Y.; KIM, J.; YUN, J.; RYU, H. Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 568-573, 2004.

WILSON, S. D.; HORNE, D. W. Use of Glycerol-Cryoprotected *Lactobacillus casei* for Microbiological Assay of Folic Acid. **Clinical Chemistry**, v. 28, p. 1198-1200, 1982.

WISSELINK, H. W.; WEUSTHUIS, R. A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G. J. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 151-161, 2002.

YOO, I. K.; CHANG, H. N.; LEE, E. G.; CHANG, Y. K.; MOON, S. H. Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 172-175, 1997.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria, **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 38, p. 73-75, 2005.

YU, L.; LEI, T.; REN, X.; PEI, X.; FENG, Y. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus*

*rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochemical Engineering Journal**, 2007, in press, doi: 10.1016/j.bej.2007.11.008

ZHANG, S.; XU, G.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; WANG, Y. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 189-197, 2008.

**APÊNDICE A** – Resultados da primeira, segunda e terceira modelagem

Nas Figuras 19 e 20 são apresentados os resultados da primeira modelagem para crescimento microbiano, produção de ácido lático e consumo de substrato para o processo de fermentação láctica no suco de caju clarificado como meio de cultura utilizando o *L. casei* como biocatalizador. A primeira modelagem não levou em conta a taxa de morte microbiana nem as inibições do lactato acumulado no crescimento microbiano e na produção de ácido lático na fermentação em batelada.

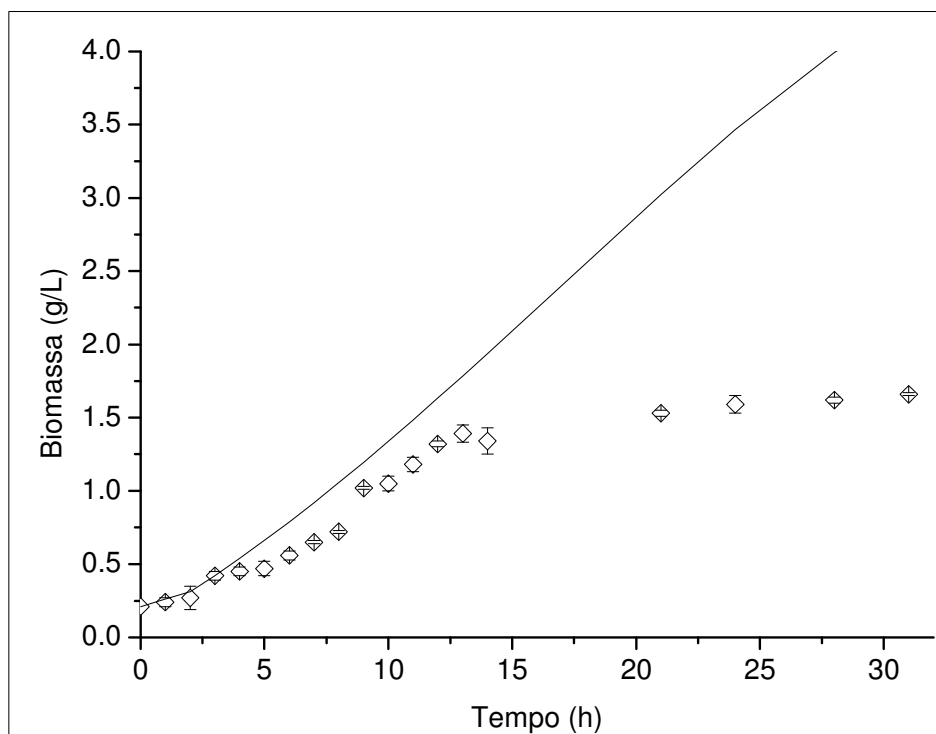


Figura 19 - Resultados da primeira modelagem para o crescimento microbiano ( $\diamond$ ) e sua regressão não-linear (—).



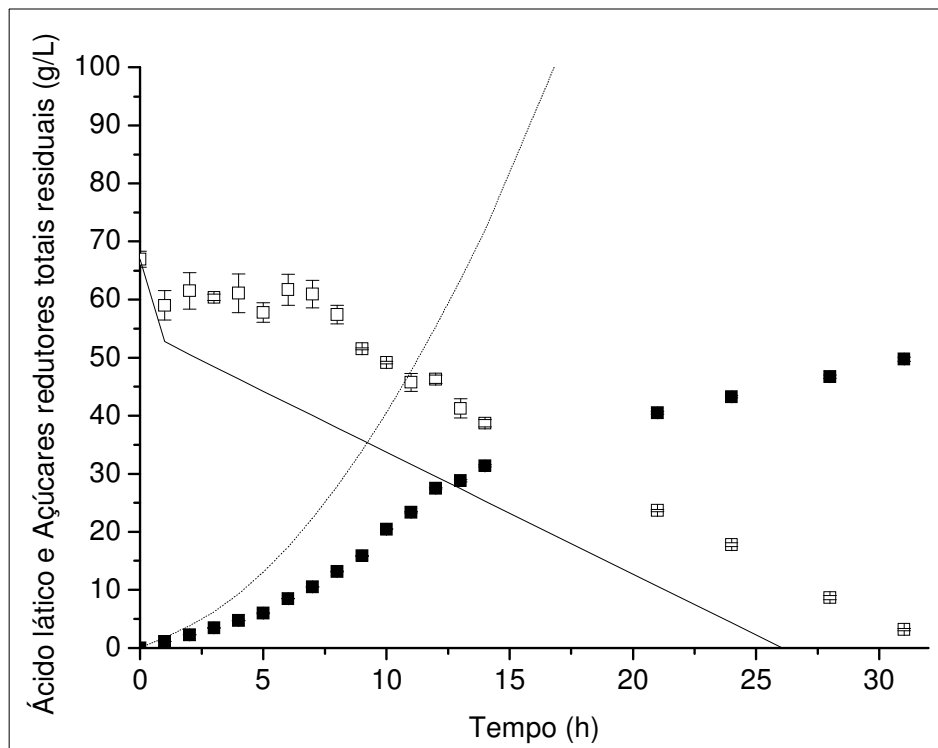


Figura 20 - Resultados da primeira modelagem para a produção de ácido láctico (■) e sua regressão não-linear (---) e para o consumo de substrato (□) e sua regressão não-linear (—).

Na segunda modelagem foi levada em consideração a taxa de morte microbiana no modelo de crescimento microbiano. Nas Figuras de 21 e 22 são apresentados os resultados da segunda modelagem para crescimento microbiano, produção de ácido lático e consumo de substrato para o processo de fermentação láctica estudado.

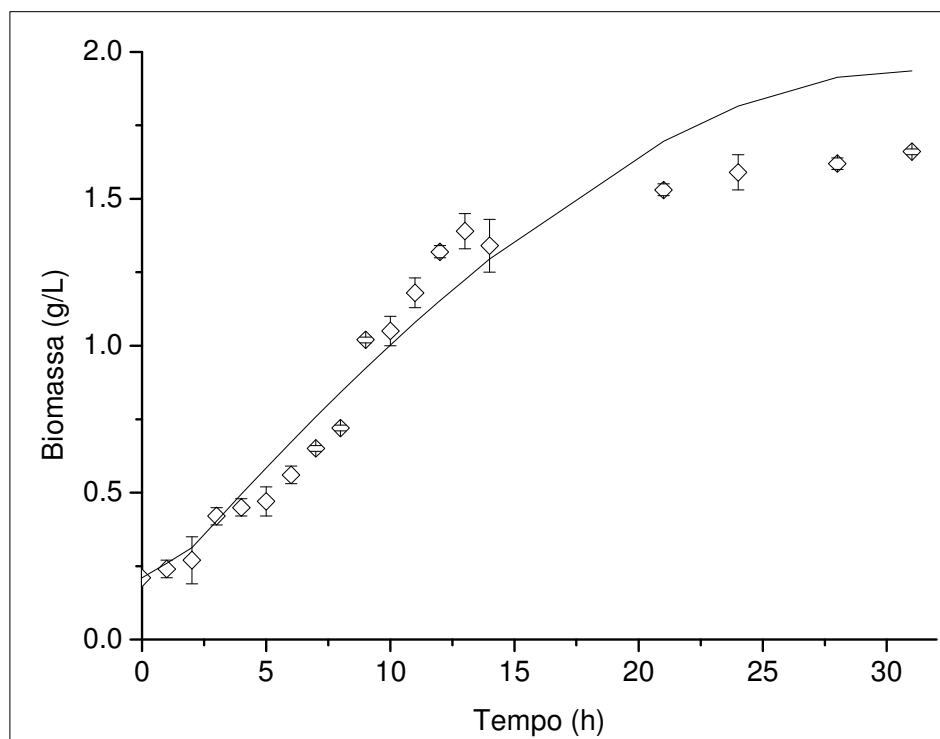


Figura 21 - Resultados da segunda modelagem para o crescimento microbiano ( $\diamond$ ) e sua regressão não-linear (—).

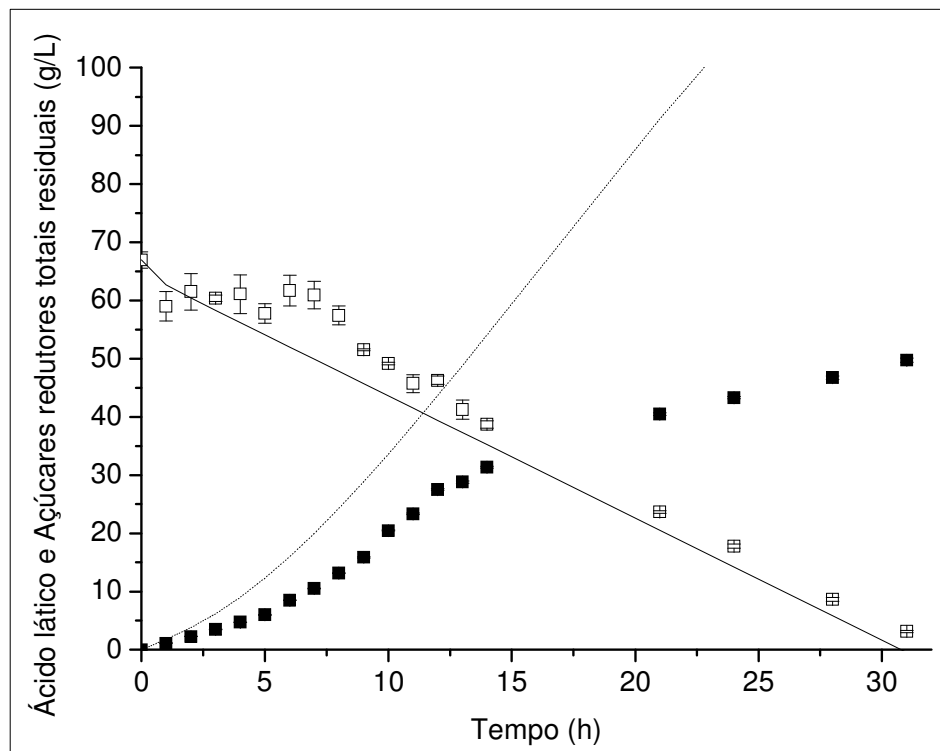


Figura 22 - Resultados da segunda modelagem para a produção de ácido láctico (■) e sua regressão não-linear (---) e para o consumo de substrato (□) e sua regressão não-linear (—).

Na terceira modelagem foi levada em consideração a taxa de morte microbiana na equação de crescimento microbiano e a inibição da produção de ácido lático na equação de produção láctica pelo lactato formado e acumulado no processo de fermentação láctica em batelada, aqui estudada, onde o pH foi controlado com adição de hidróxido de sódio no decorrer da fermentação. Nas Figuras 23 e 24 são apresentados os resultados da terceira modelagem para crescimento microbiano, produção de ácido lático e consumo de substrato.

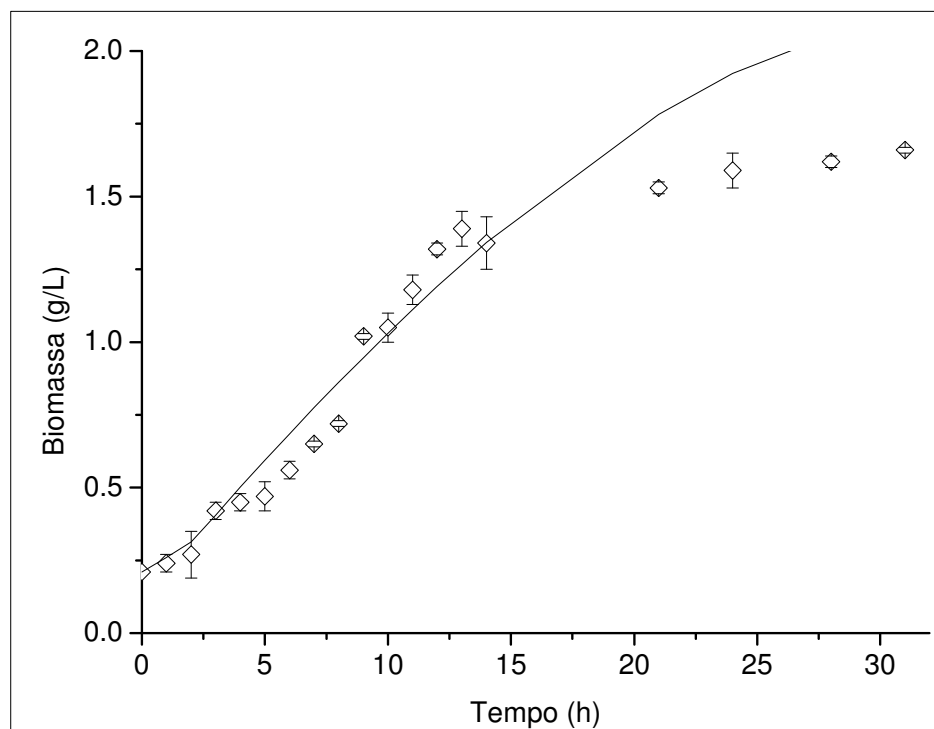


Figura 23 - Resultados da terceira modelagem para o crescimento microbiano ( $\diamond$ ) e sua regressão não-linear (—).

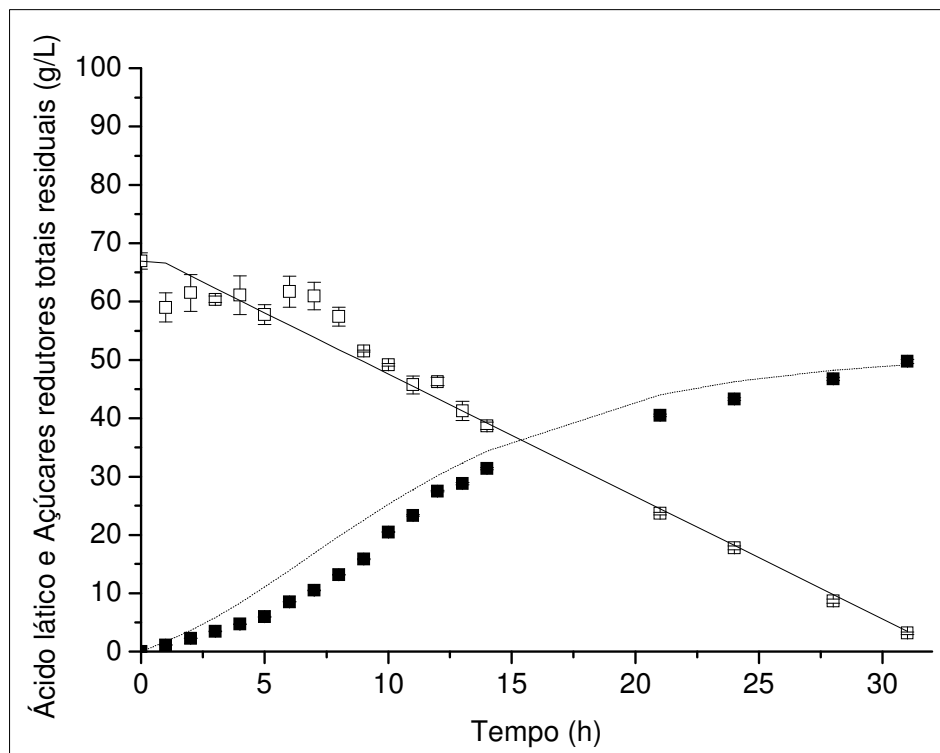


Figura 24 - Resultados da terceira modelagem para a produção de ácido láctico (■) e sua regressão não-linear (---) e para o consumo de substrato (□) e sua regressão não-linear (—).

## APÊNDICE B – Resultados das simulações em batelada

Nas Figuras de 25 a 31 são apresentados os resultados para a produção de ácido láctico e biomassa bem como para o consumo de açúcares redutores totais das simulações realizadas em batelada para a otimização da fermentação láctica.

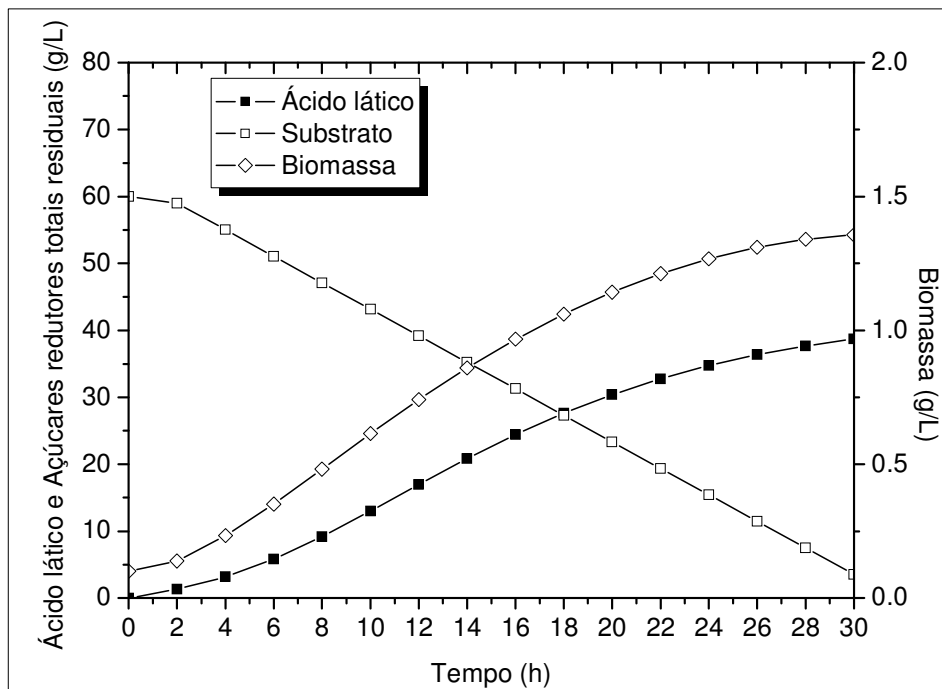


Figura 25 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,1 g/L de inóculo.

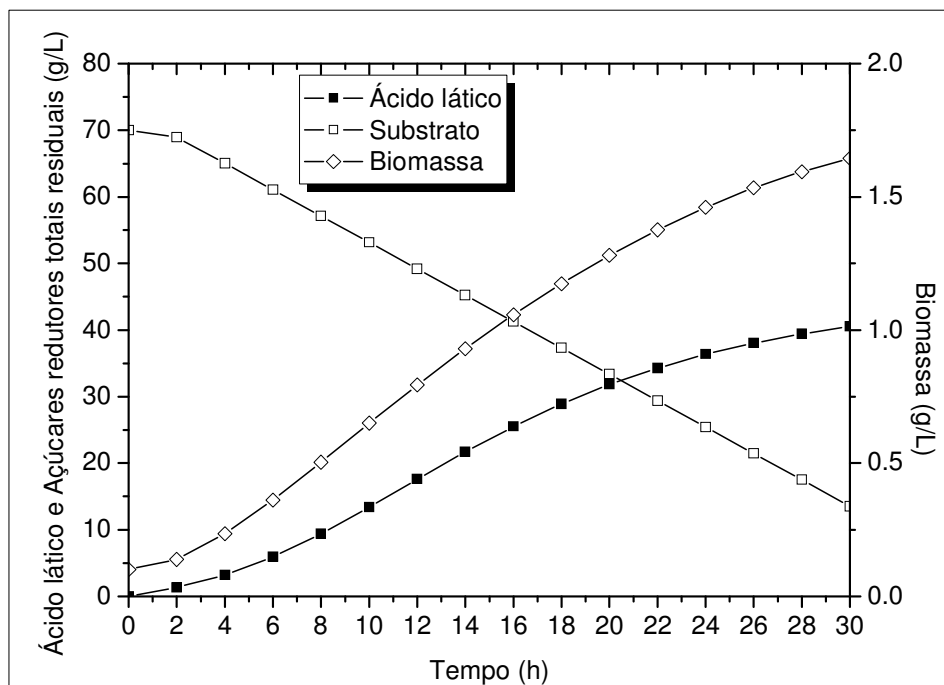


Figura 26 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 70 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,1 g/L de inóculo.

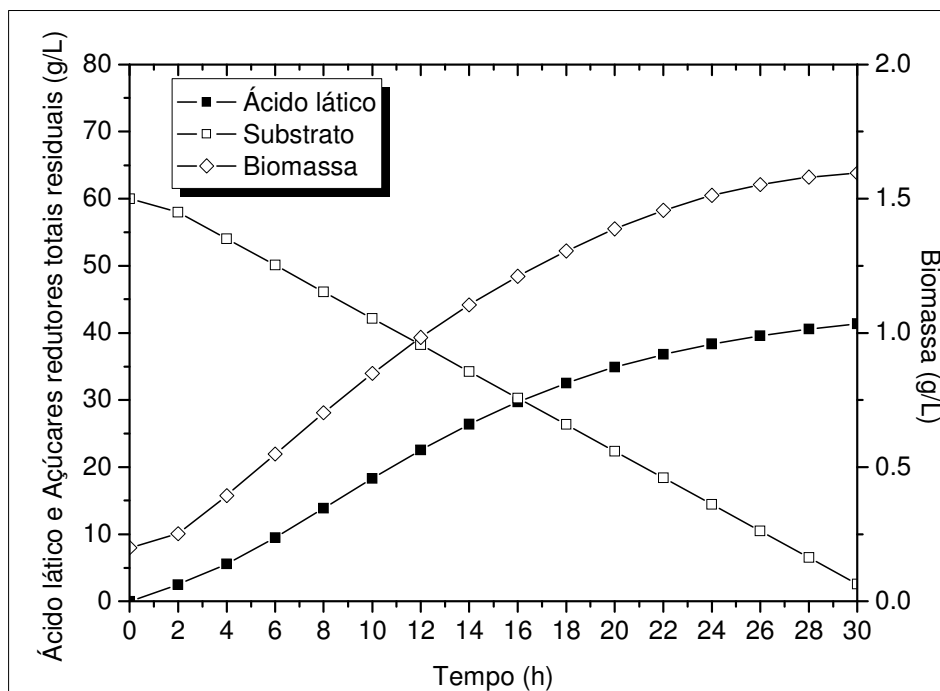


Figura 27 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,2 g/L de inóculo.



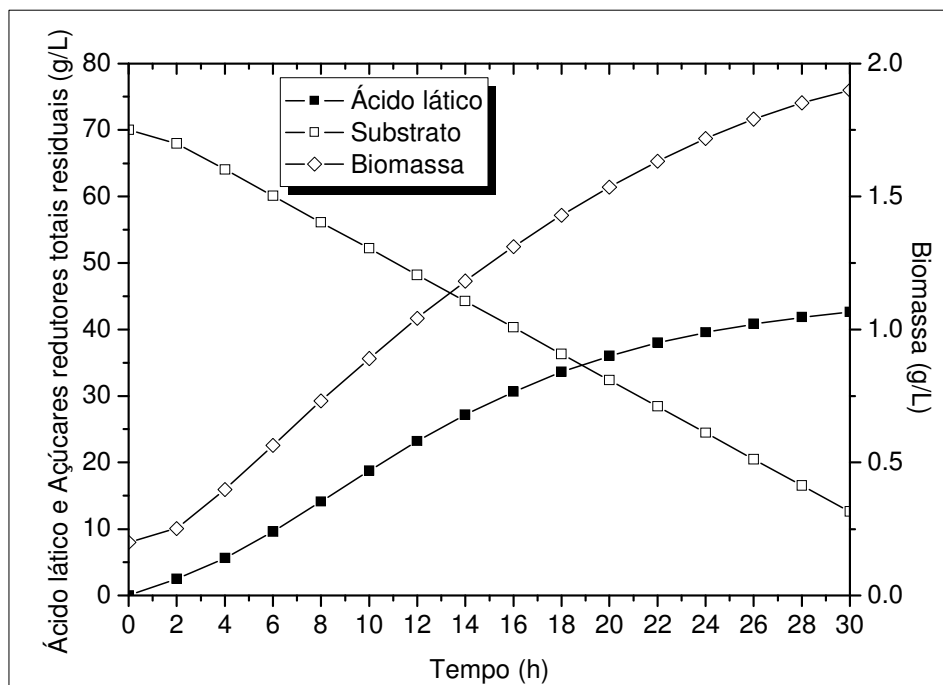


Figura 28 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 70 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,2 g/L de inóculo.

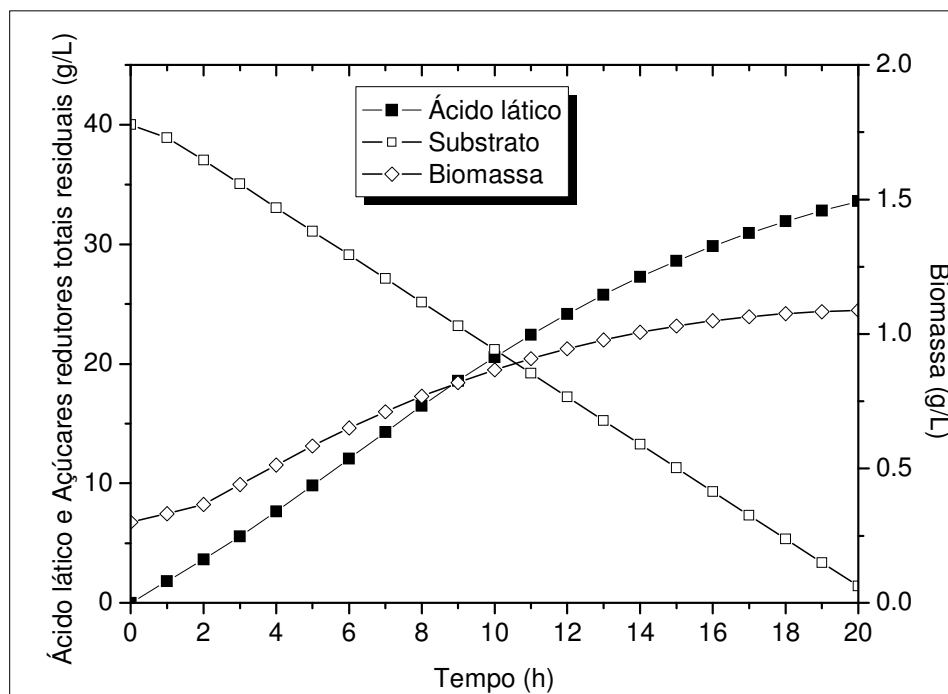


Figura 29 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 40 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.

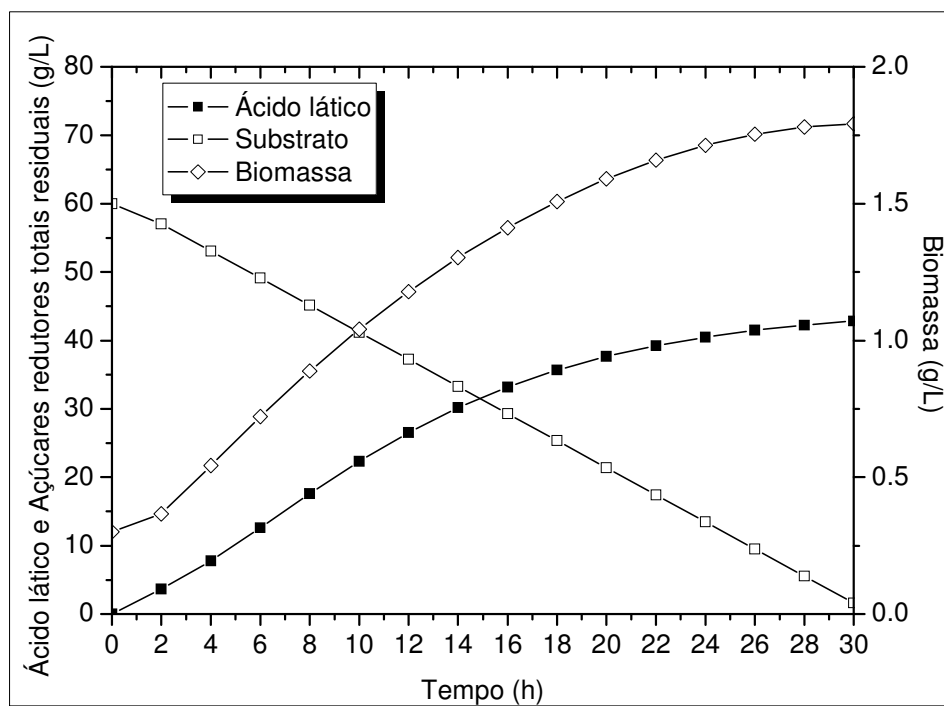


Figura 30 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 60 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.

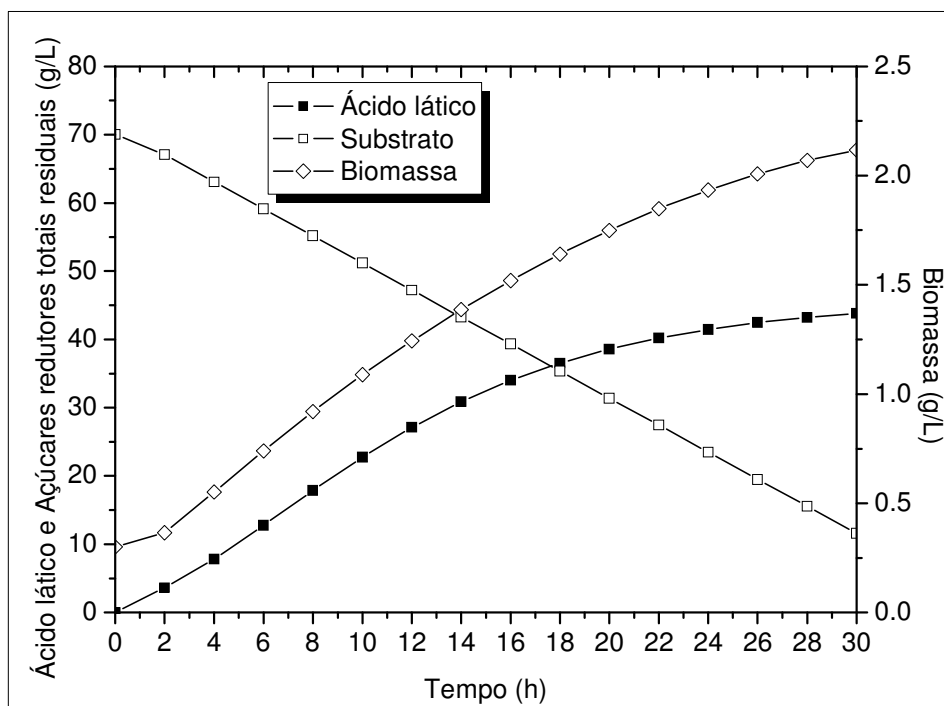


Figura 31 - Resultados da produção de ácido láctico e biomassa, bem como do consumo de açúcares redutores totais para a otimização em batelada com 70 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 0,3 g/L de inóculo.

**APÊNDICE C** – Resultados das simulações em batelada alimentada

Nas Figuras de 32 a 43 são apresentados os resultados para o comportamento microbiano, variação de volume da dorna de fermentação, produção de ácido lático e o consumo de açúcares redutores totais das simulações realizadas em batelada alimentada para a otimização da fermentação láctica.

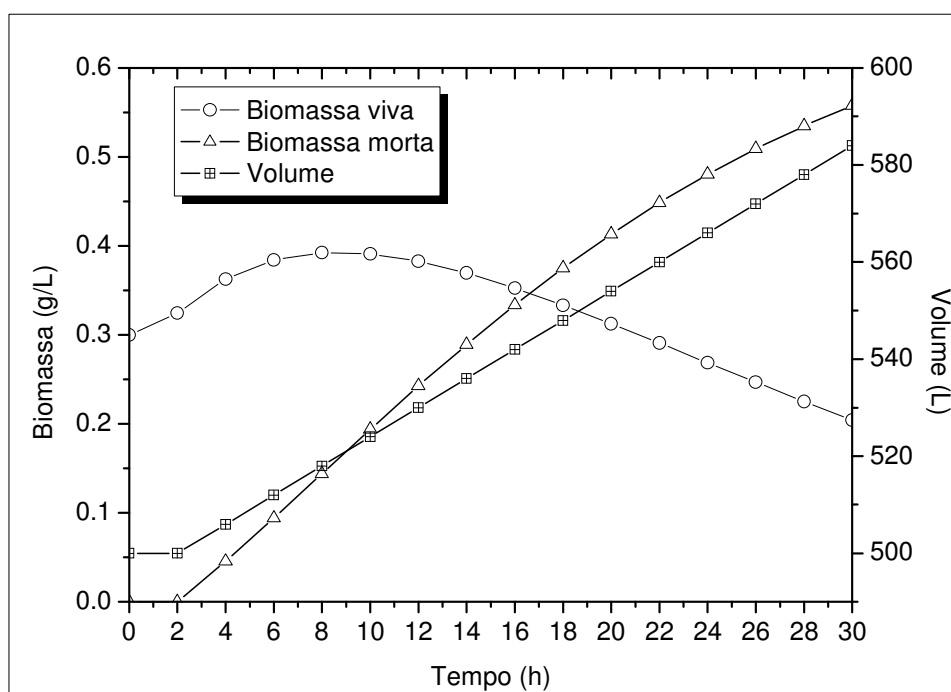


Figura 32 - Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

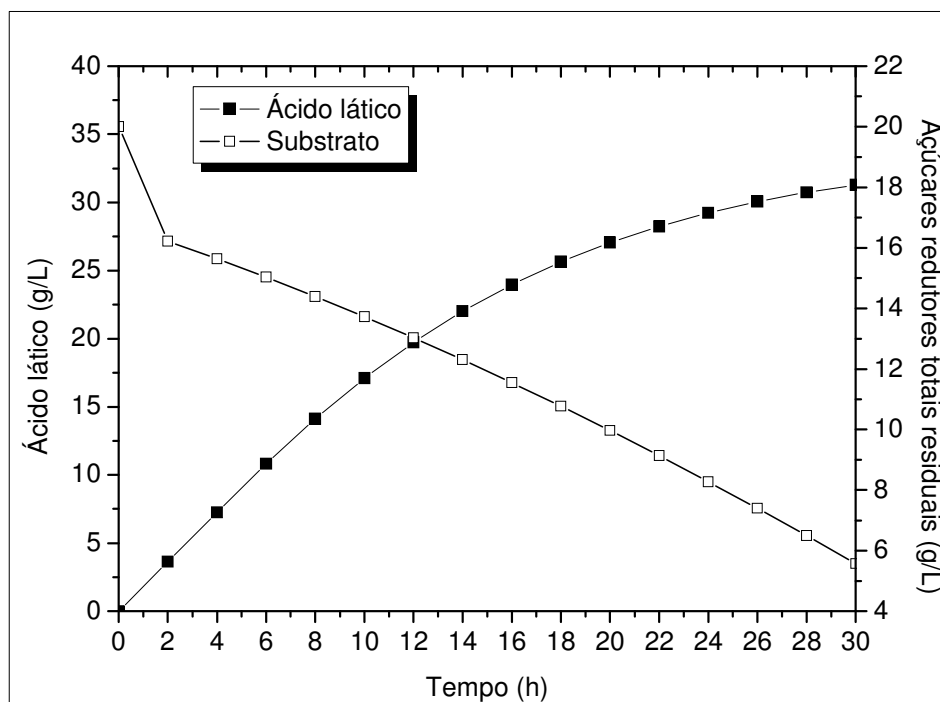


Figura 33 - Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

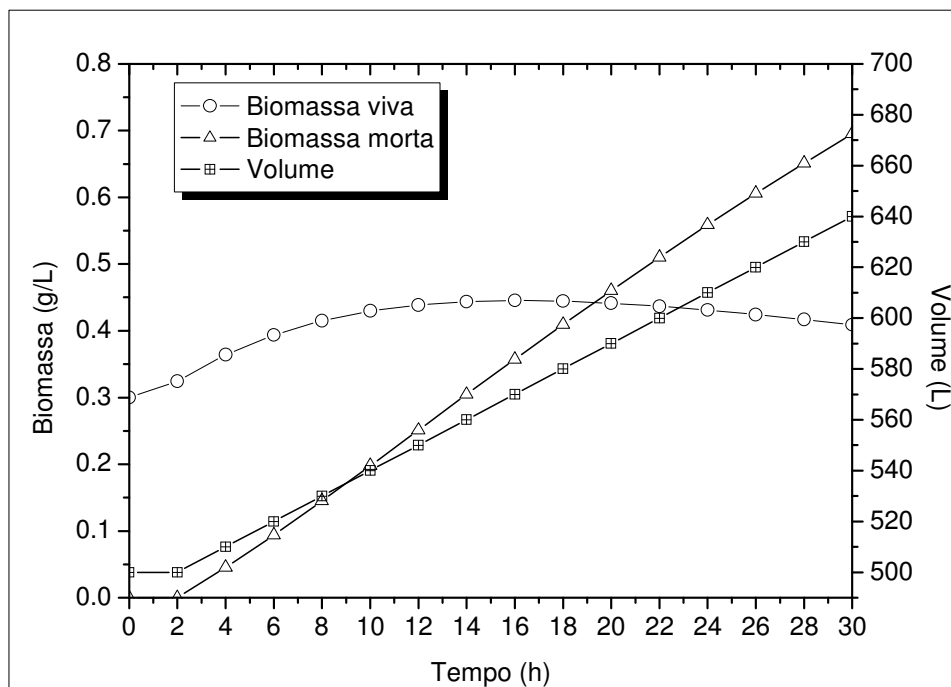


Figura 34 - Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 5 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

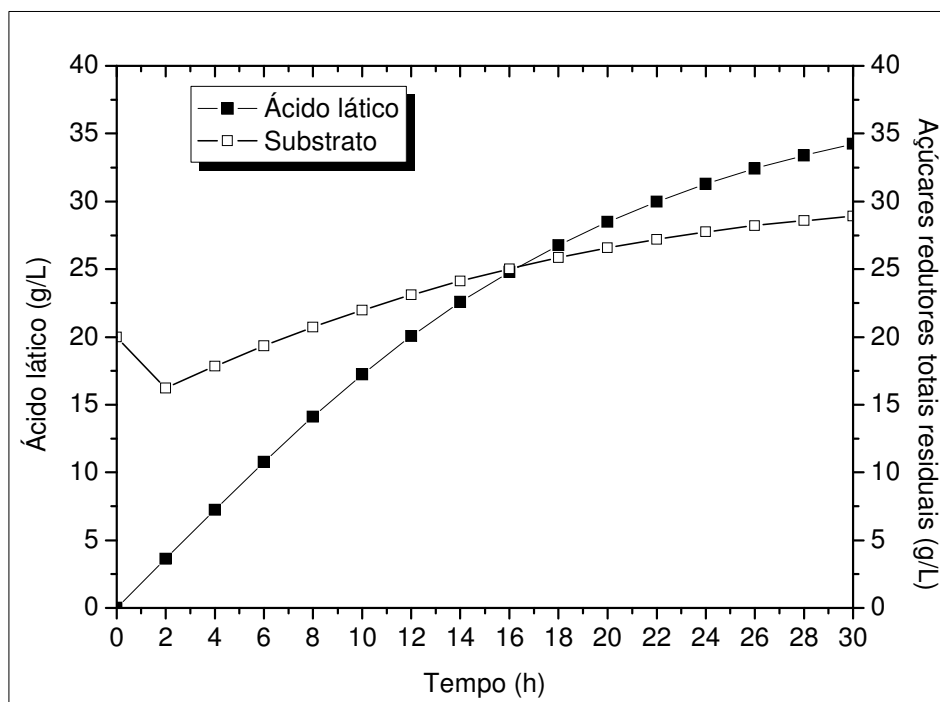


Figura 35 - Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 5 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.



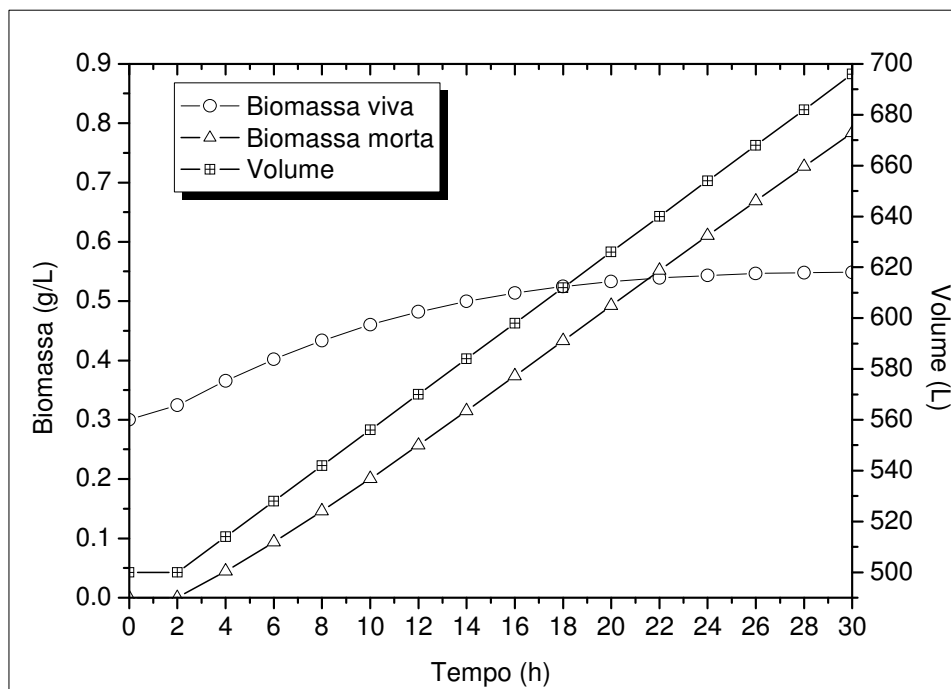


Figura 36 - Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 7 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

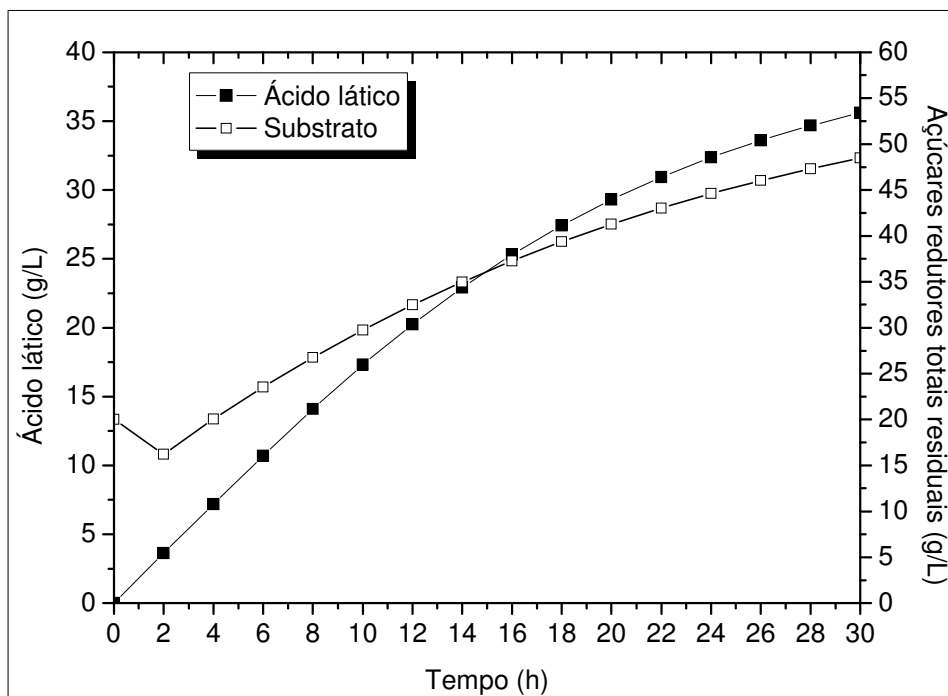


Figura 37 - Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 20 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 7 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

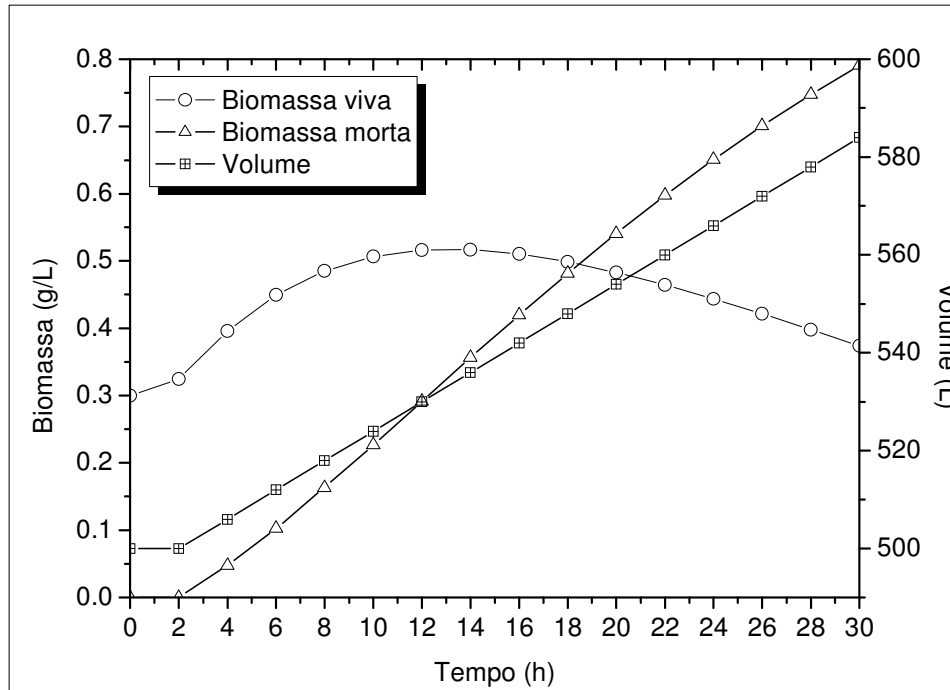


Figura 38 - Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

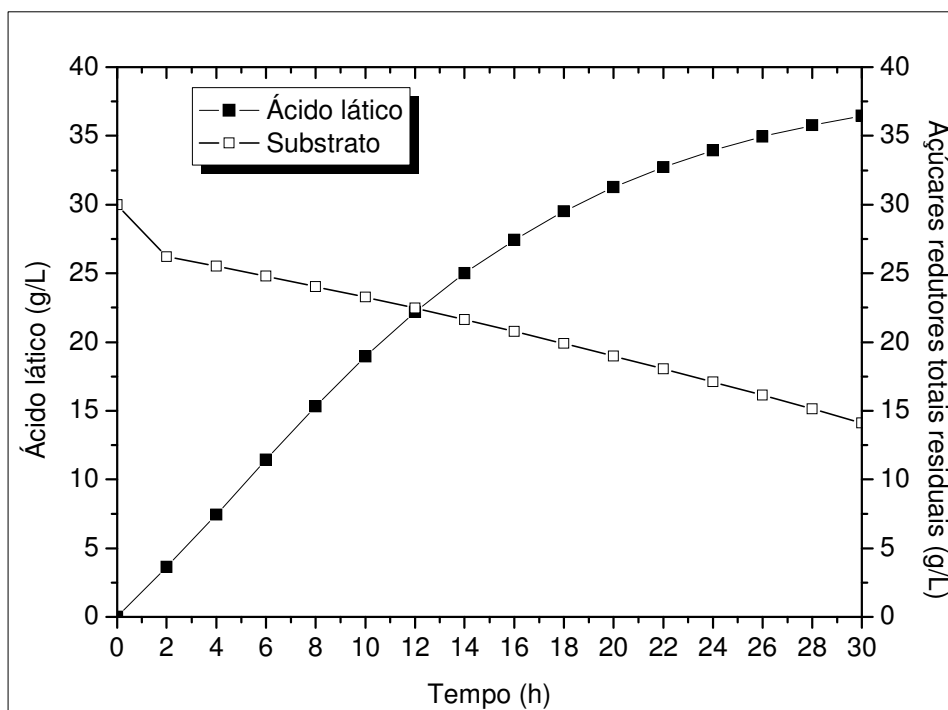


Figura 39 - Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 300 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

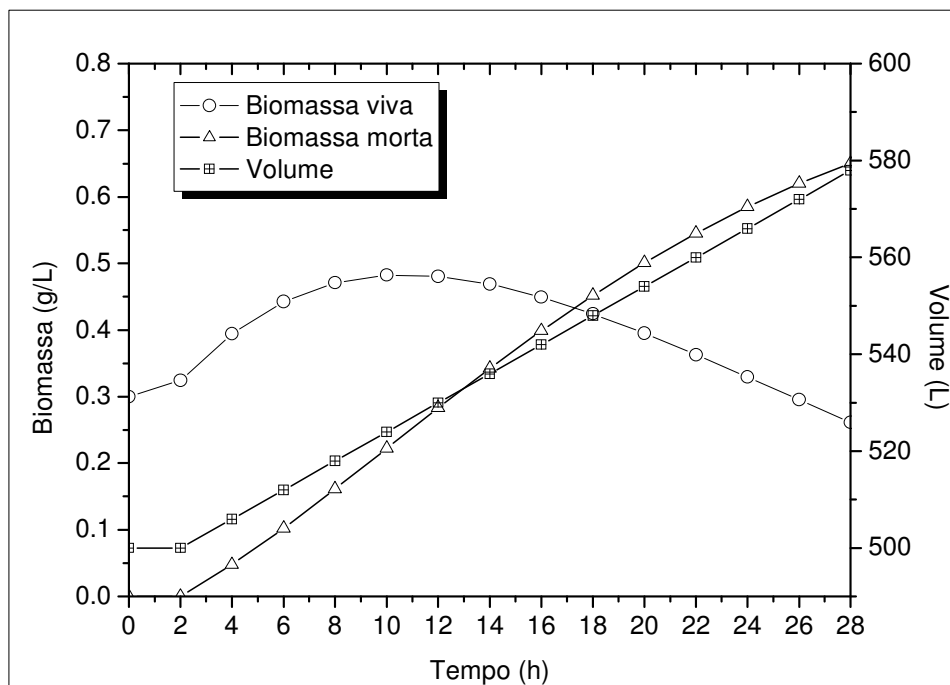


Figura 40 - Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

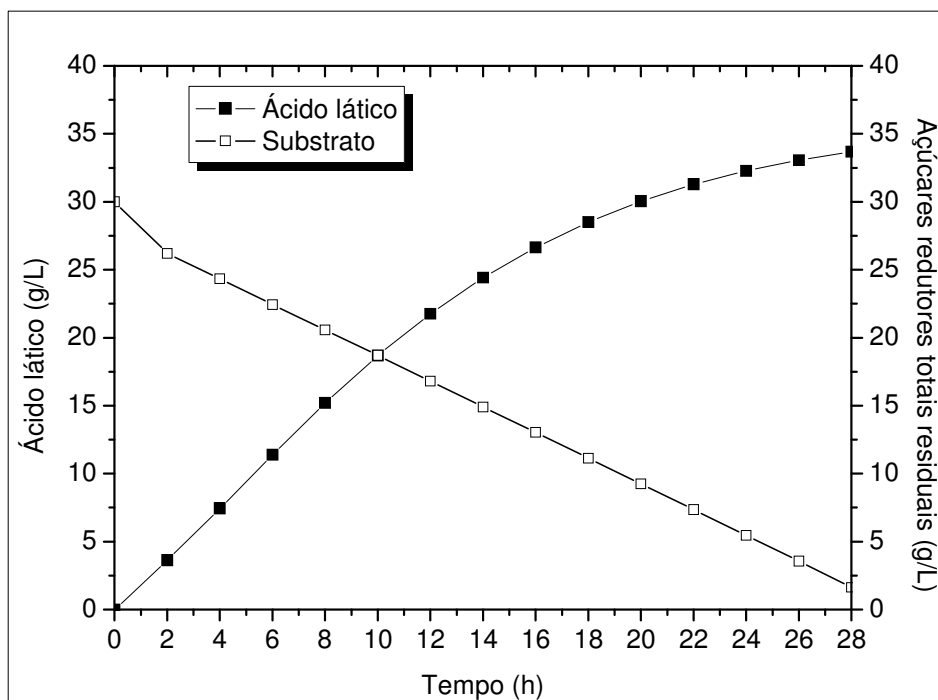


Figura 41 - Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 200 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

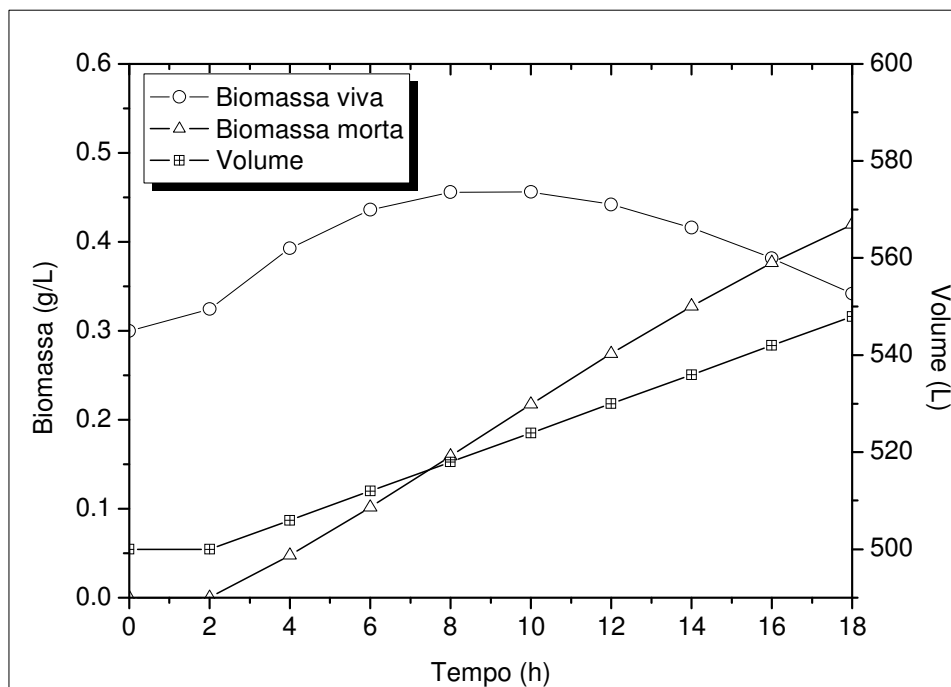


Figura 42 - Resultados do comportamento microbiano e variação do volume na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 100 g/L de suco de caju concentrado alimentado.

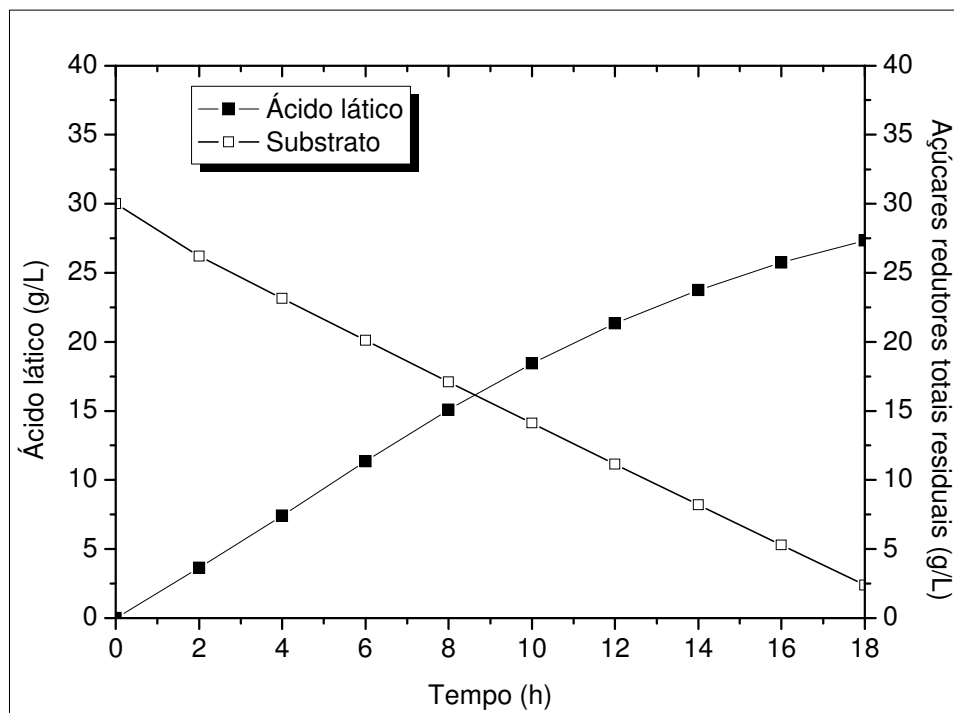


Figura 43 - Resultados da produção de ácido láctico e consumo de substrato na simulação em batelada alimentada para o inóculo de 0,3 g/L, com 30 g/L de açúcares redutores totais iniciais, a vazão de 3 L/h e concentração de 100 g/L de suco de caju concentrado alimentado.





UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ALEXANDRE DE ARAUJO GUILHERME

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus*  
*casei* NRRL B-442 EM SUCO DE CAJU CLARIFICADO**

FORTALEZA  
2009

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)