



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS**

**PRODUÇÃO E CONTROLE DA SÍNTESE DO ÉSTER DE ÁCIDO ACRÍLICO
ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO**

Autora: Betânia Hoss Lunelli
Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
Co-Orientador: Dr. Daniel Ibraim Pires Atala

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo
Setembro de 2010.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

L973p Lunelli, Betânia Hoss
Produção e controle da síntese do éster de ácido
acrílico através da fermentação do ácido láctico / Betânia
Hoss Lunelli. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Rubens Maciel Filho, Daniel Ibraim
Pires Atala.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Lactatos. 3. Simulação. 4.
Destilação. 5. Modelagem matemática. I. Maciel Filho,
Rubens. II. Atala, Daniel Ibraim Pires. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Production and control of the acrylic acid ester synthesis
through lactic acid fermentation

Palavras-chave em Inglês: Fermentation, Lactates, Simulation, Distillation,
Mathematical modeling

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Carlos Eduardo Vaz Rossell, Cecília Amélia de Carvalho
Zavaglia, Paulo Jorge da Silva Bártolo, André Luiz Jardini
Munhoz

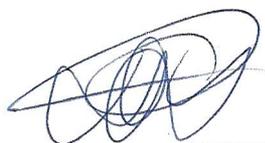
Data da defesa: 29/09/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

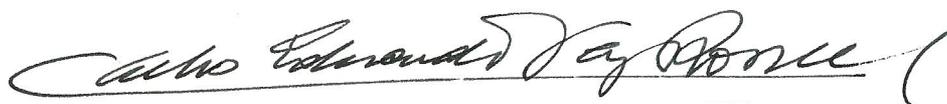
Tese de Doutorado defendida por Betânia Hoss Lunelli e aprovada em 29 de setembro de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho - Orientador



Dr. Daniel Ibraim Pires Atala – Co-orientador



Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell



Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia



Prof. Dr. Paulo Jorge da Silva Bártolo



Dr. André Luiz Jardim Munhoz

Esse exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rub Maciel Filho', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Orientador)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Daniel Ibraim Pires Atala', written over a horizontal line.

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala (Co-orientador)

*Aos meus pais Antônio e Iria, e ao
meu irmão Rodrigo com muito amor e
carinho....*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Uma tese não é fruto de um trabalho solitário, mas é o resultado da dedicação de várias pessoas. Portanto, gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que o objetivo deste trabalho fosse alcançado.

Aos meus pais, Antônio e Iria, merecedores da minha admiração e respeito, nunca medindo esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos e por todo amor que sempre me dedicaram.

Ao meu irmão Rodrigo pelo incentivo e por seu carinho comigo.

À minha cunhada Valéria pelo carinho e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens pela orientação, confiança, compreensão, incentivo, otimismo e atenção com entusiasmo que sempre demonstrou ao receber minhas idéias.

Ao meu co-orientador Daniel pela orientação, sugestões, apoio, amizade e pela oportunidade de desenvolver o trabalho no CTC.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Rubens e à Profa. Dra. Maria Regina pelo carinho e pela amizade. Vocês foram fundamentais nestes três anos muito importantes e felizes da minha vida.

Muito Obrigado!

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) pela oportunidade de realizar os experimentos em seus laboratórios. Uma excelente experiência, tanto profissional quanto pessoal, pois além de desenvolver uma parte do meu trabalho de tese, também fiz amizades que espero que durem por muitos anos. Ao pessoal do Bloco 7 (Daniel, Márcia, Marco, Nilton, Dionísio, Sérgio, Graciela, Lindaura, Célia, Zé, Godoy) pela acolhida e pelo agradável convívio, pelos momentos descontraídos e pelos ensinamentos adquiridos. Um agradecimento especial a Márcia pelas dicas de microbiologia, por toda ajuda no trabalho de *screening*, nas fermentações, pelas nossas conversas, risadas e em especial a nossa amizade.

Ao Nilton pelas aulas de química, pela ajuda na montagem e também no desenvolvimento do processo de destilação reativa, pelas dicas importantes e pelas fantásticas ideias e “devaneios”.

Ao Paulo Gouveia pelas dicas de HPLC.

Ao Prof. Francisco Maugerí por permitir a realização das fermentações no Laboratório de Bioprocessos (LEB) da FEA.

Ao pessoal do LEB pela convivência durante os meses que trabalhei no laboratório em especial ao Remi pela ajuda nas fermentações e nas análises cromatográficas.

Ao Rafael por todo a sua ajuda durante a realização das fermentações e análises em cromatografia e também, pela companhia durante as madrugadas no laboratório fazendo fermentações.

À Angélica que a partir das nossas viagens ao CTC tornou-se uma grande amiga.

Aos colegas do LOPCA pelo convívio e pelo ambiente agradável de trabalho, descontração e alegrias.

À Delba pela amizade, boas conversas e companhia nos almoços quase que diários na UNICAMP.

Aos colegas Astrid, Guilherme e André pelos nossos trabalhos de PLA.

Ao Igor pela ajuda no GA, ao Ruben pela ajuda nas simulações em Aspen e ao Nadson pelas dicas de controle.

Ao Edvaldo que se dispôs a me ajudar com os programas de Fortran e com o simulador Aspen na fase final do trabalho, que apesar da “correria” teve muita paciência e dedicação.

À FAPESP pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários da FEQ.

Enfim, a Deus pela vida e por ter colocado no meu caminho pessoas queridas e especiais, que fizeram parte desta etapa tão importante da minha vida.

*“Durante a nossa vida conhecemos pessoas
que vem e que ficam,
Outras que vem e passam.
Existem aqueles que, vem, ficam e depois de
algum tempo se vão.
Mas existem aqueles que vem e se vão com
uma enorme vontade de ficar”
Charles Chaplin*

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido a vida. E o que faz com que ela não seja curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

RESUMO

O contínuo desenvolvimento de processos fermentativos de baixo custo e altamente eficientes para produção de ácidos orgânicos cria novas oportunidades para produção de produtos químicos a partir de matéria-prima renovável. A combinação do baixo custo de produção de ácido láctico a partir da fermentação da cana-de-açúcar, redução da dependência do petróleo e o uso de biocatalisadores, tornam o processo de produção de acrilatos e lactatos atrativo do ponto de vista ambiental e também econômico, dependendo do processo. Novas aplicações de ácido láctico, principalmente, na produção de polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis (poli-ácido láctico) e solventes verdes (lactato de etila) vêm despertando interesse e tem potencial para expandir o mercado, desde que processos economicamente viáveis e eficientemente competitivos sejam desenvolvidos. Este trabalho teve como objetivo a produção de ácido láctico via processo fermentativo, seguindo com sua esterificação com etanol para obtenção de lactato de etila e posterior desidratação de lactato de etila para síntese de acrilato de etila. A fim de determinar condições ideais de processo, considerando uso de matéria-prima renovável e de baixo custo, inicialmente foi selecionada uma bactéria láctica adaptada a ambiente industrial, capaz de assimilar sacarose para produção de ácido láctico. Foram desenvolvidos planejamentos experimentais para determinação das melhores condições operacionais e também, determinada a cinética do processo de fermentação láctica, que foi usada na modelagem do processo. O ácido láctico produzido foi esterificado com etanol a partir de um processo de destilação reativa para obtenção de lactato de etila. Para finalizar o trabalho, foram avaliados caminhos alternativos para desidratação de lactato de etila para síntese de acrilato de etila.

ABSTRACT

The continuous development of fermentative processes of low cost and highly efficient to organic acids production to create new opportunities for chemical production from renewable raw materials. The combination of the low cost of lactic acid production from sugarcane fermentation, reduction oil dependence and biocatalysts use, make the production of acrylates and lactates attractive of the viewpoint environmental and also economic, depending on the process. New application of lactic acid, mainly in the production of biodegradable polymer (poly-lactic acid) and green solvents (ethyl lactate) have attracted interest and has potential to expand the market since economically viable and competitive effectively processes are developed. The aim of this study was the lactic acid production by fermentation, following with its esterification with ethanol to obtain ethyl lactate and subsequent dehydration to the ethyl acrylate synthesis. In order to determine the process ideal conditions, considering the use of renewable raw materials and low cost, initially was selected a lactic acid bacteria adapted to an industrial environment, able to ferment sucrose to lactic acid production. Were developed experimental design for determining the best operating conditions and to determine the kinetics of lactic fermentation which was used in the fermentative process modeling. Lactic acid produced was esterified with ethanol from a reactive distillation process for obtaining ethyl lactate. To conclude the work, were evaluated alternative pathways for ethyl lactate dehydration to the ethyl acrylate synthesis.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
<i>CAPÍTULO I</i>	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivos	5
1.3 Organização da Tese.....	7
<i>Referências Bibliográficas</i>	9
<i>CAPÍTULO II</i>	11
Revisão Bibliográfica	11
2.1 Cana-de-Açúcar	11
2.2 Ácido Lático.....	12
2.2.1 <i>Bactérias do ácido lático</i>	16
2.2.2 <i>Produção do ácido lático</i>	19
2.2.3 <i>Contaminação alcoólica por bactérias lácticas</i>	24
2.3 Lactato de Etila	25
2.3.1 <i>Produção de lactato de etila</i>	25
2.3.2 <i>Destilação reativa</i>	27
2.4 Ácido Acrílico e Acrilato de Etila	30
2.5 Modelagem Cinética de Processos Fermentativos.....	33
2.5.1 <i>Modelo cinético de crescimento celular</i>	38
2.5.2 <i>Modelo cinético de consumo de substrato</i>	40
2.5.3 <i>Modelo cinético de formação de produto</i>	41
2.6 Estimação de Parâmetros Cinéticos	43
2.6.1 <i>Algoritmo genético</i>	46
2.7 Controle de Processos Fermentativos	49
2.7.1 <i>Controle feedback</i>	50
2.7.2 <i>Controle por matriz dinâmica (DMC)</i>	53
<i>Referências Bibliográficas</i>	59

<i>CAPÍTULO III</i>	69
Seleção e Identificação do Microrganismo	69
3.1 Seleção da Cepa Bacteriana	69
3.2 Seleção da Melhor Cepa e Otimização do Meio de Cultivo	78
3.3 Identificação da Cepa	93
3.3.1 <i>Fermentação de xylose</i>	94
3.3.1.1 <i>Preparo do inóculo</i>	94
3.3.1.2 <i>Meio de fermentação</i>	95
3.3.1.3 <i>Fermentação</i>	95
3.3.1.4 <i>Metodologia analítica</i>	96
3.3.1.5 <i>Resultados do processo fermentativo</i>	98
<i>Referências Bibliográficas</i>	101
<i>CAPÍTULO IV</i>	103
Produção de Ácido Lático	103
4.1 Fermentação de Sacarose para Produção de Ácido Lático	103
4.1.1 <i>Microrganismo</i>	103
4.1.2 <i>Preparo do inóculo</i>	103
4.1.3 <i>Meio de fermentação</i>	104
4.1.4 <i>Fermentação</i>	104
4.1.5 <i>Metodologia analítica</i>	105
4.1.6 <i>Resultados do processo fermentativo</i>	106
4.1.7 <i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i>	110
4.1.8 <i>Processo batelada alimentada</i>	121
4.1.9 <i>Processo contínuo</i>	127
4.1.10 <i>Controle do processo fermentativo contínuo</i>	133
4.2 Fermentação de melaço de cana para produção de ácido lático	139
Production of Lactic Acid from Sucrose: Strain Selection, Fermentation and Kinetic Modeling	144
<i>Referências Bibliográficas</i>	164
<i>CAPÍTULO V</i>	167

Produção de Lactato de Etila, Avaliação de Rotas para Desidratação de Lactato de Etila e Simulação de um Processo Integrado.....	167
5.1 Montagem do Sistema de Destilação Reativa.....	167
5.1.1 Desenvolvimento Experimental.....	169
5.1.2 Metodologia analítica	172
5.1.4 Resultados do processo de esterificação de ácido láctico para produção de lactato de etila	173
5.2 Avaliação de rotas alternativas para desidratação do lactato de etila para síntese de acrilato de etila.....	177
5.2.1 Resultados do processo	179
5.3 Simulação de um processo integrado de produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila.....	181
5.3.1 Caracterização termodinâmica do processo.....	181
5.3.2 Simulação do processo	189
Referências Bibliográficas	197
CAPÍTULO VI	199
Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros	199
APÊNDICES	201
APÊNDICE A	203
APÊNDICE B.....	211

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1	Produtos derivados do ácido láctico.....	3
Figura 1.2.1	Diagrama de blocos da estratégia de trabalho.....	6
Figura 2.2.1	Isômeros do ácido láctico.....	14
Figura 2.2.2	Uso e aplicações comerciais do ácido láctico e seus sais.....	16
Figura 2.2.3	Principais caminhos da fermentação de glicose.....	18
Figura 2.2.4	Produção de ácido láctico por síntese química e via processo fermentativo.....	19
Figura 2.2.5	Bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.....	25
Figure 2.3.1	Destilação reativa ideal.....	29
Figura 2.4.1	Caminhos metabólicos para biossíntese de ácido acrílico a partir de fontes renováveis.....	31
Figura 2.5.1	Classificação dos modelos matemáticos para representação da população celular.....	37
Figura 2.5.2	Perfis das velocidades específicas num processo fermentativo.....	42
Figura 2.7.1	Elementos de um sistema de controle.....	50
Figura 2.7.2	Representação de um controle <i>feedback</i>	51
Figura 3.1.1	Semeadura por estria de esgotamento: identificação das amostras.....	70
Figura 3.1.2	Semeadura por estria de esgotamento: caracterização das colônias.....	70
Figura 3.1.3	Tubo de Durahm para determinação de produção de CO ₂	72
Figura 3.1.4	Meios de cultivo.....	73
Figura 3.1.5	Coloração de Gram.....	76
Figura 3.1.6	Técnica de contagem de células por diluição.....	77
Figura 3.1.7	Contagem de células por diluição.....	77
Figura 3.2.1a	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	83
Figura 3.2.1b	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	83
Figura 3.2.1c	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	84
Figura 3.2.2a	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	89
Figura 3.2.2b	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	90

Figura 3.2.2c	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	90
Figura 3.2.2d	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	91
Figura 3.2.2e	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	91
Figura 3.2.2f	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico.....	92
Figura 3.3.1	Sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra analisada...	94
Figura 3.3.2	Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra 25 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e <i>Genbank</i>	94
Figura 3.3.3	Curvas de calibração para determinação das concentrações.....	97
Figura 3.3.4	Perfis de concentração obtidos no processo fermentativo.....	99
Figura 4.1.1	Processo fermentativo para produção de ácido láctico.....	105
Figura 4.1.2a	Perfis de concentração de sacarose e ácido láctico e solução de NaOH consumida durante o processo fermentativo.....	109
Figura 4.1.2b	Perfis de concentração de sacarose, ácido láctico e biomassa.....	109
Figura 4.1.3	Perfis de concentração de sacarose, ácido láctico e biomassa obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais da 1ª batelada.....	111
Figura 4.1.4	Perfis de concentração de sacarose, ácido láctico e biomassa obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais.....	112
Figura 4.1.5a	Concentração celular.....	112
Figura 4.1.5b	Gráfico semilog da concentração celular.....	113
Figura 4.1.6	Perfis das velocidades de reação de consumo de sacarose (r_s), produção de ácido láctico ($r_{LA} = r_P$) e crescimento celular (r_X).....	115
Figura 4.1.7a	Velocidade específica de produção de ácido láctico como função da velocidade específica de crescimento.....	115
Figura 4.1.7b	Gráfico da equação de Monod linearizada para determinação de μ_{max} e K_s	116
Figura 4.1.7c	Regressão linear ($\Delta X \times \Delta S$) para determinação de $Y_{X/S}$	116
Figura 4.1.8	Representação da inibição celular pelo produto através do modelo linear de inibição.....	117
Figura 4.1.9a	Perfil de concentração de ácido láctico.....	120

Figura 4.1.9b	Perfil de concentração de biomassa.....	120
Figura 4.1.9c	Perfil de concentração de sacarose.....	121
Figura 4.1.10	Perfil de concentração de ácido láctico, biomassa e sacarose no processo batelada alimentada.....	123
Figura 4.1.11	Perfil de concentração de ácido láctico, biomassa e sacarose no processo batelada alimentada.....	124
Figura 4.1.12	Perfil de concentração de ácido láctico, biomassa e sacarose no processo batelada alimentada.....	125
Figura 4.1.13	Perfil de concentração de ácido láctico, biomassa e sacarose no processo batelada alimentada.....	126
Figura 4.1.14	Perfis de concentrações obtidos no processo contínuo.....	128
Figura 4.1.15	Perfis de concentrações obtidos no processo contínuo.....	129
Figura 4.1.16	Perfis de concentrações obtidos no processo contínuo.....	129
Figura 4.1.17	Perfis de concentração no estado estacionário em função da taxa de diluição (D).....	130
Figura 4.1.18	Produtividade em função da taxa de diluição (D).....	131
Figura 4.1.19	Perfis de concentração obtidos no processo contínuo usando D ótimo...	132
Figura 4.1.20	Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC.....	134
Figura 4.1.21	Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC.....	135
Figura 4.1.22	Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC.....	136
Figura 4.1.23	Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC.....	137
Figura 4.1.24	Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC.....	138
Figura 4.2.1	Rendimentos de ácido láctico e ácido acético usando melão de cana como fonte de carboidrato.....	141
Figura 5.1.1	Sistema de destilação reativa.....	168
Figura 5.1.2	Configuração da coluna de destilação reativa.....	168

Figura 5.1.3	Sistema de destilação reativa.....	171
Figura 5.1.4	Curva de calibração para determinação das concentrações de lactato de etila.....	173
Figura 5.1.5	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de lactato de etila.....	176
Figura 5.1.6	Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de lactato de etila.....	177
Figura 5.2.1	Curva de calibração para determinação das concentrações de acrilato de etila.....	178
Figura 5.2.2	Reações de ácido láctico a elevadas temperaturas.....	179
Figura 5.3.1	Curva de equilíbrio liquido vapor (xy e T-xy) para a mistura etanol/ácido láctico.....	183
Figura 5.3.2	Curva de equilíbrio liquido vapor (xy e T-xy) para a mistura etanol/lactato de etila.....	184
Figura 5.3.3	Curva de equilíbrio liquido vapor (xy e T-xy) para a mistura etanol/água.....	185
Figura 5.3.4	Curva de equilíbrio liquido vapor (xy e T-xy) para a mistura água/ácido láctico.....	186
Figura 5.3.5	Curva de equilíbrio liquido vapor (xy e T-xy) para a mistura água/lactato de etila.....	187
Figura 5.3.6	Curva de equilíbrio liquido vapor (xy e T-xy) para a mistura lactato de etila/ácido láctico.....	188
Figura 5.3.7	Fluxograma da etapa do processo fermentativo.....	189
Figura 5.3.8	Fluxograma da etapa do processo de esterificação.....	190
Figura 5.3.9	Recuperação de etanol e água.....	190
Figura 5.3.10	Etapa de separação do lactato de etila.....	191
Figura 5.3.11	Etapa de desidratação do lactato de etila.....	191
Figura 5.3.12	Fluxograma do processo proposto para a produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila.....	192
Figura 5.3.13	Perfis das composições mássicas na coluna de destilação reativa.....	194
Figura 5.3.14	Perfis das composições mássicas na coluna de destilação reativa.....	194

	..	
Figura 5.3.15	Perfis das composições mássicas na coluna de separação.....	195
Figura 5.3.16	Perfis das composições mássicas na coluna de separação	196
Figura 5.3.17	Perfis das composições mássicas na coluna de separação	196
Figura B.1	Curva de calibração para determinação da concentração de sacarose.....	201
Figura B.2	Curva de calibração para determinação da concentração de ácido lático.....	211
Figura B.3	Curva de calibração para determinação da concentração de ácido acético.....	211
Figura B.4	Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa.....	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.2.1	Características do ácido láctico.....	13
Tabela 2.2.2	Propriedades físicas e termodinâmicas do ácido láctico.....	13
Tabela 2.2.3	Densidade de soluções aquosas de ácido láctico.....	14
Tabela 2.5.1	Modelos cinéticos não estruturados.....	36
Tabela 3.1.1	Composição do meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe).....	71
Tabela 3.1.2	Composição do meio sintético.....	72
Tabela 3.1.3	Rendimento de ácido láctico.....	75
Tabela 3.1.4	Unidades formadoras de colônia.....	78
Tabela 3.2.1	Fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	79
Tabela 3.2.2	Matriz codificada dos fatores.....	80
Tabela 3.2.3a	Rendimentos de ácido láctico.....	81
Tabela 3.2.3b	Rendimentos de ácido láctico.....	81
Tabela 3.2.3c	Rendimentos de ácido láctico.....	82
Tabela 3.2.4	Fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	85
Tabela 3.2.4a	Rendimentos de ácido láctico.....	86
Tabela 3.2.4b	Rendimentos de ácido láctico.....	86
Tabela 3.2.4c	Rendimentos de ácido láctico.....	87
Tabela 3.2.4d	Rendimentos de ácido láctico.....	87
Tabela 3.2.4e	Rendimentos de ácido láctico.....	88
Tabela 3.2.4f	Rendimentos de ácido láctico.....	88
Tabela 3.3.1	Composição do meio fermentativo.....	95
Tabela 4.1.1	Composição do meio fermentativo.....	104
Tabela 4.1.2	Resultados obtidos na fermentação láctica.....	108
Tabela 4.1.3	Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos dados experimentais da 1ª batelada para produção de ácido láctico.....	117
Tabela 4.1.4	Constantes da função sigmoidal.....	119
Tabela 4.1.5	Valores dos parâmetros cinéticos do modelo estimados por algoritmo genético.....	121

Tabela 4.1.6	Valores dos parâmetros cinéticos do modelo estimados por algoritmo genético.....	125
Tabela 4.2.1	Concentrações de açúcares no melaço de cana analisado.....	140
Tabela 4.4.2	Composição dos meios.....	140
Tabela 5.1.1	Propriedades físicas da resina de troca catiônica Amberlyst 15.....	169
Tabela 5.1.2	Parâmetros avaliados no planejamento fatorial completo 2 ³	170
Tabela 5.1.3	Parâmetros avaliados no planejamento fatorial completo 2 ³	171
Tabela 5.1.4	Matriz codificada dos parâmetros.....	172
Tabela 5.1.5	Número de moles e rendimento de lactato de etila.....	175
Tabela 5.1.6	Número de moles e rendimento de lactato de etila.....	176
Tabela 5.3.1	Temperatura de ebulição e composição dos azeótropos.....	182
Tabela 5.3.2	Especificações das colunas usadas no processo de produção de lactato de etila.....	193
Tabela A.1	pH final após 48h de incubação.....	205
Tabela A.2	Concentração de L(+)-ácido láctico.....	207
Tabela A.3	Concentração de ácido láctico.....	209
Tabela A.4	Concentração de ácido láctico.....	209
Tabela A.5	Concentração de ácido láctico.....	209
Tabela A.6	Concentração de ácido láctico.....	209
Tabela A.7	Concentração de ácido láctico.....	209
Tabela A.8	Concentração de ácido láctico.....	210

NOMENCLATURA

D	taxa de diluição (h^{-1})
F	vazão de alimentação (L/h)
K_i	constante de inibição pelo substrato (L/g)
K_S	constante de saturação (constante de Monod) (g/L)
LA	concentração de ácido láctico (g/L)
m_s	coeficiente de manutenção
P	concentração de produto (g/L)
P_0	concentração inicial de produto (ácido láctico ou ácido acético) (g/L)
P_{max}	concentração máxima de produto (g/L)
r_i	velocidade de reação (g/L.h)
S	concentração de sacarose (g/L)
S_0	concentração de sacarose na alimentação (g/L)
t	tempo (h)
V	volume (L)
X	concentração celular (g/L)
X_0	concentração inicial de células (g/L)
$Y_{LA/S}$	rendimento de produto em relação ao substrato consumido (g/g)
$Y_{X/S}$	rendimento de biomassa em relação ao substrato consumido (g/g)

Letras Gregas

α	constante de produção associada ao crescimento (g ácido láctico/g biomassa)
α_R	constante de trajetória de referência
β	constante de produção não associada ao crescimento (g/h)
μ_i	velocidade específica (h^{-1})
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
λ	fator de supressão do movimento

Abreviaturas

ELV	Equilíbrio líquido-vapor
NP_{\min}	Horizonte de predição mínimo
NP_{\max}	Horizonte de predição máximo
NC	Horizonte de controle
NM	Horizonte de modelo

Siglas

CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DMC	Dynamic Matrix Control
EMP	Emden Meyerhof Parnas
GA	Genetic Algorithm
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAE	Integral of the Absolute Value of Error
ISE	Integral of the Square Error
ITAE	Integral of the Time-Weighted Absolute Error
LAB	Lactic Acid Bacteria
MRS	Man Rogosa Sharpe
NRTL	Non-Randow-Two-Liquid
UNIFAC	Universal Functional Activity Coefficients

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A tendência para a sustentabilidade ambiental, econômica e o desenvolvimento de recursos renováveis tem aumentado significativamente o interesse na valorização dos produtos químicos industriais derivados da fermentação, como ácidos orgânicos, biocombustíveis, polímeros e solventes.

Os combustíveis fósseis são atualmente, a principal fonte de energia, de químicos e de materiais para a sociedade. Estima-se que cerca de 90% da energia consumida mundialmente, é derivada de combustíveis fósseis, como petróleo, carvão e gás natural, e essa percentagem é ainda maior (96%) para o setor de transporte (Simonetti e Dumesic, 2008). No entanto, já é possível perceber uma mudança no cenário industrial, onde a cada dia as indústrias estão despertando um maior interesse na produção de produtos a partir de fontes renováveis, direcionando seu processo para a “química verde”, biorrefinarias e uso de biomassa vegetal. Um processo de mudança no qual a exploração dos recursos, a direção dos investimentos, a orientação do desenvolvimento tecnológico e a mudança institucional estão todos em harmonia para valorizar as potencialidades atuais e futuras a fim de satisfazer as necessidades e aspirações humanas (Brundtland, 1987 citado por Gavrilescu e Chisti, 2005).

A síntese de produtos através de fontes renováveis expõe duas vantagens importantes. A primeira tem seu argumento fundamentado na realidade de que os processos biotecnológicos possibilitam a descoberta e a exploração de inúmeras rotas de obtenção de produtos de alto valor agregado, formando caminhos paralelos e alternativos para a produção dos mesmos produtos de interesse, fato este que denota a possibilidade de enfrentar o problema de esgotamento das matérias-primas. A segunda é fundamentada no argumento ecológico, onde a diminuição acentuada da exploração dos recursos naturais, viabilizada pelos processos de síntese biotecnológica, teria uma consequência diretamente proporcional à qualidade de vida e do meio ambiente, e inversamente proporcional à degradação ambiental (Lunelli *et al.*, 2007).

Países produtores de cana-de-açúcar têm uma significativa vantagem em possuir uma matéria-prima renovável, que pode ser utilizada na alimentação humana e animal e na produção de produtos químicos, com um rendimento não igualado por qualquer outra planta. Além disso, a cana-de-açúcar tem capacidade de fornecimento de energia equivalente a cinco vezes a utilizada pela cultura. Todos esses fatores em conjunto e as possibilidades oferecidas pelo melhoramento genético, tornam a cana-de-açúcar a cultura ideal para o próximo século. A cana tem um dos mecanismos mais eficientes de fotossíntese entre as culturas comerciais. Isso possibilita fixar cerca de 2 a 3% da energia solar e transformá-la em biomassa verde. Esta alta capacidade fotossintética também permite mostrar um alto coeficiente de fixação de CO₂, contribuindo para a diminuição do efeito estufa (Almazan *et al.*, 1998).

O contínuo desenvolvimento de processos fermentativos de baixo custo e altamente eficientes para produção de ácidos orgânicos cria novas oportunidades para produção de produtos químicos a partir de matéria-prima renovável. Entre os ácidos orgânicos que são produzidos atualmente via fermentação, o ácido láctico é um dos mais importantes.

O ácido láctico é o ácido com maior ocorrência na natureza. Tradicionalmente, ele tem sido usado na indústria de alimentos, farmacêutica e química, mas desde o início dos anos noventa o mercado do ácido láctico vem expandindo continuamente a uma taxa de produção de 4X10⁴ toneladas por ano, como resultado do desenvolvimento e comercialização de novas aplicações (Datta, 2004), como por exemplo, na síntese de polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis (poli-ácido láctico) e solventes verdes (lactato de etila).

A presença de dois grupos funcionais adjacentes (-OH e -COOH) em uma pequena molécula com apenas três átomos de carbono, mostra claramente a alta reatividade do ácido láctico, bem como, sua tendência a se decompor em temperaturas elevadas. Devido a bifuncionalidade o ácido láctico pode ser convertido, através de uma variedade de reações, em acetaldeído, ácido acrílico, ácido propiônico, 2,3 pentanodiona, poli-ácido láctico, conforme mostra a Figura 1.1.1.

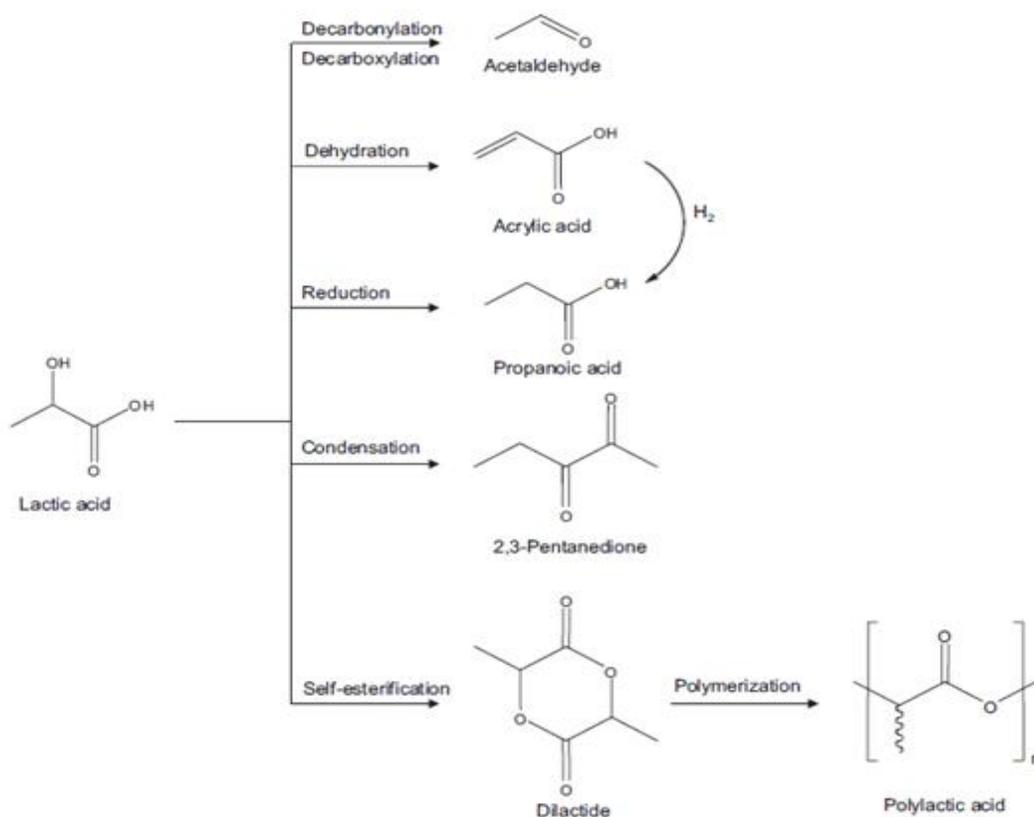


Figura 1.1.1 - Produtos derivados do ácido láctico (Wadley *et al.*, 1997)

O ácido láctico pode ser produzido por síntese química ou por processo fermentativo. A produção de ácido láctico via processo fermentativo apresenta diversas vantagens, como baixo custo de matéria-prima, baixo consumo de energia, condições operacionais brandas (temperatura e pressão), uso de matéria-prima renovável, além da especificidade do produto, pois o processo fermentativo produz um estereoisômero, opticamente puro (L(+) ou D(-) ácido láctico) (Pondevy *et al.*, 2001), enquanto pela síntese química é produzida apenas uma mistura racêmica (DL).

Neste trabalho, é proposto um processo fermentativo para produção de ácido láctico a partir da fermentação da sacarose, derivada da cana, e também do melaço de cana, usando uma bactéria láctica contaminante isolada da fermentação alcoólica. O ácido láctico produzido via processo fermentativo será esterificado para produção de lactato de etila em um sistema de destilação reativa. Para finalizar o trabalho, o lactato de etila será usado para avaliar caminhos alternativos de desidratação para produção de acrilato de etila.

Para contemplar as exigências de mercado de produção de açúcar e etanol e ainda ter-se a possibilidade de aproveitar a matéria-prima, no caso a cana-de-açúcar, de uma forma mais abrangente, a utilização do melaço passa a ser uma estratégia interessante. O melaço é obtido na etapa de centrifugação ou no processo de fabricação de açúcar e contém açúcares redutores e parte de sacarose não cristalizada. Desta forma, pode ser usado como matéria-prima para a fermentação seja do etanol ou de outros produtos. Nas unidades integradas (produção de açúcar e etanol) esta corrente pode ser adicionada ao caldo para aumentar a produção de etanol. Alternativamente pode ser usada para a produção de produtos de maior valor agregado como o ácido láctico.

A escolha pelo uso de uma bactéria contaminante se deve ao interesse de identificar bactérias com alta capacidade de resistência às variações operacionais nas unidades produtivas de etanol, além de verificar a possibilidade de diferentes bactérias produzirem tipos específicos de ácido láctico (D e/ou L), bem como, o uso de bactérias adaptadas às condições do meio produtivo atuais existentes no Brasil. Outro fator é a independência tecnológica e a redução de custos na sua obtenção.

Interesse em ésteres de lactato vem aumentando devido à ênfase em solventes ecológicos derivados de fontes renováveis. O lactato de etila é um importante éster orgânico, biodegradável com excelentes propriedades de solvente e baixa toxicidade e é candidato a substituir muitos solventes halogenados. Além do uso como solvente, o lactato de etila também é usado em alimentos, perfumaria e produtos químicos (Tanaka *et al.*, 2002), como também para remoção de gases, óleos de silicone, adesivos e na limpeza de uma variedade de superfícies metálicas para a fabricação e aplicações de revestimento (Vu *et al.*, 2006). O lactato de etila é produzido a partir de uma solução aquosa de ácido láctico e etanol, através de um processo de esterificação, conforme equação abaixo.



De acordo com Asthana *et al.* (2005) lactato de etila pode ser produzido e separado de forma eficiente e com altos rendimentos a partir da esterificação do ácido láctico com excesso de etanol, usando uma única etapa operacional, através do processo de destilação reativa.

O conceito de destilação reativa é baseado na combinação dos processos de reação e destilação com o objetivo de melhorar o desempenho de ambos os processos. Embora seja um conceito antigo e tem sido usada com êxito em alguns processos tradicionais, sua aplicação tem aumentado significativamente nos últimos anos, sendo usada também na área de modelagem, simulação e em estratégias de controle, podendo desta forma, tornar-se uma importante ferramenta para intensificação e integração de processos (Sharma e Mahajani, 2003; Custódio, 2007).

A desidratação de lactato de etila para síntese de acrilato de etila é um processo competitivo e tem atraído atenção para estudar o desenvolvimento de novos processos. A desidratação do éster de ácido láctico para o éster de ácido acrílico é representada pela equação (1.1.2):



Acrilato de etila é amplamente utilizado na indústria como precursor para vernizes, adesivos e revestimentos de papéis e tecidos. Atualmente 100% do ácido acrílico e seus ésteres são produzidos a partir de combustíveis fósseis. O conhecimento dos caminhos metabólicos e a identificação de enzimas, como também seus correspondentes genes, podem facilitar a construção de células geneticamente modificadas para fazer a desidratação biológica do ácido láctico (Xu *et al.*, 2006).

1.2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho de tese consistem em:

- Selecionar um microrganismo adaptado ao ambiente industrial e hábil para fermentar sacarose a partir da cana-de-açúcar.
- Produzir ácido láctico a partir de um processo fermentativo descontínuo.
- Determinar os parâmetros cinéticos do processo.
- Modelar e simular o processo fermentativo de produção de ácido láctico usando linguagem Fortran.

- Estimar os parâmetros cinéticos do processo através da aplicação de algoritmo genético.
- Aplicar estratégias de controle no processo fermentativo de produção de ácido láctico.
- Produzir lactato de etila a partir da esterificação do ácido láctico com etanol usando um sistema de destilação reativa.
- Avaliar caminhos alternativos para obtenção de acrilato de etila a partir da desidratação do lactato de etila.
- Simular um processo integrado incluindo a produção de ácido láctico, produção de lactato de etila a partir da esterificação do ácido láctico com etanol usando um sistema de destilação reativa e o processo de síntese de acrilato de etila a partir da desidratação do lactato de etila, com auxílio do simulador Aspen Plus®.

A Figura abaixo apresenta um diagrama de blocos da estratégia de trabalho e objetivos propostos nesta tese de doutoramento.

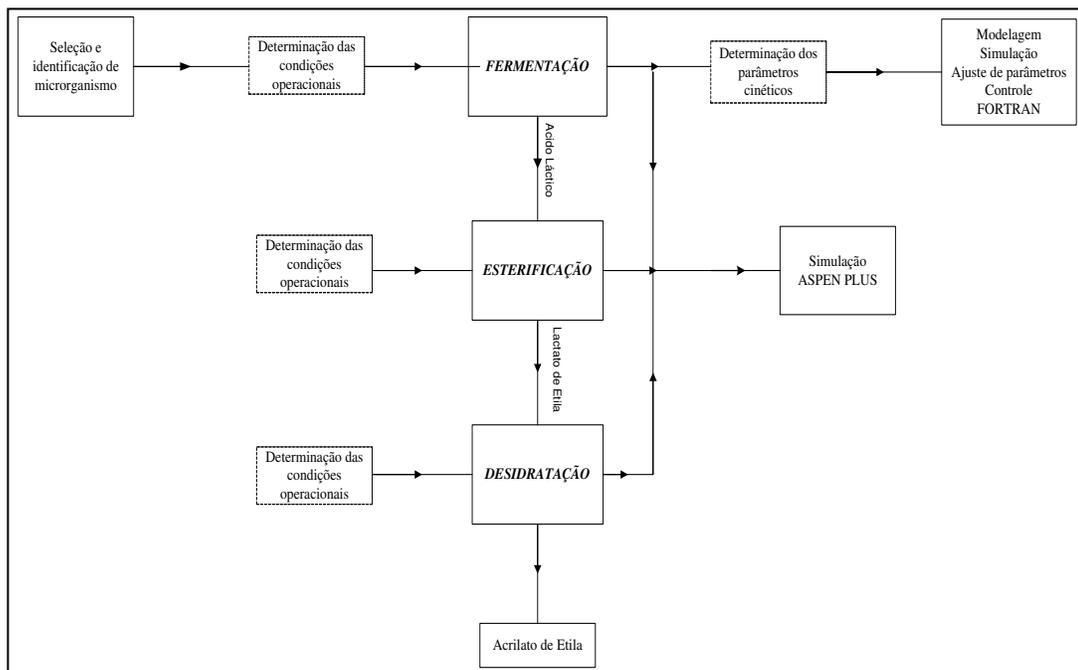


Figura 1.2.1 - Diagrama de blocos da estratégia de trabalho

1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese de doutorado está dividida em seis capítulos. No Capítulo I foi apresentada uma introdução, onde foram descritos sucintamente tópicos diretamente relacionados a este trabalho, buscando justificar a importância do desenvolvimento do mesmo. Os objetivos do trabalho, também são apresentados neste capítulo.

No Capítulo II é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os assuntos de maior importância para o desenvolvimento deste trabalho, tais como, produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila, destilação reativa, modelagem matemática de processos fermentativos, estimação de parâmetros cinéticos.

O Capítulo III apresenta a etapa de seleção da bactéria láctica. Neste capítulo são apresentados os testes realizados para selecionar e identificar a bactéria láctica, envolvendo testes de análise morfológica, bioquímica e molecular. São apresentados também, os estudos realizados para seleção do melhor meio de cultivo.

No Capítulo IV são apresentados os resultados obtidos no processo fermentativo de produção de ácido láctico a partir da fermentação da sacarose usando uma bactéria láctica contaminante da fermentação alcoólica. Os resultados da modelagem, simulação e controle do processo fermentativo também são apresentados neste capítulo.

O Capítulo V apresenta os resultados do processo de produção de lactato de etila a partir da esterificação do ácido láctico com etanol usando um sistema de destilação reativa. Estudos realizados para avaliar caminhos alternativos para produção de acrilato de etila a partir da desidratação do lactato de etila, também são apresentados neste capítulo. No final deste capítulo é apresentada a simulação do processo integrado envolvendo o processo de produção de ácido láctico a partir da fermentação da sacarose, esterificação do ácido láctico com etanol para produção de lactato de etila usando um sistema de destilação reativa e a desidratação do lactato de etila para síntese do acrilato de etila.

As conclusões e contribuições desta tese, bem como, algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo VI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAZAN, O., GONZALEZ, L., GALVEZ, L. The sugar cane, its by-products and co-products. *Food and Agricultural Research Council*, AMAS 1998.
- ASTHANA, N.; KOLAH, A.; VU, D. T.; LIRA, C. T.; MILLER, D. J. A continuous reactive separation process for ethyl lactate formation. *Organic Process Research & Development*, v. 9, p. 599-607, 2005.
- BRUNDTLAND, G. (1987) citado por GAVRILESCU, M., CHISTI, Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 471-499, 2005.
- CUSTÓDIO, A. F. Proposição de um processo intensificado e via tecnologia verde para obtenção de acetato de etila. Tese (Doutorado). FEQ/ UNICAMP, Campinas, SP, 2007.
- DATTA, R. Hydroxy carboxylic acids. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Ed. JI Kroschwitz, v. 14, p. 114-134, Hoboken, NJ:Wiley, 5th ed., 2004.
- LUNELLI, B. H.; DUARTE, E. R.; VASCO DE TOLEDO, E. C.; WOLF MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R. A new process for acrylic acid synthesis by fermentative process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, p.487-499, 2007.
- PONDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAN, P. Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. *Asiatech Publishers*, New Delhi, 2001.
- SHARMA, M. M.; MAHAJANI, S. M. In: K. Sundmacher, A. Kienle. Reactive distillation: Status and future directions. WILEY-VCH, Germany, 2003. p. 26-27
- SIMONETTI, D. A.; DUMESIC, J. A. Catalytic strategies for changing the energy content and achieving C-C coupling in biomass-derived oxygenated hydrocarbons. *ChemSusChem*, v.1 (8-9), p. 725-733, 2008.

- TANAKA, K.; YOSHIKAWA, R.; YING, C.; KITA, H.; OKAMOTO, K. Application of zeolite T membrane to vapor-permeation-aided esterification of lactic acid with ethanol. *Chemical Engineering Science*, v. 57(9), p. 1577-1584, 2002.
- VU, D. T.; LIRA, C. T.; ASTHANA, N. S.; KOLAH, A. K.; MILLER, D. J. Vapor-liquid equilibria in the systems ethyl lactate + ethanol and ethyl lactate + water. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 51(4), p. 1220-1225, 2006.
- WADLEY, D. C.; TAM, M. S.; KOKITKAR, P. B.; JACKSON, J. E.; MILLER, D. J. Lactic acid conversion to 2,3-pentanedione and acrylic acid over silica-supported sodium nitrate: reaction optimization and identification of sodium lactate as the active catalyst. *Journal of Catalysis*, v. 165(2), p. 162-171, 1997.
- XU, X.; LIN, J.; CEN, P. Advances in the research and development of acrylic acid production from biomass. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 14(4), p. 419-427, 2006.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma breve revisão sobre os principais assuntos relacionados com o trabalho, tais como, cana-de-açúcar, ácido láctico, bactérias do ácido láctico, lactato de etila, acrilato de etila, modelagem, simulação, otimização e controle de processos biotecnológicos. A maior parte do ácido láctico consumido atualmente é produzida por processo fermentativo em batelada com baixa produtividade. A modelagem e a simulação de processo são usadas para avaliar o comportamento do processo e otimizar as condições operacionais a fim de aumentar a produtividade e a concentração do produto final.

2.1 Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi introduzida no Brasil pelos portugueses no início do século XV. Representou o segundo ciclo econômico durante a colonização, após o declínio do ciclo do pau-brasil (Braunbeck e Cortez, 2005).

A cana-de-açúcar é uma gramínea de origem asiática. Segundo o consenso geral, embora existam opiniões divergentes, é uma aceitação sem contradições que é a Ásia a pátria dessa planta de onde são extraídos os mais variados produtos e subprodutos de consumo indispensável. No Brasil, os colonizadores portugueses encontraram terras fecundas de relevos planos, ondulados suaves e intermediários, propícios ao seu crescimento e produção. Tal era sua importância que assumiu a liderança da monocultura nacional por alguns séculos (Braunbeck e Cortez, 2005).

Os seus primeiros receptores foram a Capitania da Vila de São Vicente no estado de São Paulo e grandes plantios nas Capitanias de Pernambuco, Paraíba e Bahia, conforme os historiadores. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, ajudando com isso, o país a aumentar suas exportações e reduzir sua dependência da importação do petróleo (Carvalho, 2004). Os resíduos de cana-de-açúcar são uma das fontes de biomassa mais importantes e

promissoras do mundo e têm sido amplamente estudados no Brasil (Bajay e Ferreira, 2005). A produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2008/2009 foi de 569.062.629 toneladas (ÚNICA, 2010).

2.2 Ácido Láctico

O ácido láctico ou ácido 2-hidroxi-propionico, é o ácido com maior ocorrência na natureza. Foi descoberto pelo químico suéco Scheele em 1780, no leite azedo, considerado então, como um componente do leite. Em 1789, Lavoisier deu o nome para este componente de *acide lactique*. Em 1839, Fremy realizou a fermentação de ácido láctico a partir de vários carboidratos, como açúcar, leite, amido e dextrina (Holten, 1971). Em 1847, Bensch desenvolveu um método para produção de ácido láctico a partir da cana-de-açúcar. Como fermento ele usou queijo velho e leite azedo, e adicionou cal (Ca(OH)_2) para neutralizar a formação de ácido (Holten, 1971). Em 1857, Pasteur descobriu que o ácido láctico não era um componente do leite, mas sim um metabólito fermentativo produzido por certos microrganismos (Benninga, 1990). A primeira produção industrial de ácido láctico foi realizada por Charles E. Avery em Littleton, Massachusetts, USA em 1881 (Narayanan *et al.*, 2004; Holten, 1971).

O ácido láctico puro é um sólido branco cristalino com baixo ponto de fusão. Porém, é difícil obter o ácido láctico na forma anidra pura, geralmente ele está disponível como uma solução aquosa diluída ou concentrada. A tabela 2.2.1 apresenta as características do ácido láctico e a tabela 2.2.2 apresenta algumas propriedades físicas e termodinâmicas. A densidade do ácido láctico varia linearmente com a concentração de ácido láctico na solução e com a temperatura, conforme tabela 2.2.3.

Tabela 2.2.1 - Características do ácido láctico (Martin, 1996)

Propriedades	Características
Atividade óptica	Isômeros L(+), D(-) e mistura racêmica DL
Auto-esterificação	Em soluções com concentrações >20%
Cor	Transparente ou amarelada
Cristalização	Forma cristais a alta pureza
Miscibilidade	Miscível em água, álcool, glicerol e furfural
Solubilidade	Solúvel em água e insolúvel em clorofórmio
Volatilidade	Baixa

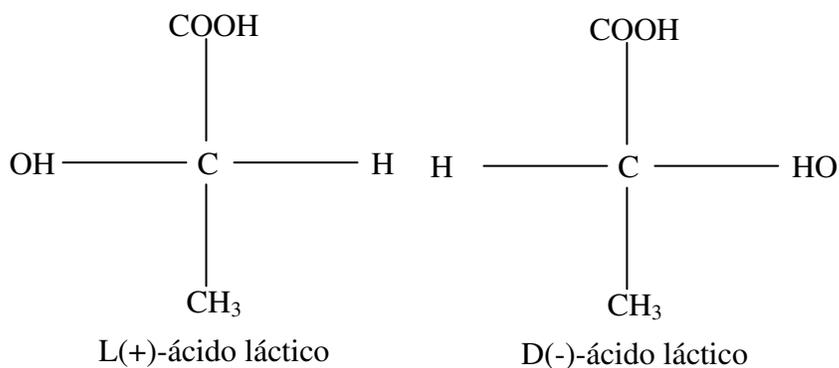
Tabela 2.2.2 - Propriedades físicas e termodinâmicas do ácido láctico (Perry e Chilton, 1973; Holten, 1971)

Propriedades	Valores	Isômeros
Peso molecular (g/mol)	90,08	D, L, DL
Ponto de fusão (°C)	52,8	D
	53,0	L
	16,8	DL
Ponto de ebulição (°C) a 0,5 mmHg a 14 mmHg	82,0	DL
	122,0	DL
Constante de dissociação (pK _a) a 25 °C	3,83	D
	3,79	L
Capacidade calorífica (J/mol·°C) a 20 °C	190	DL
Calor de solução (kJ/mol) a 25 °C	7,79	L
Calor de fusão (kJ/mol)	16,86	L
	11,33	DL

Tabela 2.2.3 - Densidade de soluções aquosas de ácido láctico (g/mL) (Holten, 1971)

Ácido Láctico (%)	Temperatura (°C)						
	20	25	30	35	40	60	80
0	0,998	0,997	0,996	0,994	0,992	0,983	0,972
6,29		1,012		1,008			
9,16	1,020	1,018	1,016		1,011	1,001	0,989
12,19		1,025		1,022			
24,35	1,057	1,054	1,052		1,047	1,035	1,023
25,02		1,057		1,053			
37,30		1,086		1,081			
45,48	1,110	1,105	1,102		1,094	1,079	1,064
54,94		1,130		1,124			
64,89	1,155	1,152	1,147		1,140	1,124	1,108
75,33	1,179	1,175	1,170		1,161	1,143	1,125
85,32	1,199	1,195	1,190		1,181	1,163	1,144
88,60		1,201		1,192			

O ácido láctico tem um átomo de carbono assimétrico com quatro grupos diferentes ligados a ele: -COOH, -H, -OH e CH₃, e, existe na forma racêmica e em duas formas opticamente ativas como mostra a Figura 2.2.1.

**Figura 2.2.1** - Isômeros do ácido láctico

Tradicionalmente, o ácido láctico é usado na indústria de alimentos, farmacêutica e química, mas a síntese do poli-ácido láctico para produção de polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis, em substituição aos polímeros petroquímicos convencionais, vem despertando grande interesse e abrindo novas oportunidades para a produção do ácido láctico. Ambas as formas isoméricas do ácido láctico podem ser polimerizadas e polímeros com diferentes propriedades podem ser produzidos, dependendo da composição (Hofvendahl e Hägerdal, 2000). A possibilidade da conversão direta de ácido láctico para ácido acrílico tem feito do ácido láctico uma importante matéria-prima para a indústria química (Martínez-González *et al.*, 1988). Em 2006, o ácido láctico teve uma demanda mundial estimada entre 130.000 – 150.000 toneladas métricas por ano e um preço comercial (ácido láctico para indústria de alimentos) entre 1,38 US\$/kg (50% de pureza) e 1,54 US\$/kg (88% de pureza). Com o uso de ácido láctico em aplicações químicas, como por exemplo, na produção de polímeros biodegradáveis (poli- ácido láctico) e lactato de etila (solvente ambientalmente favorável) (Singh *et al.*, 2006) é esperada uma expansão de 19% ao ano (Wee *et al.*, 2006). O potencial de aplicações do ácido láctico é mostrado na Figura 2.2.2 (Wee *et al.*, 2006).

O ácido láctico pode ser produzido por síntese química ou por processo fermentativo. A produção biotecnológica de ácido láctico apresenta diversas vantagens, como baixo custo da matéria-prima, condições operacionais brandas (temperatura e pressão), baixo consumo de energia, uso de matéria-prima renovável, baixa toxicidade dos catalisadores, além da especificidade do produto, pois o processo fermentativo produz estéreoisômeros opticamente puros (L(+) ou D(-) ácido láctico) (Pondevy *et al.*, 2001).

O ácido láctico pode ser biossintetizado por bactérias e por alguns fungos filamentosos. O uso de fungos filamentosos, como por exemplo, *Rhizopus* para a produção de ácido láctico ainda é baixo, pois o processo necessita de biorreatores com configurações específicas, alta taxa de aeração, pois são microrganismos obrigatoriamente aeróbios e a produtividade de ácido láctico é baixa, devido à baixa taxa de reação causada pela limitação à transferência de massa (Park *et al.*, 1998). Apresentam, também, formação de bioprodutos como ácido fumárico e etanol, reduzindo o rendimento de ácido láctico (Tay e Yang, 2002).



Figura 2.2.2 - Uso e aplicações comerciais do ácido láctico e seus sais (Wee *et al.*, 2006)

2.2.1 Bactérias do ácido láctico

O termo bactéria do ácido láctico (LAB) foi usado para designar “organismos do leite azedo”. A primeira cultura pura de uma bactéria foi de bactéria láctica, provavelmente *Lactococcus lactis*, obtida por Lister em 1873 (Axelsson, 2004). As bactérias lácticas são descritas como sendo bactérias gram-positivas, não esporogênicas, catalase negativa, citocromo ausente, não aeróbicas mas aerotolerantes, exigentes quanto aos fatores nutricionais, tolerantes a ácido e estritamente fermentativas com a formação de ácido láctico como principal produto da degradação de açúcar (Oliva Neto, 1995; Axelsson, 2004).

Segundo Orla-Jensen as bactérias lácticas foram classificadas de acordo com: morfologia (cocos ou bastonetes), modo de fermentação de glicose (homo ou heterofermentativa), crescimento em determinadas temperaturas (por exemplo, 10 °C e 45 °C) e faixa de consumo de açúcar (Axelsson, 2004).

Depois do trabalho de Orlan-Jensen, a bactéria láctica foi dividida em quatro gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, e *Streptococcus*. Desde 1985 novos gêneros foram descritos, mas compreendem linhagens previamente incluídas em um dos quatro gêneros citados anteriormente (Axelsson, 2004).

O gênero *Lactobacillus* é o maior dos gêneros da bactéria láctica. É também, muito heterogêneo, incluindo espécies com uma grande variedade propriedades fisiológicas, bioquímicas e fenotípicas. A heterogeneidade é refletida pelo % molar de G (guanina) + C (citosina) do DNA das espécies incluídas no gênero (Axelsson, 2004). O gênero é dividido em três grupos:

- *Thermobacterium* – compreende os microrganismos que crescem a temperaturas elevadas.
- *Streptobacterium* – são espécies homofermentativas, isto é, degradam substâncias glicídicas, formando quase que exclusivamente ácido láctico.
- *Betabacterium* – cujas espécies são heterofermentativas, ou seja, a mistura final da fermentação é formada por ácido láctico, etanol, gás carbônico, ácido acético e outras substâncias.

A essencial característica do metabolismo da LAB (do inglês – *Lactic Acid Bacteria*) é a eficiente fermentação de carboidratos acoplado a níveis de fosforilação do substrato. A bactéria láctica tem dois principais caminhos de fermentação, a fermentação homoláctica, (processo de glicólise – caminho Embden-Meyerhof-Parnas) e a fermentação heteroláctica (caminho 6-phosphogluconate/phosphoketolase) (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000; Axelsson, 2004). A Figura 2.2.3 mostra os dois caminhos de fermentação da bactéria láctica. Baseado nesses dois caminhos, a LAB tem sido dividida em três categorias metabólicas: homofermentativa obrigatória, heterofermentativa obrigatória e heterofermentativa facultativa.

LAB homofermentativa obrigatória fermenta carboidratos apenas pelo caminho de glicólise, enquanto a heterofermentativa obrigatória fermenta açúcar apenas pela caminho 6-phosphogluconate/phosphoketolase e a heterofermentativa facultativa tem a capacidade de utilizar ambos os caminhos de fermentação. Em muitos casos, a mudança do metabolismo da LAB pode ser atribuída a uma alteração no metabolismo do piruvato (Axelsson, 2004).

Muitas LAB produzem somente um isômero de ácido láctico, podendo algumas vezes, dependendo das condições operacionais, ocorrer a produção de pequenas quantidades do outro isômero. Organismos que produzem os isômeros D(-) ou L(+) do ácido láctico têm duas enzimas lactato desidrogenase (LDH) que diferem em sua estereo-especificidade. Algumas espécies de *Lactobacillus* produzem o isômero L(+), que sobre acúmulo leva a uma mistura racêmica, convertendo em ácido láctico D(-) até que o equilíbrio seja alcançado (Narayanan *et al.*, 2004). *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus plantarum* produzem uma mistura racêmica (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000).

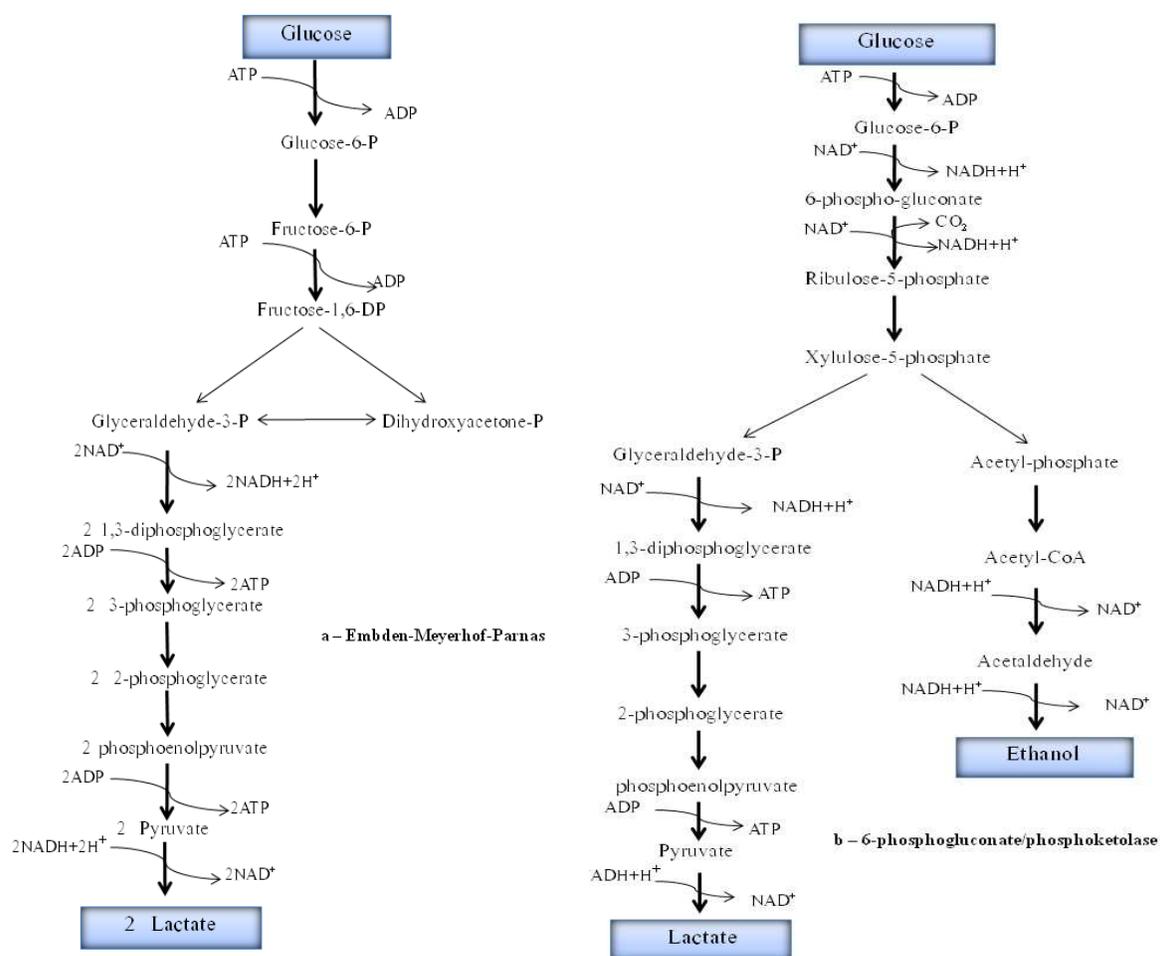


Figura 2.2.3 - Principais caminhos da fermentação de glicose (a) Embden-Meyerhof-Parnas; (b) 6-phosphogluconate/phosphoketolase (Axelsson, 2004).

As bactérias lácticas são encontradas em diversos nichos ecológicos, sendo bem resistentes a meios ácidos, especialmente os *Lactobacillus*. Entre os diversos habitats, naturais e

artificiais, se destacam aqueles em que as bactérias convivem com leveduras em condições de fermentação anaeróbica, como por exemplo, na fermentação alcoólica (Costa, 2006).

2.2.2 Produção do ácido láctico

Ácido láctico é um ácido orgânico que ocorre naturalmente e pode ser produzido por síntese química ou por fermentação. No entanto, a maior parte do ácido láctico é produzida a partir de fontes renováveis via processo fermentativo.

A síntese química de ácido láctico conduz sempre a uma mistura racêmica (DL). A produção fermentativa de ácido láctico oferece a grande vantagem em produzir isômeros opticamente ativos L(+) ou D(-) e também, mistura racêmica (DL), dependendo do microrganismo usado na fermentação. A pureza óptica é um fator importante nas propriedades físicas do poli-(ácido láctico) (Sodegard e Stolt, 2002).

A Figura 2.2.4 apresenta um esquema resumido do processo de produção de ácido láctico por síntese química e via processo fermentativo.

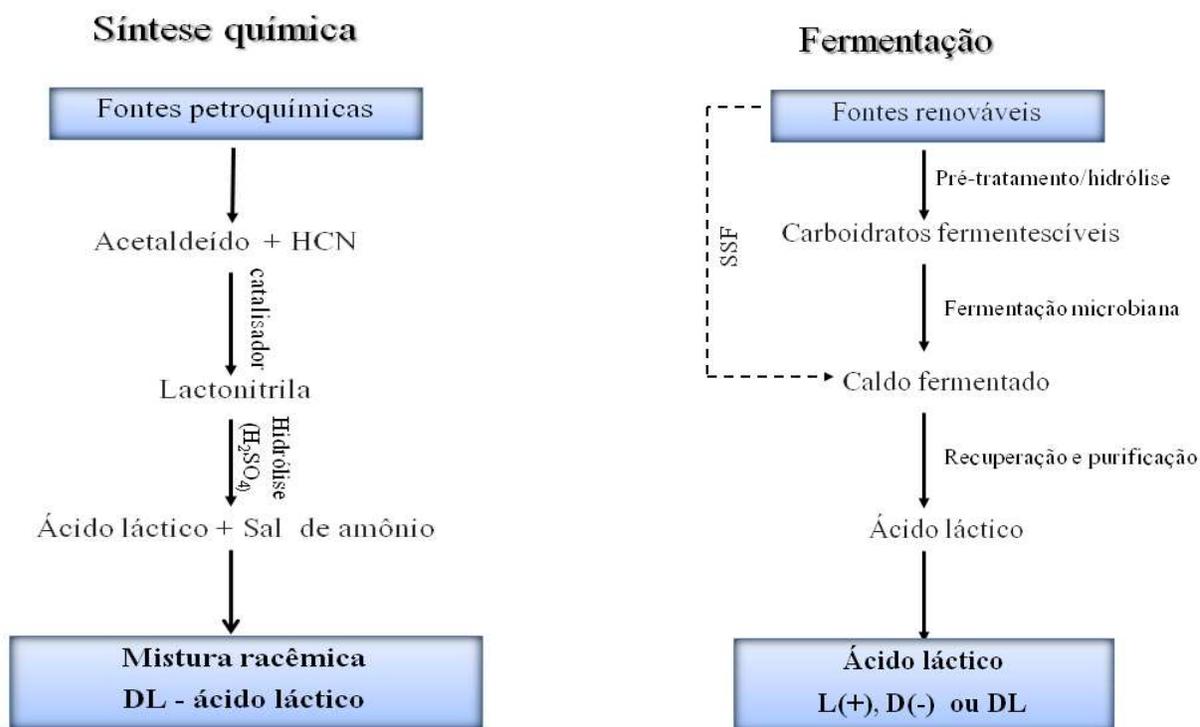
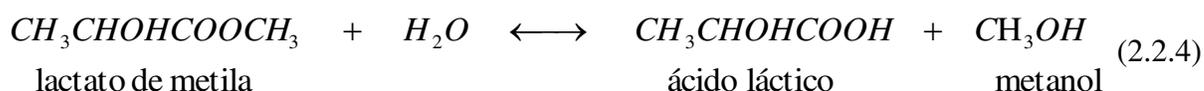
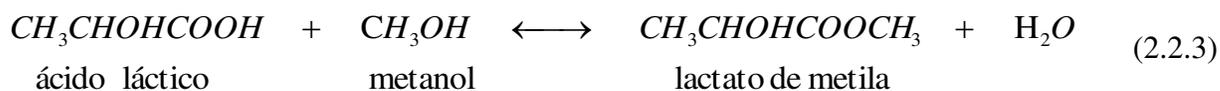
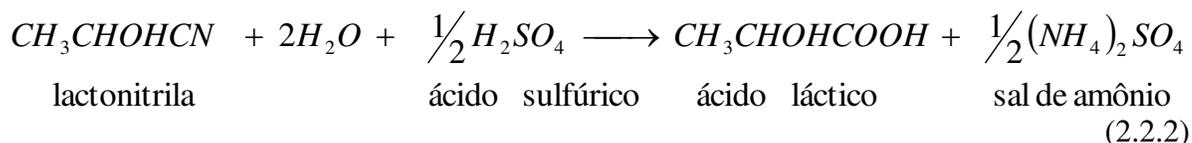
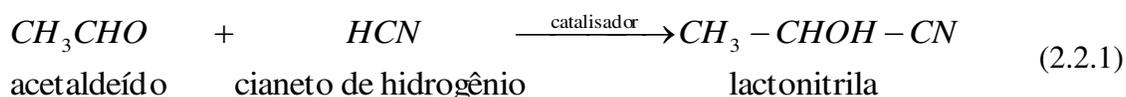


Figura 2.2.4 - Produção de ácido láctico por síntese química e via processo fermentativo (Wee *et al.*, 2006)

a) Síntese Química

O processo comercial a partir da síntese química é baseado na lactonitrila. Cianeto de hidrogênio é adicionado com acetaldeído, na presença de uma base, para produção de lactonitrila. É uma reação em fase líquida e ocorre à pressão atmosférica. A lactonitrila é recuperada e purificada por destilação e, então, hidrolisada para produção de ácido láctico, através da adição de ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H₂SO₄), produzindo ácido láctico e sal de amônio. O ácido láctico é esterificado com metanol produzindo lactato de metila. O lactato é recuperado e purificado por destilação e hidrolisado com água na presença de catalisador ácido para produzir ácido láctico, que será concentrado e purificado conforme necessidades do produto e, o metanol reciclado ao processo. O processo de produção de ácido láctico por síntese química pode ser representado conforme reações (2.2.1-2.2.4) abaixo (Narayanan *et al.*, 2004).



Existem outras rotas para síntese química do ácido láctico, por exemplo, oxidação do propileno glicol, reação de acetaldeído com monóxido de carbono e água a elevada temperatura e pressão, hidrólise do ácido cloropropiônico, mas nenhum destes processos é comercializado (Datta e Tsai, 1995).

b) Processo Fermentativo

A fermentação láctica é estudada desde 1935 usando diferentes tipos de microrganismos e condições operacionais de fermentação, como fonte de carbono, pH, temperatura, fontes de

nitrogênio (Hofvendal and Hagerdal, 1997) e continua despertando interesse, considerando que oferece uma alternativa para a poluição ambiental provocada pela indústria petroquímica e também, à limitação de recursos petroquímicos (Wee *et al.*, 2006). A fermentação láctica é considerada um dos primeiros processos biotecnológicos operado sobre condições controladas, e representa aproximadamente 90% da produção do ácido.

Os primeiros estágios da fermentação láctica são os mesmos da fermentação alcoólica. O intermediário para a formação do ácido láctico, é o ácido pirúvico. No final da glicólise, o ácido pirúvico sob a ação de uma enzima lactato desidrogenase, dá origem ao ácido láctico. A reação pode ser representada por:



Diferentes substratos têm sido usados para a produção fermentativa de ácido láctico por bactéria láctica. Sacarose pura obtida a partir da cana-de-açúcar e de açúcar de beterraba tem sido muito usada desde a década de 50 (Vickroy, 1985). Produto mais puro é obtido quando substrato puro é fermentado, resultando em um menor custo de purificação. Várias matérias-primas e/ou bioprodutos têm sido avaliados para uso como substrato na produção de ácido láctico. Soro de leite, melão de cana, hidrolisados de amido e materiais ligoceulósicos constituem as matérias-primas adequadas para a produção de ácido láctico por fermentação microbiana (Senthuran *et al.*, 1997). O custo de produção de ácido láctico pode ser reduzido se sacarose obtida a partir do melão de cana for usado, principalmente se o microrganismo pode produzir ácido láctico diretamente a partir do melão, um subproduto da produção de açúcar e um valioso e econômico substrato para processos fermentativos (Monteagudo *et al.*, 1997).

A escolha de um microrganismo depende primeiramente do carboidrato a ser fermentado, pois as linhagens de microrganismos diferem quanto ao metabolismo relativo a diferentes fontes de carbono. *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *delbrueckii* é hábil para fermentar sacarose. *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* é hábil para fermentar lactose. *Lactobacillus helveticus* é hábil para fermentar lactose e galactose. *Lactobacillus lactis* pode fermentar glicose, sacarose e galactose (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000).

Comparada com a fermentação alcoólica, a fermentação do ácido láctico tem a distinta vantagem de alta produtividade. Quando glicose é usada como substrato, os rendimentos, teórico

e prático da fermentação alcoólica são 0,51 e 0,44-0,47 g etanol/g glicose, enquanto que, 1,0 e 0,90-0,94 g ácido láctico/g glicose podem ser obtidos na fermentação láctica, respectivamente (Xu *et al.*, 2006).

De acordo com estudos realizados por John e Nampoothiri (2007), a seleção do modo de operação do processo fermentativo para obtenção do ácido láctico pode variar em relação aos diferentes processos. A fermentação batelada pode ser superior a fermentação contínua em relação à conversão e rendimento, mas não em relação à produtividade volumétrica. Se o substrato é caro, o rendimento pode ser maximizado por um processo batelada ou batelada alimentada, enquanto que, a produtividade volumétrica pode ser maximizada por um processo contínuo, caso o custo do investimento seja alto. As altas concentrações e rendimentos de ácido láctico obtidos em processo batelada se devem, principalmente, porque neste processo todo o substrato é usado, enquanto no processo contínuo sempre tem uma concentração residual de substrato. Por outro lado, o processo contínuo, geralmente, resulta em alta produtividade devido à alta taxa de diluição e também, pode manter o processo por longo período de tempo (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000). Uma alta produtividade também pode ser encontrada num processo com reciclo de células. O sistema com reciclo de células, junto com processos contínuos e batelada repetida é eficiente para encontrar alta concentração celular e alta produtividade de ácido láctico (Oh *et al.*, 2003).

A produção de LAB em processo fermentativo descontínuo é considerada uma tecnologia bem conhecida, mas os efeitos de alguns parâmetros de processo ainda não são completamente conhecidos. Entretanto, é conhecido há muito tempo que o pH, a temperatura, a concentração de oxigênio, a composição do meio e o tipo de agente neutralizante exercem forte efeito sobre a velocidade de crescimento e sobre o rendimento de biomassa (Gilliland, 1985 citado por Zannini *et al.*, 2005).

Na maior parte das fermentações de ácidos orgânicos, a inibição do produto final pode ser um grande obstáculo para uma fermentação eficiente. Cepas bacterianas geralmente usadas nas fermentações de lactato podem ser inibidas por baixos valores de pH, resultante da produção de ácido láctico. O ácido láctico não dissociado passa através da membrana da bactéria e dissocia-se dentro da célula. O mecanismo de inibição de ácido láctico está, provavelmente,

associado com a solubilidade do ácido láctico não dissociado dentro da membrana citoplasmática e da insolubilidade do lactato dissociado, que causa a acidificação do citoplasma e incapacidade da força motriz de prótons. Isto eventualmente influencia o gradiente do pH da transmembrana e diminui a quantidade de energia disponível para o crescimento celular (Axelsson, 2004). Conforme resultados obtidos por Gonçalves *et al.* (1997), a inibição do crescimento celular não é ocasionado apenas pela forma não dissociada de ácido láctico, mas principalmente pela concentração total de ácido láctico. Os autores sugeriram que a inibição do crescimento pelo ácido láctico é um função do pH. Para valores altos de pH a concentração intracelular iônica de ácido láctico inibe o crescimento, enquanto para valores baixos de pH, a forma não dissociada de ácido láctico exerce função inibitória. Para evitar esse problema os processos fermentativos industriais para produção de lactato são normalmente realizados com pH mais elevado, resultando na produção de um sal de lactato, sendo necessárias etapas adicionais do processo para eliminar os cátions e obter o ácido láctico livre desejado (US 6.475.759 B1). A inibição da produção de lactato é considerada ter ocorrido quando a quantidade de lactato produzida não aumenta mais que 3% durante um período de incubação de doze horas nas mesmas condições (US 6.475.759 B1).

Segundo Ludeking e Piret (1959) e Gonçalves *et al.* (1997) o pH exerce maior efeito sobre a produtividade volumétrica de ácido láctico do que sobre a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), o que pode ser justificado pelo fato que μ_{\max} é obtida no início da fermentação, quando a concentração de ácido láctico é baixa.

A viabilidade econômica do processo fermentativo de produção de ácido láctico depende do desenvolvimento de um método eficaz de separação e purificação do ácido a partir do caldo fermentado, pois o processo de separação e purificação corresponde a 50% do custo de produção (Wasewar *et al.*, 2002). Apesar da diferença entre o ponto de ebulição do ácido láctico e da água ser relativamente grande, é quase impossível obter ácido láctico puro cristalino. A razão é que ácido láctico tem elevada afinidade com água e um dímero de lactato é formado quando a concentração de ácido láctico é suficientemente alta. O produto comercial de ácido láctico é, geralmente, uma solução aquosa com 85% de ácido láctico (Xu *et al.*, 2006). Recuperação de ácidos carboxílicos a partir de soluções aquosas diluídas como caldo de fermentação, causam alto custo de separação devido a complexa e intensiva tecnologia de recuperação de energia

(Järvinan *et al.*, 2000). Esterificação do ácido láctico com álcoois alifáticos de cadeia curta, como por exemplo, metanol e etanol pode ser usada como um método para obter ácido láctico altamente purificado a partir do caldo de fermentação. O éster de lactato produzido pode ser separado a partir de uma mistura reativa (Troupe e Dimilla, 1957).

2.2.3 Contaminação alcoólica por bactérias lácticas

Os primeiros relatos sobre contaminações nos processos de fermentação alcoólica são de Pauster (1873), em trabalhos onde o autor menciona a atividade de bactérias nas chamadas “doenças do vinho” (Gallo, 1990). Devido à temperatura, acidez, concentração de açúcares e de nutrientes entre outros fatores, que ocorrem durante a fermentação alcoólica há o desenvolvimento de muitos microrganismos como bactérias e várias espécies de leveduras, além da *Saccharomyces cerevisiae* que são considerados contaminantes (Cherubin, 2003). Dentre os contaminantes, as bactérias lácticas são os mais problemáticos devido à sua tolerância à alta temperatura, baixo pH e sua capacidade de crescer rapidamente. O gênero *Lactobacillus* é de grande preocupação para destilarias e usinas de álcool combustível (Narendranath *et al.*, 1997), pois representa 60% das espécies bacterianas encontradas no meio de fermentação alcoólica, com predomínio de *Lactobacillus fermentum* (Gallo, 1990).

Os maiores problemas causados pela contaminação bacteriana são o aumento da floculação, redução da viabilidade da levedura, formação de bioprodutos como ácido láctico e ácido acético, que ocasionam o consumo de sacarose e de nutrientes presentes no mosto, reduzindo o rendimento da fermentação alcoólica (Cherubin, 2003; Oliva Neto e Yokoya, 1997), podendo causar também problemas operacionais ou inibir a levedura produtora de etanol (Oliva Neto, 1995).

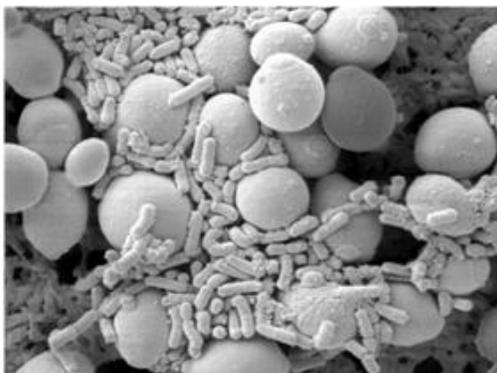


Figura 2.2.5 - Bactérias contaminantes da fermentação alcoólica (Basso, 2010)

Nas destilarias de etanol a redução da contaminação bacteriana é feita atualmente pelo uso de antibióticos. No entanto, o conceito de uso de antibiótico em um processo industrial é indesejável e seria interessante eliminar totalmente o uso de antibióticos na produção de etanol. Isto pode ser possível através de alterações nas condições do processo, de forma que a velocidade de crescimento de bactérias é reduzida significativamente. Em usinas de etanol que trabalham com processo de fermentação contínua, a redução do pH do mosto para 4,0 ou menos é uma das práticas empregadas para o controle de bactérias contaminantes, porém não é uma prática adequada porque reduz a contaminação bacteriana, mas também reduz a eficiência das leveduras para converter açúcar em etanol, reduzindo o rendimento de etanol (Narendranath e Power, 2005).

2.3 Lactato de Etila

O lactato de etila é um importante éster orgânico, biodegradável com excelentes propriedades de solvente e baixa toxicidade e candidato a substituir muitos solventes halogenados. O lactato de etila é usado em alimentos, perfumaria, produtos químicos e como solventes (Tanaka *et al.*, 2002), na remoção de gases, óleos de silicone, adesivos e na limpeza de uma variedade de superfícies metálicas para a fabricação e aplicações de revestimento (Vu *et al.*, 2006).

Interesse em ésteres de lactato está aumentando devido à ênfase em solventes ecológicos derivados de fontes renováveis. A agência de proteção ambiental americana (EPA) tem aprovado os solventes de éster de lactato como ingredientes inertes com toxicidade negligenciável e um excelente perfil ambiental. Isto tem aberto oportunidades para o desenvolvimento e

comercialização de uma boa gama de aplicações, especialmente para os solventes de ésteres de lactato não tóxicos e também, para outros solventes derivados de processos biotecnológicos (Datta e Henry, 2006).

2.3.1 Produção de lactato de etila

Ésteres de ácido láctico podem ser preparados a partir de ácido láctico, sais de ácido láctico, de outro éster do ácido láctico ou de um poliláctico.

O processo convencional para a produção de lactato de etila é a esterificação de ácido láctico com etanol catalisada por ácido sulfúrico. Uma vez que este tipo de catalisador homogêneo pode causar uma série de problemas, muitos catalisadores heterogêneos sólidos foram utilizados na reação, tais como resina de troca iônica, heteropoliácidos suportados em argila e barro (Yadav e Kulkarni, 2000). Dentre estes catalisadores, resina de troca catiônica é um substituto perfeito, que tem muitas vantagens, como: (a) problemas de corrosão podem ser evitados. Quando se trata de catálise ácida, a substituição de ácidos fortes por catalisadores heterogêneos diminui significativamente a ocorrência de corrosão, permitindo que os equipamentos sejam construídos de materiais convencionais, diminuindo custos de manutenção (Molina, 2005); (b) fácil eliminação de resíduos a partir da mistura reacional; (c) possíveis operações contínuas em colunas; (d) fácil remoção do catalisador a partir dos produtos de reação por decantação ou filtração. Ao utilizar um catalisador sólido e reagentes em fase líquida, a separação do catalisador e da mistura reacional é favorecida. A facilidade de separação resulta diretamente em redução de custos operacionais, uma vez que as etapas do processo e equipamentos são simplificadas (Molina, 2005); (e) grau de pureza dos produtos é maior desde que reações paralelas sejam eliminadas ou reduzidas (Seo e Hong, 2000; Dassý *et al.*, 1994). A resina de troca catiônica tipo *Amberlyst* é uma das resinas usadas na produção de ésteres de lactato. É uma resina composta por matrizes poliméricas de estireno com co-monômero de divinilbenzeno que apresentam grupos sulfônicos HSO_3^+ disponíveis na superfície do catalisador.

Durante sua vida útil um catalisador heterogêneo pode ser utilizado em vários ciclos sem perder sua atividade catalítica, o que não é comum em catalisadores homogêneos. Além disso, os custos para regenerar catalisadores heterogêneos são menores, do que por exemplo, reconcentrar

ácido sulfúrico. A disposição final dos catalisadores heterogêneos é mais atrativa, uma vez que seu potencial nocivo é menor do que de ácidos inorgânicos fortes (Chakrabarti e Sharma, 1993).

Um aspecto desfavorável da catálise heterogênea, principalmente do ponto de vista do estudo cinético, é que a reação química ocorre simultaneamente com outros fenômenos, como a difusão de produtos e reagentes entre o meio reacional e a superfície ativa do catalisador, a adsorção de reagentes e dessorção de produtos. Entretanto, a concentração de reagentes e produtos dentro do catalisador pode ser diferente da concentração presente no seio líquido (solução). O modelo cinético proposto com catalisador heterogêneo deve, portanto, considerar a importância desses fatores na velocidade de reação observada (Molina, 2005).

Segundo Chakrabarti e Sharma (1993), quando o meio reacional proporciona o inchamento significativo do catalisador e a sua polaridade favorece a dissociação do grupo HSO_3^+ ligado à resina, o comportamento da reação pode ser descrito por modelos pseudo-homogêneos. Quando o inchamento não é pronunciado e a catálise ocorre devido à interação direta do substrato com os grupos HSO_3^+ , modelos heterogêneos clássicos tipo Langmuir-Hinshelwood ou Eley-Rideal costumam descrever bem o comportamento da reação.

Os estudos desenvolvidos por Chakrabarti e Sharma (1993), também relataram que modelos pseudo-homogêneos são adequados principalmente, quando um dos reagentes ou o solvente é altamente polar. Na presença de substâncias polares ocorre a solvatação dos grupos HSO_3^+ ligados à resina e o agente catalítico é o próton solvatado. Quando a reação ocorre com reagentes ou solventes de natureza apolar, os modelos pseudo-homogêneo não são eficientes.

Em concentrações de água > 20%, ácido láctico sofre reações de oligomerização para formar ácidos oligômeros lineares. O grau de oligomerização é inversamente proporcional ao teor de água da solução. Estes oligômeros reagem com etanol para produção de ésteres de oligômeros. Na destilação reativa ou qualquer outro regime de esterificação do ácido láctico, a formação do oligômero e esterificação prejudicam o rendimento em lactato de etila e representam um desafio considerável na previsão do comportamento do processo (Chakrabarti e Sharma, 1993).

2.3.2 Destilação reativa

A destilação reativa tem sido proposta como uma técnica promissora para a recuperação de ácido láctico com alta pureza e alto rendimento a partir do caldo de fermentação. De acordo

com Asthana *et al.* (2005) o éster de ácido láctico (lactato de etila) pode ser produzido e separado de forma eficiente e com altos rendimentos a partir da esterificação do ácido láctico com excesso de etanol, usando uma única etapa operacional, através do processo de destilação reativa.

Destilação reativa é uma tecnologia emergente que tem um potencial considerável como um processo alternativo para a realização de reações em fase líquida limitada pelo equilíbrio (Kumar *et al.*, 2006).

O processo de destilação reativa baseia-se no conceito de combinar os processos de reação e destilação com o objetivo de melhorar o desempenho de ambos os processos. A destilação reativa é normalmente aplicada em sistemas em que as volatilidades relativas dos reagentes e produtos são tais que os produtos podem ser facilmente removidos da mistura reacional, de acordo com a reação a seguir.



Para destilação reativa ser eficaz, as volatilidades dos produtos C e D devem ser maiores ou menores do que as volatilidades dos reagentes A e B. Considerando que as volatilidades,

$$\alpha_C > \alpha_A > \alpha_B > \alpha_D$$

o reagente A seria alimentado no fundo na coluna em fluxo ascendente e o reagente B na parte superior da coluna com fluxo descendente. O produto C seria destilado e o produto D seria retirado no fundo da coluna, de acordo com a Figura 2.3.1 (Luyben, 2006).

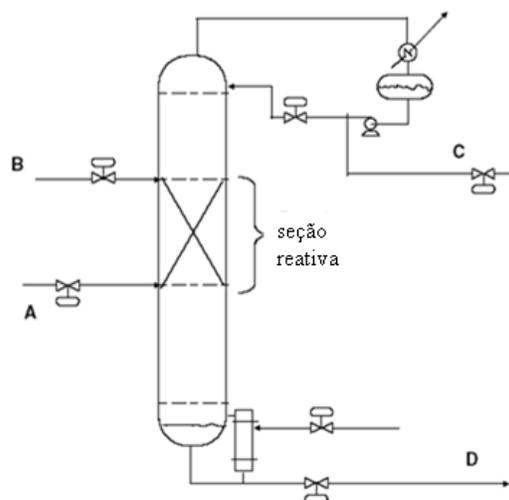
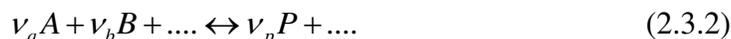


Figure 2.3.1 - Destilação reativa ideal (Luyben, 2006).

Na destilação reativa, como na destilação convencional, o conhecimento do equilíbrio líquido-vapor é vital. Quando este equilíbrio é sobreposto em uma reação química, a curva de concentração em uma coluna de destilação é significativamente influenciada (Tuchlenski *et al.*, 2001). Em uma reação de equilíbrio do tipo



com os coeficientes estequiométricos (v_i), o equilíbrio químico de A e B, com o produto (P) pode ser descrito usando a constante de equilíbrio (K_x), de acordo com a equação a seguir (Tuchlenski *et al.*, 2001).

$$K_x = \frac{x_p^{v_p}}{x_A^{v_A} x_B^{v_B}} \quad (2.3.3)$$

Destilação reativa representa provavelmente a aplicação mais importante na intensificação e dependência térmica entre processos de reação e separação (Bumbac *et al.*, 2007).

A destilação reativa vem sendo aplicada também, na área de modelagem, simulação e em estratégias de controle, podendo desta forma, tornar-se uma importante ferramenta para intensificação e integração de processos (Sharma e Mahajani, 2003), como também, uma alternativa promissora para separação e purificação de ácidos orgânicos.

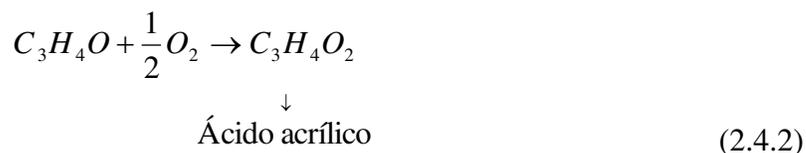
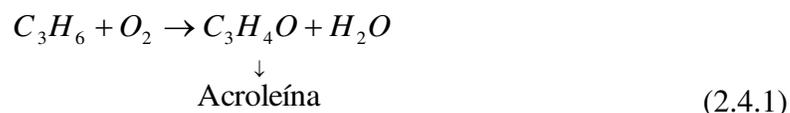
2.4 Ácido Acrílico e Acrilato de Etila

Ácido acrílico e seus ésteres são usados principalmente como matéria-prima na produção de produtos poliméricos. Os polímeros produzidos a partir de ácido acrílico e seus ésteres são caracterizados por sua transparência, fácil adesão, elasticidade, estabilidade ao calor e luminosidade. São aplicados no recobrimento de superfícies, têxtil, adesivos, tratamento de papel, fibras, detergentes, materiais super-absorventes, etc. Atualmente todo ácido acrílico é produzido a partir da indústria petroquímica (Falbe *et al.*, 1995).

O ácido acrílico é um líquido incolor que desprende um odor irritante à temperatura e pressão ambiente (25°C e 1 atm), com ponto de fusão de 14°C e de ebulição 141,0°C. É miscível em água e na maior parte de solventes orgânicos. Polimeriza-se facilmente na presença de oxigênio.

A primeira síntese química do ácido acrílico ocorreu em 1843, através da oxidação da acroleína e ar. Em 1943, ocorreu a primeira produção comercial de ácido acrílico, usando acetileno como matéria-prima (Brockinton *et al.*, 1986).

Existem vários caminhos para a produção química de ácido acrílico, mas o mais comum é via a oxidação parcial do propileno (Kurland e Bryant, 1987), conforme reações a seguir:



Neste processo, o ácido acrílico é obtido na forma de soluções aquosas diluídas contendo cerca de 10% a 50% (em massa) de ácido acrílico (Chubarov *et al.*, 1984).

A Figura 2.4.1 apresenta diferentes rotas metabólicas alternativas para produção de ácido acrílico a partir de fontes renováveis.

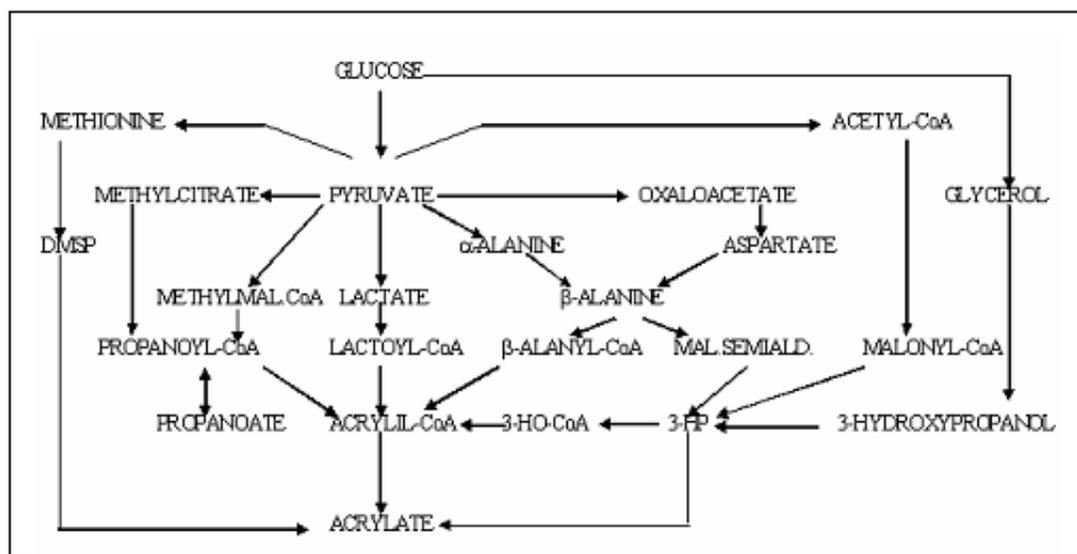


Figura 2.4.1 - Caminhos metabólicos para biossíntese de ácido acrílico a partir de fontes renováveis (Straathof *et al.*, 2005)

Entre as diversas rotas metabólicas apresentadas na Figura 2.4.1 para a produção de ácido acrílico a partir de fontes renováveis, a rota mais direta é via lactato. Porém, há diversos problemas com a produção de ácido acrílico através deste caminho. Primeiramente, um terço do lactato não conduz ao acrilato, porque é convertido em acetato e em CO₂. Sem esta conversão para acetato, nenhuma ATP (adenosina trifosfato) para o crescimento e manutenção é gerada (Straathof *et al.*, 2005). Entretanto, a concentração de acrilatos nunca excede 1% da concentração de substrato inicial (Akedo *et al.*, 1983). Estes baixos rendimentos são devidos ao enriquecimento de redutores equivalentes a ferredoxina, rubredoxina e flavodoxina, que ajudam a inibir o crescimento celular (Danner e Braun, 1999).

Levando em consideração que o ácido acrílico normalmente, não é o produto final do metabolismo do processo enzimático, Danner *et al.* (1998) propuseram algumas estratégias, conforme descrição abaixo, para possível obtenção de altas concentrações de ácido acrílico a partir de fontes renováveis.

- Produção biotecnológica via fermentação do ácido láctico a partir de biomassa, concentração do produto, purificação e, finalmente, conversão química de ácido láctico a ácido acrílico;

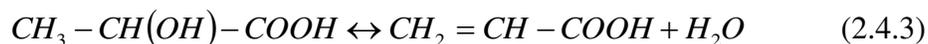
- Conversão via fermentação convencional de substratos complexos para ácido láctico por meio de *Lactobacillus*, *Bacillus* ou *Streptococcus*. Conversão de ácido láctico para ácido acrílico por redução direta modificada, via fermentação com *Clostridium propionicum*. Este microrganismo tem demonstrado a conversão de 3 moles de ácido láctico para 1 mol de acetato e 2 moles de propionato, via *Acryloil-CoA* por redução direta. Normalmente, os acrilatos são produzidos somente depois de bloquear o caminho da redução direta (formação de propionato);
- Outro método seria seguindo a estratégia citada acima, com a inserção de um gene de *Lactoil-CoA desidratase* na bactéria do ácido láctico;
- Conversão direta dos substratos complexos para ácido propiônico, com cultivo de *Lactobacillus* e *Propionibacterium shermanii* e conversão de propionato a ácido acrílico com *Clostridium propionicum*. Nesta rota, as taxas de conversão de propionato para ácido acrílico podem atingir 18,5% (O'Brien *et al.*, 1990);
- Redução de L-alanina para lactato, via formação de piruvato ou da fermentação de lactato para ácido acrílico com *Clostridium propionicum*, via redução direta bloqueando a desidrogenase e inserindo a hidrogenase para evitar a formação de agentes, como por exemplo, ferredoxina. Neste caso, o microrganismo conduzirá principalmente à formação de ácido acrílico.

O acrilato de etila é usado em várias indústrias como um intermediário na produção de emulsão polimérica, sendo principalmente utilizado na fabricação de resinas acrílicas usadas em formulações de tintas, revestimentos industriais e produtos de látex. Acrilato de etila é usado também, na fabricação de poliacrilatos, borrachas, revestimentos de papel e têxteis, resinas de revestimento para couro, fibras acrílicas e materiais para próteses dentárias, como aditivo de fragrâncias em sabonetes, detergentes, cremes, loções, perfumes, e como essência sintética de fruta (Iarc, 1986).

A desidratação de ácido láctico a ácido acrílico é considerado um processo alternativo, independente do processo petroquímico existente (Aida *et al.*, 2009). A desidratação do ácido láctico para produção do ácido acrílico é um processo viável, no entanto melhoras ainda são necessárias para torná-lo mais competitivo, além do desenvolvimento de novos processos para a sua obtenção. O conhecimento dos caminhos metabólicos e a identificação de enzimas, como

também seus correspondentes genes, podem facilitar a construção de células geneticamente modificadas para fazer a desidratação biológica do ácido láctico (Xu *et al.*, 2006).

A desidratação direta do ácido láctico para o ácido acrílico é expressa por:



Alguns estudos desenvolvidos do processo de desidratação química do ácido láctico para formação de ácido acrílico são citados a seguir.

- Holmen (1958), fez a conversão de ácido láctico para ácido acrílico em fase vapor, usando $CaSO_4$ e $NaSO_4$ como catalisador a uma temperatura de $400^\circ C$ obtendo rendimento de 54%;
- Sawicki (1988) usou Na_2HPO_4 como catalisador em sílica com $NaHCO_3$ a temperatura de $350^\circ C$ e rendimento de 58% de ácido acrílico foi obtido;

A formação de ésteres ou sais de lactato antes da conversão pode facilitar o processo de desidratação (Xu *et al.*, 2006).

- Paporizos (1988) inicialmente fez a conversão de ácido láctico a ácido acrílico usando $CaSO_4$ como catalisador e, obteve um rendimento de 48%, na sequência, usou sal (lactato de amônia) e éster de ácido láctico (lactato de metila) e rendimentos de 61% e 53%, respectivamente, foram obtidos.
- Zhang *et al.* (2008) realizaram a desidratação de ácido láctico sobre catalisador de sulfato de cálcio e sulfato de cobre e sais de fosfato como promotores a temperatura de $250^\circ C$ – $420^\circ C$, usando dióxido de carbono e nitrogênio como gás de arraste. O melhor rendimento molar de ácido acrílico obtido foi de 63,7% à temperatura de $330^\circ C$ e tempo de residência de 88 segundos, usando dióxido de carbono como gás de arraste.
- Aida *et al.* (2009) avaliaram a desidratação de ácido láctico para síntese de ácido acrílico usando alta temperatura ($450^\circ C$) e altas pressões (40 – 100 MPa) para avaliar o efeito da densidade da água sobre o rendimento do produto. Com os resultados obtidos concluíram que o aumento da densidade da água (P = 100 MPa) em alta temperatura é eficaz para aumentar a seletividade de ácido acrílico a partir da desidratação do ácido láctico.

Novos estudos para a desidratação de ácido láctico à ácido acrílico são necessários, pois ainda não se desenvolveu um processo comercialmente eficiente e economicamente atraente. Um dos problemas do processo é a natureza recalcitrante da etapa de desidratação, embora seja um pouco reduzida através da utilização de catalisador ou a formação de lactato. O principal concorrente da reação de desidratação é a formação de produtos de auto-reação, como lactídeos, que posteriormente são mais facilmente decompostos em fragmentos, como o monóxido de carbono, acetaldeído e água (Xu *et al.*, 2006).

2.5 Modelagem Cinética de Processos Fermentativos

Modelagem matemática é uma poderosa ferramenta na engenharia, química e na física para interpretação e predição de fenômenos naturais e resultados experimentais (Gershenfeld, 1999 citado por Gombert e Nielsen, 2000). Um modelo matemático é sempre a simplificação de um fenômeno real, portanto, é possível estabelecer diferentes modelos matemáticos para o mesmo fenômeno, dependendo dos objetivos do modelo e das medidas disponíveis (Bailey, 1998).

O objetivo principal da modelagem matemática e da simulação, como ferramentas do desenvolvimento tecnológico de processos fermentativos, é prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo, inclusive em condições não testadas empiricamente, possibilitando a determinação das condições operacionais economicamente ótimas do sistema, auxiliando no projeto e ajuste de algoritmos de controle (Heinzle e Saner, 1991 citado por Bonomi e Schmidell, 2001).

Os modelos matemáticos atuam como um reservatório de conhecimento sobre um processo e, portanto, podem revelar interações que podem ser difíceis, senão impossíveis, de visualizar e/ou prever apenas com a realização de experimentos, principalmente quando muitos fatores variam simultaneamente. De uma forma geral, modelagem matemática é a melhor maneira de se descobrir o que não se sabe sobre um determinado processo. Modelos são úteis para o *design* do processo, estimativa dos parâmetros do processo, simulação do processo e análise de sensibilidade paramétrica bem como, para a otimização do processo, principalmente quando se tem problemas com alta não linearidade (Meta, 2006).

Muitas tentativas têm sido realizadas no sentido de se procurar interpretar resultados experimentais com auxílio de modelos matemáticos visando, por um lado, colaborar na elucidação de mecanismos envolvidos no processo e, por outro lado, estabelecer um conjunto de equações que possibilitem o adequado controle do sistema e sua otimização. Um modelo cinético baseia-se sempre em hipóteses fundamentais, às vezes passíveis de comprovação, a partir das quais se procura deduzir expressões que relacionem as variáveis escolhidas no estudo experimental (Bonomi e Schmidell, 2001).

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, através de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente no biorreator, associado às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam (Bonomi e Schmidell, 2001). Em razão da complexidade do processo real (que envolve leis físico-químicas, bioquímicas e genéticas), somada às limitações matemáticas, os modelos são baseados, geralmente, na idealidade e, em geral, fornecem uma representação fiel de algumas propriedades do processo (Volesky e Votruba, 1992). Sem o conhecimento do mecanismo das reações e sua cinética, não é possível estudar e avaliar as variáveis que influenciam o rendimento de um processo.

Existem diversos modelos cinéticos disponíveis na literatura, para representar os diversos fenômenos identificados em processos fermentativos, alguns são listados na tabela abaixo e foram obtidos a partir de Bonomi e Schmidell (2001).

Tabela 2.5.1 - Modelos cinéticos não estruturados

Modelo	Crescimento num único substrato limitante
<i>Monod</i>	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$
<i>Moser</i>	$\mu_x = \frac{\mu_m S^n}{K_s^n + S^n}$
<i>Contois</i>	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s X + S}$
Modelo	Crescimento num único substrato limitante e inibidor
<i>Andrews</i>	$\mu_x = \frac{\mu_a S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$
<i>Wu et al.</i>	$\mu_x = \frac{\mu_a}{1 + \frac{K_s}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n}$
Modelo	Consumo de substrato limitante para manutenção
<i>Zeng e Deckwer</i>	$\mu_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x + m_s + \Delta \mu_s^{\max} \frac{S - S^*}{K^* + S - S^*}$
Modelo	Produção de produto metabólico associado e não associado ao crescimento
<i>Luedeking e Piret</i>	$\mu_p = \alpha \mu_x + \beta x$
Modelo	Produção de produto metabólico inibitório
<i>Aiba</i>	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} e^{-K_p P}$
<i>Levenspiel</i>	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$

Os modelos cinéticos usados para representar processos fermentativos podem ser divididos em modelos estruturados e não estruturados. Fredrickson (1970) citado por Bailey (1998) introduziu uma classificação para representar matematicamente a população celular,

utilizando estes dois tipos de modelos (estruturado e não estruturado), além da introdução de modelos segregado e não segregado, conforme mostra a Figura 2.5.1.

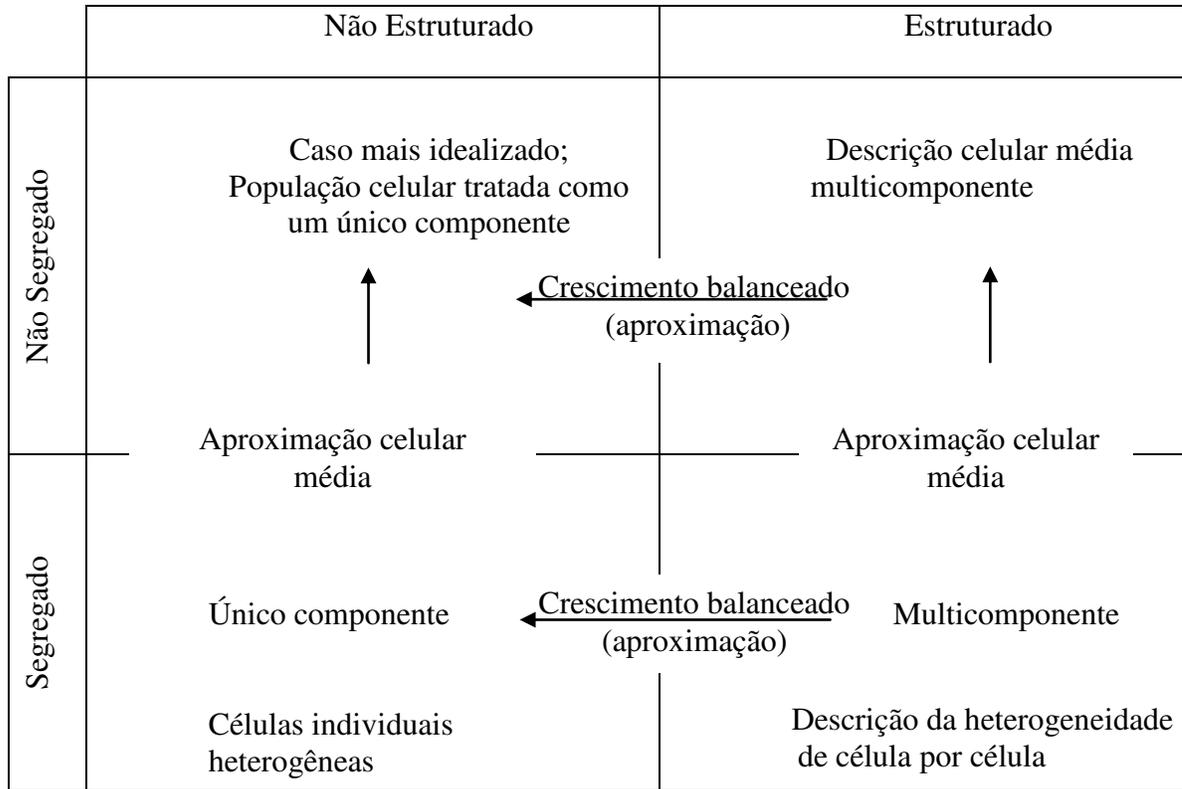


Figura 2.5.1 - Classificação dos modelos matemáticos para representação da população celular (Fredrickson, 1970, citado por Bailey, 1998)

Os modelos não estruturados constituem uma classe de modelos sem preocupação da descrição da estrutura da população a ser modelada. No caso de uma população microbiana, a composição ou qualidade da biomassa não é levada em consideração. Estes modelos incluem as observações mais fundamentais dos processos de crescimento microbiano: a taxa de produção de massa celular é proporcional à concentração de biomassa; existe um limite de saturação para a taxa de crescimento para cada substrato; as células necessitam de substrato e podem sintetizar produtos quando elas não crescem (Montesinos *et al.*, 1995).

Modelos não estruturados são geralmente mais tratáveis do ponto de vista matemático e mais facilmente verificáveis experimentalmente. De certa forma, estes modelos são mais preferíveis onde sua precisão e descrição do sistema sejam adequadas a uma determinada aplicação. A equação de Monod, para o crescimento de microrganismo limitado pelo substrato é

um exemplo de um modelo não estruturado bem sucedido. Em geral modelos não estruturados podem ser considerados como uma boa precisão em dois casos: quando a composição dos organismos não é relevante ao aspecto do sistema, ou quando ela é independente do tempo, isto é, em crescimento balanceado (Fredrickson, 1970, citado por Bailey, 1998). Quando a composição celular e/ou a morfologia da cultura celular são importantes e as variáveis fortemente dependentes do tempo, a solução é o uso de modelos estruturados que incluem os principais aspectos da estrutura e da fisiologia microbiana para a descrição matemática do metabolismo dos microrganismos (Nielsen e Villadsen, 1992). Seguindo os avanços das técnicas analíticas, medidas das concentrações de metabólitos intracelulares e as atividades de enzimas intracelulares têm possibilitado a formulação de modelos mais estruturados, que tem aumentado a possibilidade para interpretação e predição da fisiologia celular (Gombert e Nielsen, 2000).

Devido à complexidade de qualquer sistema vivo, modelos biológicos são geralmente não estruturados e não segregados (Pinchuk, 2000). Vários modelos cinéticos estruturados e não estruturados para produção de ácido láctico tem sido reportados na literatura. Modelos não-estruturados são muito mais fáceis de usar, e descrevem com precisão a fermentação de ácido láctico em diferentes condições experimentais e diferentes meios de cultura (Nandasana e Kumar, 2008).

2.5.1 Modelo cinético de crescimento celular

O crescimento de um microrganismo em um sistema batelada consiste em seis fases: 1) fase lag; 2) fase de aceleração; 3) fase exponencial; 4) fase de desaceleração; 5) fase estacionária; 6) fase de declínio (morte celular) (Monod, 1949).

As informações quando o crescimento é medido quantitativamente são, geralmente, apresentadas na forma gráfica de biomassa versus tempo. Os dados podem ser representados de forma mais significativa e concisa se forem analisados em termos dos vários parâmetros de crescimento, a saber, velocidade específica de crescimento ou tempo de meia vida, crescimento exponencial, rendimento de biomassa, quociente metabólico para consumo de substrato e formação de produto, afinidade de substrato e máxima biomassa (Pirt, 1975).

As condições necessárias para crescimento celular em uma cultura são: (i) inóculo viável; (ii) fonte de energia; (iii) nutrientes necessários para sintetizar a biomassa; (iv) ausência

de inibidores que impedem o crescimento; (v) condições físico-químicas adequadas (Pirt, 1975). Se as condições para o crescimento são satisfeitas, então durante um pequeno intervalo de tempo (dt) é esperado um aumento na biomassa (dx) proporcional a quantidade de biomassa (x) presente, ou seja,

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2.5.1)$$

Quando μ (velocidade específica de crescimento (h^{-1})) = constante

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (2.5.2)$$

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu t \quad (2.5.3)$$

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (2.5.4)$$

O crescimento que está de acordo com o enuncia acima é chamado de crescimento logarítmico ou exponencial (Pirt, 1975).

O modelo de Monod é um modelo não estruturado desenvolvido por Nobel Laureate F. Monod em 1942, e muito usado para descrever a cinética de crescimento microbiano (Pirt, 1975; Koch, 1997; Kovarova-Kovar e Egli, 1998; Strigul *et al.*, 2009). O modelo de Monod é representado pela equação abaixo:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2.5.5)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad (2.5.6)$$

Onde, μ é a velocidade específica de crescimento (h^{-1}); μ_{\max} a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); S e X são as concentrações de substrato e biomassa (g/L), respectivamente; K_S é a constante de saturação ou constante de Monod (g/L).

No modelo de Monod é identificado somente três fases de crescimento, a fase exponencial, fase de desaceleração e a fase estacionária. É assumido que as fases lag, aceleração e declínio não existem. As células usadas pra inocular a cultura batelada são obtidas a partir de

outra cultura de crescimento ativada, e, portanto, o crescimento inicia logo na fase exponencial. No entanto, não se deve obter parâmetros do modelo de Monod diretamente a partir de dados experimentais se uma fase lag é observada. Outra importante suposição do modelo de Monod, é que o crescimento microbiano é limitado unicamente pela concentração do substrato e, portanto, é muito importante que as condições experimentais satisfaçam esta condição (Strigul *et al.*, 2009).

É necessário destacar dois pressupostos importantes que devem ser levados em consideração na tentativa de identificar os valores dos parâmetros do modelo de Monod a partir de dados experimentais. Primeiro, a função sigmoideal, que é uma solução do modelo de Monod, inicia-se na fase de crescimento exponencial. Portanto, um experimentador deve excluir as medições refletindo uma fase lag. Segundo, a solução do modelo de Monod demonstra uma fase estacionária infinita, onde a biomassa tende a valor estacionário. Entretanto, isso não é observado na vida real. Normalmente, a fase estacionária não é observada por um longo período de tempo e, às vezes, ocorre apenas por um tempo muito curto, seguida por um declínio na massa microbiana. No entanto, é muito importante determinar a concentração de biomassa no início da fase estacionária, uma vez que este valor determina o coeficiente de rendimento, bem como, ignorar qualquer declínio da concentração de biomassa que pode ocorrer após o início da fase estacionária (Strigul *et al.*, 2009).

Um requisito essencial para a validade do modelo de crescimento equilibrado é um estado biológico durante o qual a reação metabólica intracelular está operando em condições de estado estacionário. Se um modelo não estruturado é aplicado às condições dinâmicas, mudanças no ambiente celular devem ser lentas o suficiente para garantir uma sequência de estados estacionários da reação (Versyck *et al.*, 1997).

2.5.2 Modelo cinético de consumo de substrato

A variação da velocidade de consumo de substrato para manutenção, formação de produto e crescimento celular em um processo batelada pode ser descrito por:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} + mX \quad (2.5.7)$$

Segundo Yeh *et al.* (1991) o coeficiente de manutenção (m) pode ser negligenciado quando seu valor é muito menor que a velocidade específica de crescimento (μ), portanto, a equação (2.6.7) fica

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \quad (2.5.8)$$

De acordo com Roels (1983) quando a formação de produto está diretamente associada a geração de energia pelo microrganismo, a velocidade de consumo de substrato pode ser representada por:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dx}{dt} + mX \quad (2.5.9)$$

Onde, P, S e X são as concentrações de produto, substrato e biomassa (g/L), respectivamente; m é o coeficiente de manutenção (h^{-1}); $Y_{P/S}$ é o rendimento de produto em função do substrato consumido (g/g); $Y_{X/S}$ é o rendimento de biomassa em função do substrato consumido (g/g).

2.5.3 Modelo cinético de formação de produto

De acordo com Hiss (2001) a formação de produto pode estar associada ao crescimento celular, parcialmente associada ou não associada ao crescimento, conforme mostram as Figuras 2.5.2(a-c). Na Figura 2.5.2(a) a formação do produto está diretamente ligado às reações do catabolismo ou decomposição do substrato. Na Figura 2.5.2(b) é possível observar duas fases distintas, sendo que na primeira fase a velocidade específica de consumo de substrato está diretamente relacionada à de crescimento celular, não havendo praticamente formação de produto. Na segunda fase se pode perceber uma boa semelhança entre a velocidade de consumo de substrato, crescimento celular e formação de produto. Os perfis da Figura 2.5.2(b) representam a formação de produto parcialmente associada ao crescimento celular. Enquanto que a Figura 2.5.2(c) representa uma formação de produto não associada ao crescimento.

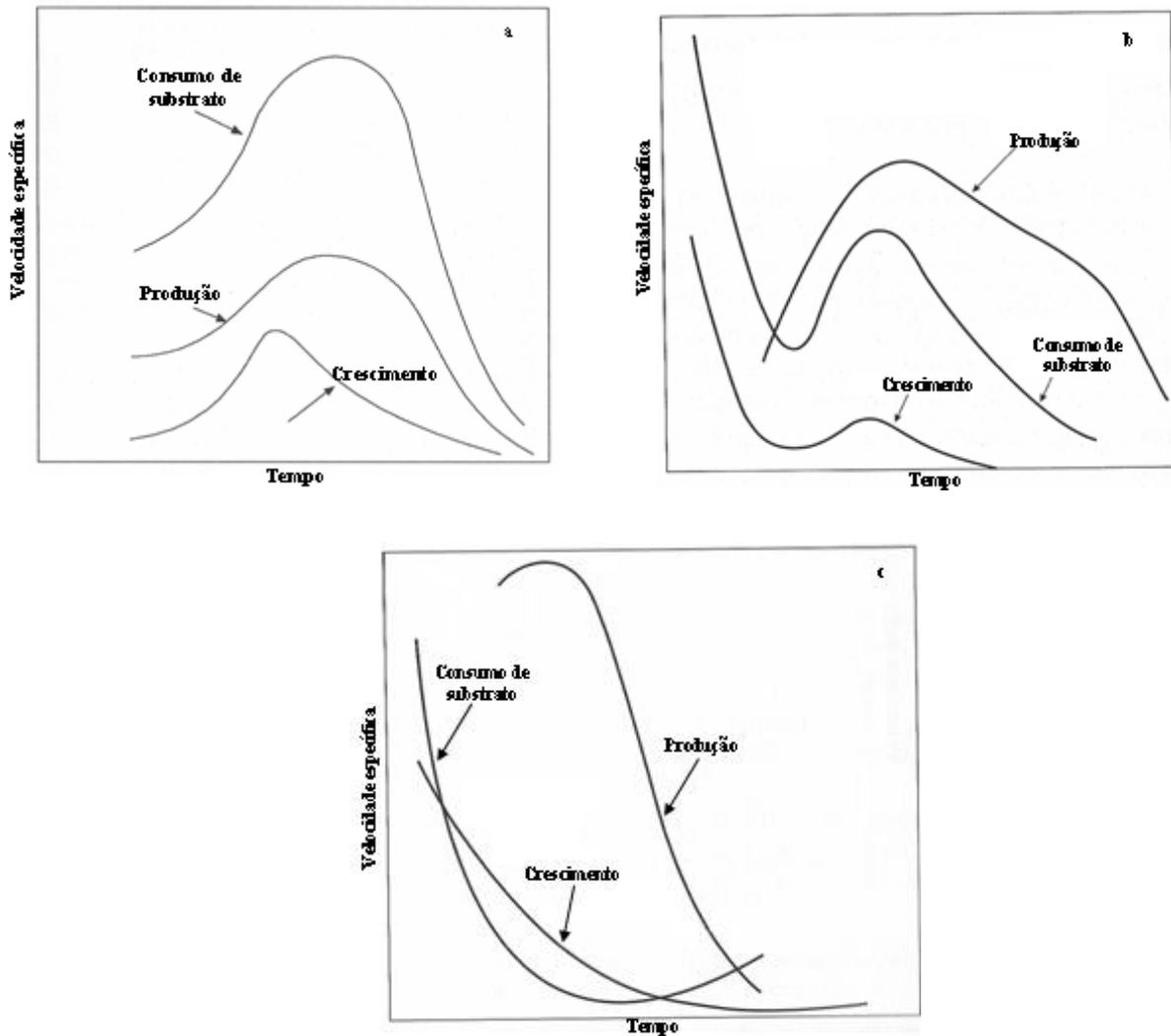


Figura 2.5.2 - Perfis das velocidades específicas num processo fermentativo (a) produção associada ao crescimento; (b) produção parcialmente associada; (c) produção não associada ao crescimento (Hiss, 2001)

De acordo com o modelo desenvolvido por Luedeking e Piret (1959), a fermentação do ácido láctico pode ser representada por:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \quad (2.5.10)$$

Onde

$$\frac{dP}{dt} \frac{1}{X} = \mu_P \quad (2.5.11)$$

$$\frac{dx}{dt} \frac{1}{X} = \mu_x \quad (2.5.12)$$

Substituindo μ_p e μ_x na equação (2.5.10), tem-se

$$\mu_p = \alpha\mu_x + \beta \quad (2.5.13)$$

Na equação 2.5.13 a produção de ácido láctico é representada por dois mecanismos, sendo um associado ao crescimento celular (α) e outro não associado ao crescimento (β).

2.6 Estimação de Parâmetros Cinéticos

Métodos de otimização têm um número de aplicações em ciência e engenharia. Nem todos os problemas podem ser determinados ou analisados quantitativamente. Cada problema de otimização contém três categorias essenciais (Himmelblau *et al.*, 2001):

1. pelo menos uma função objetiva para ser otimizada;
2. restrições de igualdade;
3. restrições de desigualdade.

Devido à variabilidade entre os processos biotecnológicos, não existe um único método de otimização que seja adequado para todos os processos. Portanto, é importante aplicar diferentes métodos de otimização para um mesmo processo, a fim de encontrar a melhor solução (Mendes e Kell, 1998). O método escolhido para algum caso particular depende primeiramente (Himmelblau *et al.*, 2001):

1. do caráter da função objetivo e seu conhecimento explícito;
2. da natureza das restrições;
3. do número de variáveis dependentes e independentes.

Problemas de otimização estão interessados em encontrar o ótimo (máximo ou mínimo) de funções. O problema pode ser declarado em termos gerais, da seguinte forma (Mendes e Kell, 1998):

dada uma função escalar de valor real $f(x)$ de (n) variáveis $x = (x_1, \dots, x_n)$, encontrar um mínimo de $f(x)$, de modo que $g_i(x) > 0$ com $i = 1, \dots, m$ (restrição de desigualdade) e $h_j(x) = 0$ com $j = 1, \dots, m$ (restrição de igualdade).

Geralmente, a função objetivo $f(x)$ e as restrições de igualdade e desigualdade são não lineares, embora, freqüentemente, as restrições são condições lineares da forma $a_i \leq x_i \leq b_i$, onde a_i e b_i são constantes positivas.

Existe uma variedade de métodos de otimização. Os métodos de programação linear são muito populares devido a sua habilidade em tratar centenas de milhares de parâmetros, porém não podem ser aplicados para problemas bioquímicos, devido a sua necessidade de linearidade da função objetivo em termos dos parâmetros ajustáveis. Devido a isso, métodos de otimização não linear são preferíveis. Métodos estocásticos são importantes quando a função objetivo tem vários ótimos sem interesse num ótimo global. Algoritmos evolucionários, também de natureza estocástica, podem ser usados para otimização não linear (Back e Schwefel, 1993). Entre os algoritmos evolucionários, o mais conhecido é o algoritmo genético (GA) (Holland, 1992; Goldberg, 1989).

A fórmula geral para representar uma função objetivo através do emprego de um método de otimização é apresentada a seguir e foi obtida a partir de Vaz (2006).

$$\begin{aligned} \min_{x \in \mathbb{R}^n} f(x) \\ c(x) = 0 \end{aligned} \quad (2.6.1)$$

Onde $f(x)$ e $c(x)$ são funções não lineares em x .

$$\begin{aligned} x = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix} \quad \begin{aligned} f(x): \mathbb{R}^n &\rightarrow \mathbb{R} \\ c(x): \mathbb{R}^n &\rightarrow \mathbb{R}^m \end{aligned} \end{aligned} \quad (2.6.2)$$

Onde, n = número de variáveis do problema; m = número de restrições de igualdade.

$$c(x) = \begin{pmatrix} c_1(x) \\ c_2(x) \\ \vdots \\ c_m(x) \end{pmatrix} \quad (2.6.3)$$

Outra forma de expressar um problema de otimização é:

$$\begin{aligned} \min_{x \in \mathfrak{R}^n} f(x) \\ c_i(x) = 0, \quad i = 1, \dots, m \\ c_j(x) \geq 0, \quad j = m + 1, \dots, t \end{aligned} \quad (2.6.4)$$

Onde, $f(x)$ é a função objetivo; $c_i(x)=0$ são as restrições de igualdade e $c_j(x)$ são as restrições de desigualdade.

a) Equivalência entre os problemas de otimização

Problema de maximização

$$\begin{aligned} \max_{x \in \mathfrak{R}^n} g(x) \\ c_i(x) = 0, \quad i = 1, \dots, m \\ \tilde{c}_j(x) \leq 0, \quad j = m + 1, \dots, t \end{aligned} \quad (2.6.5)$$

Problema de minimização

$$\min_{x \in \mathfrak{R}^n} f(x) = -g(x) \quad (2.6.6)$$

$$c_i(x) = 0, \quad i = 1, \dots, m$$

$$c_j(x) \equiv -\tilde{c}_j \geq 0, \quad j = m + 1, \dots, t$$

b) Otimização não linear com restrições de desigualdade

$$\min_{x \in \mathfrak{R}^n} f(x) \quad (2.6.7)$$

$$c(x) \geq 0$$

Onde $f(x)$ e $c(x)$ são funções não lineares em x .

$$\begin{aligned}
 x &= (x_1, x_2, \dots, x_n)^T & f(x) &: R^n \rightarrow R \\
 & & c(x) &: R^n \rightarrow R^m
 \end{aligned} \tag{2.6.8}$$

$$c(x) = (c_1(x), c_2(x), \dots, c_m(x))^T$$

Existem basicamente dois tipos de aplicações em que a simulação-otimização é útil. A primeira está relacionada com o conjunto de valores de parâmetros que resulte em um valor máximo ou mínimo de uma variável do modelo e de uma função de variáveis do modelo. Nesta aplicação apenas dados do modelo são usados. A outra aplicação se refere a estimação de parâmetros, onde se tem um conjunto de valores de variáveis do modelo que foram determinados experimentalmente e se pretende encontrar um conjunto de valores dos parâmetros (valores preditos) do modelo que possam reproduzir adequadamente o comportamento do sistema experimental. Nesta aplicação a função objetivo é o somatório do quadrado dos resíduos. O problema de estimação de parâmetros consiste sempre na minimização da função objetivo (Mendes e Kell, 1998).

2.6.1 Algoritmo genético

O algoritmo genético (GA) é um algoritmo de busca estocástica global eficaz baseado na teoria de Darwin, onde uma população de indivíduos se desenvolve segundo os princípios da reprodução e da sobrevivência do mais apto e análogo de ocorrência natural de operações genéticas como cruzamento (*crossover*) e mutação (Koza, 1997; Holland, 1992). De acordo com Goldberg (1989), os algoritmos genéticos são algoritmos de busca baseados nos mecanismos de seleção natural e genética.

O algoritmo genético é um método que simula, através de algoritmo, os processos de evolução natural (biológica) visando, principalmente, resolver problemas de otimização de grande complexidade. GA pode ser visto como uma representação matemática – algorítmica das teorias de Darwin e da genética, chamada de a nova sintaxe da teoria da evolução, cujos principais postulados podem ser resumidos por (Victorino, 2005):

- A evolução é um processo que opera sobre os cromossomos do organismo e não sobre o organismo que os carrega. Desta maneira, o que ocorrer com o organismo, durante a sua vida, não se reflete sobre seus cromossomos.

- A seleção natural é o elo entre os cromossomos e o desempenho de suas estruturas decodificadas. O processo de seleção natural faz com que os cromossomos que decodificaram organismos mais bem adaptados ao seu ambiente sobrevivam e reproduzam mais do que os que decodificam organismos menos aptos.

- O processo de reprodução é o ponto através do qual a evolução se caracteriza. Mutações podem causar diferenças entre os cromossomos dos pais e dos filhos. Processos de recombinação (*crossover*) podem ocasionar mudanças significativas nos cromossomos dos filhos em relação aos dos seus progenitores, uma vez que há combinações de materiais cromossômicos de dois genitores.

O algoritmo genético busca uma boa (ou a melhor) solução para o problema, reproduzindo geneticamente uma população de indivíduos com mais de uma série de gerações. No GA, cada indivíduo na população representa uma solução candidata para o problema. O GA transforma uma população (grupo) de indivíduos, cada um com um valor adequado associado, em uma nova geração da população usando reprodução, *crossover* e mutação (Koza, 1997).

Os algoritmos genéticos empregam uma estratégia de busca paralela e estruturada, mas aleatória em direção a descoberta de indivíduos (parâmetros) que fornecem alta aptidão, ou seja, encontrar valores que maximizam ou minimizam a função objetivo de interesse. Uma das principais características do GA é de não encontrar uma única solução (indivíduo), mas uma população de indivíduos, caracterizando-se como métodos estocásticos de procura e seleção (Victorino, 2005).

A sequência de sistemas genéticos artificiais é análoga aos cromossomos em sistemas biológicos. Nos sistemas naturais, um ou mais cromossomos se combinam para formar a prescrição genética total para a construção e funcionamento de alguns organismos. Nos sistemas naturais, o conjunto genético total é chamado de genótipo. Em sistemas genéticos artificiais do conjunto total de sequências é chamada de estrutura. Nos sistemas naturais o organismo formado pela interação do genótipo com o seu ambiente é chamado de fenótipo. Em sistemas genéticos artificiais, as estruturas de decodificação para formar um conjunto de parâmetros, são chamadas de soluções alternativas ou ponto (no espaço de solução) (Goldberg, 1989).

De acordo com Goldberg (1989), algumas características devem ser levadas em consideração durante a implementação da técnica de algoritmo genético em um processo, onde se pode destacar:

- O espaço de busca do problema deve estar delimitado dentro de uma faixa de valores;
- As soluções devem ser codificadas facilmente para uma boa implementação e devem ser representadas em forma de código genético;
- Variedade na população inicial, isto é, se deve ter uma diversidade suficiente que permita realizar combinações de características para produção de novas soluções;
- Existência de um método que possa medir a qualidade de uma solução potencial.
- Critério de escolha de soluções que permaneçam na população ou são retirados dela;
- Determinar procedimento de combinação de soluções com objetivo de gerar novos indivíduos na população, introduzindo modificações em algumas dessas, mantendo a diversidade da população para serem avaliadas pelo critério de seleção dos indivíduos mais aptos, até alcançar o objetivo proposto.

Como o algoritmo genético é um método que simula a evolução natural, muitos dos termos usados na metodologia GA são originários da genética. Na sequência, é apresentada a descrição de alguns termos usados em GA, obtidos a partir de Victorino (2005).

- *Cromossomo e genoma*: representam a estrutura de dados que codifica uma solução para um determinado problema, ou seja, um cromossomo ou um genoma representa um simples ponto do espaço de busca;
- *Gene*: é um parâmetro codificado no cromossomo ou um elemento do vetor que representa o cromossomo;
- *Indivíduo*: indivíduo formado pelo cromossomo e sua aptidão;
- *Genótipo*: representa a informação contida no cromossomo ou no genoma;

- *Fenótipo*: representa o objeto, estrutura ou organismo construído a partir das informações do genótipo.
- *Alelo*: representa os valores que o gene pode assumir;
- *Epistasia*: interação entre genes do cromossomo, ou seja, quando um valor de gene tem influência em um valor de outro gene;
- *Mutação*: modificação aleatória do cromossomo visando gerar novas possíveis soluções;
- *Reprodução*: cruzamento, isto é, troca de segmentos dos cromossomos selecionados;
- *População*: soluções que representam o conjunto de cromossomos;
- *Seleção natural*: determinado pela aptidão do indivíduo;
- *Geração*: número de iteração que é executado pelo organismo;
- *Operações genéticas*: transformações que ocorrem sobre os indivíduos. As mais conhecidas são recombinação ou cruzamento e mutação;
- *Espaço de busca*: espaço ou região que contém as possíveis soluções do problema a ser otimizado;
- *Função objetivo*: função que se deseja otimizar no processo.

2.7 Controle de Processos Fermentativos

Bioprocessos são caracterizados por uma dinâmica não linear, parâmetros que variam no tempo, falta de reprodutibilidade de resultados experimentais e falta de sensores baratos e confiáveis, capazes de fornecer medições on-line das principais variáveis e parâmetros do processo (Stoyanov, 2000).

A aplicação de controle em processos fermentativos permite uma maior reprodutibilidade da produção, garantindo melhor qualidade do produto, maior segurança e otimização da produção, para maior economia do processo (Barral e Pereiralima, 2001).

Controlar um processo significa atuar sobre ele ou sobre as condições a que o processo está sujeito, de modo a atingir algum objetivo. Um processo sob controle automático permite a operação estável, atenuando perturbações que tendem a deslocar o ponto operacional desejado, garantido, condições de segurança, reprodutibilidade de operação e economia do processo. Um processo controlado pode ser genericamente definido como a integração de quatro elementos, conforme mostra a Figura 2.7.1 (Barral e Pereiralima, 2001).

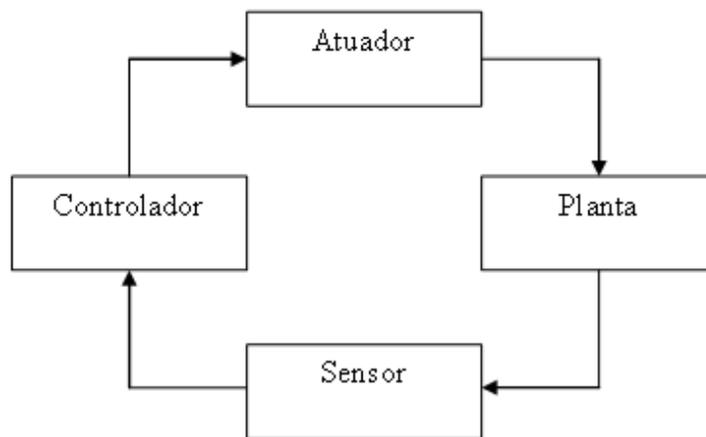


Figura 2.7.1 - Elementos de um sistema de controle (Barral e Pereiralima, 2001)

A ideia básica que envolve controle de processos é a medição de uma variável do processo para manipulação de alguma quantidade que alimente o processo em relação a algum valor de referência (*set-point*). Para tanto, existem duas estratégias básicas: (1) controle *feedback* ou controle por realimentação, constitui a forma mais utilizada de controle de processos, devido a simplicidade de acoplamento aos mais variados processos; (2) controle *feedforward*, uma estratégia de controle utilizada para casos específicos.

Na sequência será apresentada uma descrição da estratégia de controle *feedback* e também, será elucidado a estratégia de controle por matriz dinâmica (DMC). O texto a seguir foi extraído de Luyben (1989), Dechechi (1996) e Maciel Filho (2005).

2.7.1 Controle *feedback*

O princípio do controle *feedback* é estabelecer o desvio (ε), entre uma variável de saída de um processo (y), e um valor de referência (*set-point*). A partir deste desvio, manipular uma

variável (u) de forma que (ε) seja o menor possível. Assim, é possível distinguir duas variáveis essenciais: a variável medida (y) e a variável manipulada (u). O conceito de uma estratégia de controle *feedback* é representado na Figura 2.7.2.

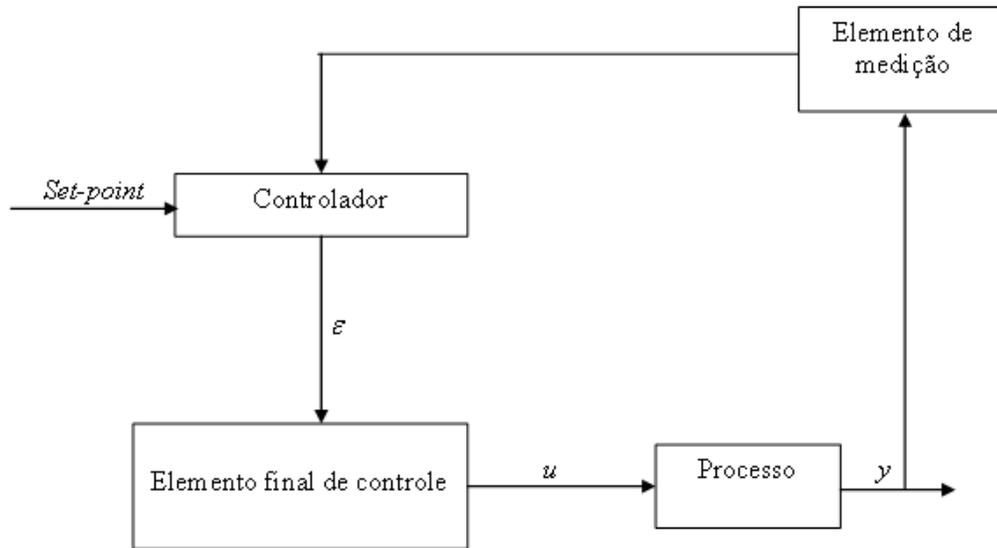


Figura 2.7.2 - Representação de um controle *feedback*

Existem três tipos básicos de controladores que são comumente usados em um controle *feedback*:

- Controlador Proporcional (P);
- Controlador Proporcional – Integral (PI);
- Controlador Proporcional-Integral-Derivativo (PID);

a) *Controlador Proporcional (P)*

A forma mais simples de controle contemplando a ideia que se um desvio do valor requerido se apresenta, então uma ação em proporção a este pode ser tomada desde que seja estabelecida uma proporcionalidade. Seu sinal de saída é proporcional ao erro,

$$c(t) = k_c \varepsilon(t) + c_s \quad (2.7.1)$$

Onde, k_c é o ganho proporcional do controlador e c_s é o sinal de bias do controlador, ou seja, o seu sinal de saída quando ($\varepsilon = 0$).

Um controlador proporcional é descrito pelo valor do seu ganho proporcional (k_c) ou pela sua banda proporcional ($BP = 100/k_c$). Quanto maior o ganho k_c ou, equivalentemente, quanto menor a sua banda proporcional, maior a sensibilidade do sinal de atuação $c(t)$ a desvios no erro $\varepsilon(t)$.

O ganho no controlador pode ser positivo ou negativo, através do ajuste de um interruptor em um controlador analógico ou um sinal específico desejado em um controlador digital.

Um ganho positivo resulta num decréscimo na saída do controlador, quando as medidas do processo aumentam. Esta ação de “aumento-redução” é chamada de ação reversa. Para um ganho negativo a saída de controlador aumenta quando a medida do processo aumenta, e esta ação é chamada de ação direta. O sinal correto depende da ação do transmissor, da ação da válvula e do efeito da variável manipulada na variável controlada.

Num controle *feedback* proporcional é possível ajustar o ganho do controlador para fazê-lo tão sensível quanto desejado ao erro; ajustar o sinal de k_c de forma que a saída do controlador aumente ou diminua quando o desvio aumenta.

b) Controlador Proporcional-Integral (PI)

O controlador PI incorpora a integral do erro ao longo do tempo, sendo também conhecido como *reset control* ou *floating control* por sua capacidade de eliminar o *off-set*. Ao adicionarmos a integral do erro, o controlador passa a não tolerar que um desvio do *set-point* seja mantido por muito tempo. Desta forma, elimina-se o problema do *off-set*. Contudo, apesar da capacidade de eliminar o *off-set*, este modo de controle reage lentamente a perturbações e então, é associado ao controle proporcional para formar o controlador proporcional-integral (PI). O sinal de saída do controlador está relacionado ao erro pela equação

$$c(t) = K_c \varepsilon(t) + \frac{K_c}{\tau_I} \int_0^t \varepsilon(t) dt + c_s \quad (2.7.2)$$

Onde, τ_I é a constante de tempo integral (*reset time*).

Em variável desvio:

$$c'(t) = K_c \varepsilon(t) + \frac{K_c}{\tau_I} \int_0^t \varepsilon(t) dt \quad (2.7.3)$$

Uma desvantagem do controle integral é que quando $\varepsilon(t)$ permanece por tempo suficiente para que a saída do controlador esteja saturada, o valor da integral continua a crescer mesmo após a saturação do elemento final de controle, o que induz a resposta do sistema a grandes *overshoot*.

c) *Controlador Proporcional-Integral-Derivativo (PID)*

O controle PID é também conhecido como controle antecipatório, onde se considera a tendência do erro ao longo do tempo com o intuito de prever o comportamento futuro do sistema.

A saída deste controlador é dada por:

$$c(t) = K_c \varepsilon(t) + \frac{K_c}{\tau_I} \int_0^t \varepsilon(t) dt + K_c \tau_D \frac{d\varepsilon}{dt} + c_s \quad (2.7.4)$$

Onde, τ_D é a constante de tempo derivativa.

Os maiores desafios desta a ação de controle estão relacionados ao fato que para uma resposta com erro diferente de zero, mas constante, não há ação de controle, já que $d\varepsilon/dt=0$ e também, para uma resposta com ruído e erro praticamente zero, derivadas grandes podem ser calculadas e logo a ação de controle será grande, embora não necessária.

A ação derivativa tira proveito da informação do processo que permite prever, em curto prazo, a tendência da variável de processo. Assim, ao observar que a variável está aumentando a ação derivativa atuará no sentido de reduzi-la, mesmo que o erro e a integral do erro apontam em outra direção. Desta forma, a ação derivativa torna a resposta do controlador mais rápida. A ação derivativa deve ser evitada em situações onde o erro varie bruscamente, em forma de degrau.

2.7.2 Controle por matriz dinâmica (DMC)

A técnica de controle avançado DMC (do inglês – *Dynamic Matrix Control*) se destaca devido a sua simplicidade de implementação/aplicação e clareza no processo de ajuste de parâmetros, bem como de suas excelentes capacidades de manipular restrições impostas às condições operacionais.

O DMC utiliza um modelo linear, chamado modelo de convolução, o qual é obtido diretamente do sistema a ser controlado, através de perturbações do tipo degrau nas variáveis de entrada (variáveis manipuladas e/ou perturbações medidas). Pode ser aplicado tanto em sistemas com uma única entrada e uma única saída (do inglês - *Single Input Single Output* – SISO) quanto em sistemas com múltiplas entradas e múltiplas saídas (do inglês - *Multiple Input Multiple Output* – MIMO).

A metodologia DMC caracteriza-se por ser uma metodologia digital e para tanto, utiliza-se de uma modelagem matemática dinâmica através de um modelo de convolução discreto que descreve o comportamento das variáveis de saída do processo.

O algoritmo DMC pode ser aplicado em processos químicos que podem ser descritos ou aproximados por um conjunto de equações diferenciais lineares. As propriedades mais importantes de sistemas lineares são:

- Preservação de escala: se (y) é a saída do processo para uma entrada (u) , então $(a.y)$ é a saída do mesmo para a entrada $(a.u)$.
- Sobreposição: se (y_1) é a saída do processo para uma entrada (u_1) e (y_2) é a saída para uma entrada (u_2) , então, $(y_1 + y_2)$ é a saída para uma entrada $(u_1 + u_2)$.

Estas propriedades são úteis para o desenvolvimento da metodologia DMC, onde se superpõem os efeitos das variáveis manipuladas sobre as variáveis controladas. Além disso, se é conhecida a resposta para um degrau de certa intensidade, tem-se a resposta para degrau de outra magnitude.

O algoritmo DMC se baseia no cálculo de NC (Horizonte de Controle) valores futuros da variável manipulada a partir da minimização de NP (Horizonte de Predição) valores futuros do quadrado da diferença entre o *set point* e a saída predita pelo modelo de convolução. Sendo que este é formado por NM (Horizonte de Modelo) valores da saída obtida a partir da resposta ao impulso ou ao degrau (Rezende, 2003).

O ($i^{\text{ésimo}}$) valor da variável de saída pode ser escrito pelo modelo de convolução de duas formas equivalentes, através dos coeficientes do modelo de convolução ou pelos elementos da matriz dinâmica A:

$$c_i = \sum_{k=1}^{NC} b_{i+1-k} \Delta m_k = \sum_{k=1}^{NC} a_{ik} \Delta m_k \quad (2.7.5)$$

A equação (2.7.5) descreve como (Δm_k) afeta a (*i*^{ésima}) saída (c_i), usando os coeficientes de resposta do modelo de convolução à perturbação do tipo degrau (b_{i+1-k}). O somatório dá o efeito de todos os horizontes de controle usando o princípio da sobreposição dos efeitos.

O projeto de um controlador DMC consiste em estimar os valores dos parâmetros de forma a permitir um melhor desempenho do controlador. Um deles é o horizonte de modelo (NM) que corresponde ao tempo de resposta em malha aberta para atingir 95-99% do estado estacionário.

O horizonte de predição (NP) é o número de predições que são usadas nos cálculos de otimização. Um aumento de NP resulta em uma ação de controle mais conservativa, a qual tem efeito estabilizante, mas também, aumenta o esforço computacional.

O horizonte de controle (NC) é o número de ações de controle futuras que são calculadas na otimização para reduzir erros preditos.

Segundo Seborg *et al.* (1989), uma recomendação é escolher NC igual ao tempo de resposta em malha aberta para atingir 60% do estado estacionário. Para $NC > 5$, o valor de NP não é tão crucial já que somente a primeira ação de controle é implementada. Contudo, um valor muito grande de NC resulta em excessiva ação de controle. Um valor pequeno de NC conduz a um controle robusto, relativamente sensível a erros de modelagem.

Do ponto de vista de controle, devem-se distinguir mudanças na variável manipulada no passado e no futuro. Se houveram NP mudanças na variável manipulada durante os NPs intervalos passados e se nenhuma outra mudança for feita, a variável de saída deverá mudar no futuro devido a estas mudanças passadas, feitas na variável de entrada.

Chamando estas mudanças passadas na variável de entrada de $(\Delta m)^{old}$, a resposta para estas mudanças passadas serão definidas como respostas em malha aberta (x_{ol}). Usando o modelo de convolução na forma dos coeficientes de resposta à perturbação do tipo degrau para prever esta resposta em malha aberta, $(\hat{c}_{ol,i})$, a equação resultante para representar os valores destas saídas preditas aos (*i*^{ésimos}) intervalos futuros é dado por

$$\hat{c}_{ol,i} = \sum_{k=0}^{-NP+1} b_{i+1-k} (\Delta m_k)^{old} \quad (2.7.6)$$

No instante presente de amostragem ($i = 0$) se pode ter a medida da saída do processo, (c_0^{medida}), então se o modelo adotado for perfeito, e melhor, se nenhum distúrbio ocorrer, o erro cometido entre o valor predito no instante passado e o valor atual medido deverá ser zero, o que não é o caso. A diferença entre os dois valores é então usada para corrigir o modelo dinamicamente, proporcionando uma melhor predição no futuro. O valor predito no atual tempo de amostragens é o ($\hat{c}_{ol,0}$) e é dado por:

$$\hat{c}_{ol,0} = \sum_{k=0}^{-NP+1} b_{1-k} (\Delta m_k)^{old} \quad (2.7.7)$$

A diferença entre a medida atual (c_0^{medida}) e o valor presente previsto ($\hat{c}_{ol,0}$) é adicionada no modelo ao ($i^{ésimo}$) período de amostragem para dar uma melhor predição da resposta em malha aberta.

$$\hat{c}_{ol,i} = \sum_{k=0}^{-NP+1} b_{i+1-k} (\Delta m_k)^{old} + c_0^{medido} - \hat{c}_{ol,0} \quad (2.7.8)$$

Substituindo a equação (2.7.7) na equação (2.7.8),

$$\hat{c}_{ol,i} = \sum_{k=0}^{-NP+1} b_{i+1-k} (\Delta m_k)^{old} + c_0^{medido} - \sum_{k=0}^{-NP+1} b_{1-k} (\Delta m_k)^{old} \quad (2.7.9)$$

Rearranjando, o modelo de convolução e corrigindo dinamicamente,

$$\hat{c}_{ol,i} = c_0^{medido} + \sum_{k=0}^{-NP+1} [b_{i+1-k} - b_{1-k}] (\Delta m_k)^{old} \quad (2.7.10)$$

A equação (2.7.10) é o modelo de convolução que prediz a resposta em malha aberta devido às mudanças passadas na variável manipulada (Δm_k)^{old} e que será utilizada nos cálculos do algoritmo DMC.

Da mesma forma, a modelagem pode ser empregada para prever o comportamento das variáveis de saída em malha fechada, sob ação de controle. A resposta em malha fechada considera os efeitos das modificações passadas da variável manipulada no futuro através da

resposta em malha aberta (x_{ol}), adicionados aos efeitos futuros das próprias variações futuras na variável manipulada, $(\Delta m_k)^{new}$.

A resposta em malha fechada será ($x_{cl,i}$) para o valor do ($i^{ésimo}$) intervalo no futuro, sendo descrita pela equação (2.7.11), a qual prediz o comportamento da variável da saída quando NC mudanças nas variáveis manipuladas atualmente calculadas forem feitas no futuro.

$$\hat{c}_{cl,i} = \hat{c}_{ol,i} + \sum_{k=1}^{NC} a_{ik} (\Delta m_k)^{new} \quad (2.7.11)$$

Outro critério para o projeto do controlador é escolher os valores dos parâmetros que minimizem o erro da resposta em relação ao *set-point* desejado. Esse é um critério de desempenho dinâmico baseado na resposta do processo como um todo, pois uma formulação utiliza a forma da resposta em malha fechada do tempo igual a zero até que o estado estacionário tenha sido atingido. Podem ser citados três critérios desta categoria:

1. Integral do erro ao quadrado (do inglês - *Integral of the Square Error* - ISE):

$$ISE = \int_0^{\infty} \varepsilon^2(t) dt \quad (2.7.12)$$

2. Integral do valor absoluto do erro (do inglês - *Integral of the Absolute value of Error* - IAE):

$$IAE = \int_0^{\infty} |\varepsilon(t)| dt \quad (2.7.13)$$

3. Integral do tempo vezes o erro absoluto (do inglês - *Integral of the Time-weighted Absolute Error* - ITAE):

$$ITAE = \int_0^{\infty} t |\varepsilon(t)| dt \quad (2.7.14)$$

Onde, $(\varepsilon(t) = y_{sp}(t) - y(t))$ é o desvio da resposta do *set-point* desejado.

A escolha dos critérios (1-3) apresentados anteriormente depende das características do sistema a ser controlado e de exigências impostas à resposta do processo controlado, considerando que:

- ISE é melhor do que IAE, quando se deseja evitar erros grandes no processo, pois os erros estão elevados ao quadrado e assim contribuem mais para o valor da integral.
- Para evitar pequenos erros, IAE é melhor que ISE, pois quando elevamos números pequenos ao quadrado eles se tornam menores ainda. Para evitar erros que persistem por longos tempos, o critério ITAE é o melhor, porque grandes tempos ampliam o efeito de erros mesmo pequenos no valor da integral. É importante ressaltar que diferentes critérios levam a diferentes projetos do controlador. Para um mesmo critério, diferentes mudanças na entrada também levam a diferentes projetos (Stephanopoulos, 1984).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA, T. M.; IKARASHI, A.; SAITO, Y.; WATANABE, M.; SMITH JR, R. L.; ARAI, K. Dehydration of lactic acid to acrylic acid in high temperature water at high pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 50, p. 257-264, 2009.
- AKEDO, M.; COONEY, C. L.; SINSKEY, A. J. Direct demonstration of lactate-acrylate interconversion in *Clostridium propionicum*. *Biotechnology*. v. 1, p. 791-794, 1983.
- ASTHANA, N.; KOLAH, A.; VU, D. T.; LIRA, C. T.; MILLER, D. J. A continuous reactive separation process for ethyl lactate formation. *Organic Process Research & Development*, v. 9, p. 599-607, 2005.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Salminen, S.; von Wright, A.; Ouwehand, A. 3th ed. Marcel Dekker Inc. New York, USA, 2004. Cap. 1, p. 1-66.
- BACK, T.; SCHWEFEL, H. P. An overview of evolutionary algorithms for parameter optimization. *Evolutionary Computation*, v. 1(1), p.1-23, 1993.
- BAILEY, J. E. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnology Progress*, v.14, p. 8-20, 1998.
- BAJAY, S. V.; FERREIRA, A. L. (2005). A Energia da Biomassa no Brasil. In: Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira. Calle, F. R.; Bajay, S. V.; Rothman, H. Editora da UNICAMP, Campinas, SP, 2005, cap. 2.
- BARRAL, M. F.; PEREIRALIMA, P. S. (2001). Automação e controle de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. Editora Edgar Blücher Ltda, São Paulo, SP, 2001, v. 2, Cap.18, p. 411.
- BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica. Workshop Etanol. Disponível em: [www.apta.sp.gov.br/.../Workshop Etanol sessao%202 Luiz%20Basso.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/.../Workshop_Etanol_sessao%202_Luiz%20Basso.pdf). Acessado em: junho de 2010.

- BENNINGA, H. A. A history of lactic acid making. *Kluver Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands, 1-61, 1990.
- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. Editora Edgar Blücher Ltda, São Paulo, SP, 2001, v. 2, Cap.7, p.123-178.
- BRAUNBECK, O. A.; CORTEZ, L. A. B. (2005). O cultivo da cana-de-açúcar e o uso dos resíduos. In: *Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira*. Calle, F. R.; Bajay, S. V.; Rothman, H. Editora da UNICAMP, Campinas, SP, 2005, cap. 5.
- BROCKINTON, L.; SAVAGE, P.; HUNTER, D. Acrylic acid capacity expands worldwide. *Chemical Week*, October, 1986.
- BUMBAC, G.; PLESU, A. E.; PLESU, V. Reactive distillation process analysis in a divided wall column. *17th European Symposium on Computer Aided Process Engineering*. Elsevier B. V., 2007, p. 1- 8.
- CARVALHO, E. P. (2004). In: *Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira*. Calle, F. R.; Bajay, S. V.; Rothman, H. Editora da UNICAMP, Campinas, SP, 2005, cap. 5, p. 217.
- CHAKRABARTI, A.; SHARMA, M. M. Cationic íon Exchange resins as catalyst. *Reactive Polymers*, v. 20, p. 1-45, 1993.
- CHERUBIN, R. A. Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Tese (doutorado). ESALQ/USP, Piracicaba, SP, 2003.
- CHUBAROV, G. A.; DANOV, S. M.; LOGUTOV, V. I.; OBMELYUKHINA, T. N. Esterification of acrylic acid with methanol. *Journal of Applied Chemistry of the USSR*, v. 57, n. 1, p. 203-205, 1984.
- COSTA, V. M. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP, 2006.

- DANNER, H.; URMÖS, M.; GARTNER, M.; BRAUN, R. Biotechnological Production of Acrylic Acid from Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70, n. 2, p. 887-894, 1998.
- DASSY, S.; WIAME, H.; THYRION, F. C. Kinetics of the liquid phase synthesis and hydrolysis of butyl lactate catalysed by cation exchange resin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 59(2), p. 149-156, 1994.
- DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 81(7), p. 1119-1129, 2006.
- DATTA, R.; TSAI, S. P. Technology and economic potential of poly-lactic acid and lactic acid derivatives. *Journal of FEMS Microbiology Review*, v. 16, p. 221-231, 1995.
- DECHECHI, E. C. Controle DMC de um processo de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. *Tese (Doutorado)*, FEQ/UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
- FALBE, J. REBITZ, M., RÖMPP, H. *Röpp Chemie Lexikon*, Thieme, Stuttgart, 1995.
- FREDRICKSON, A. (1970) citado por BAILEY, J. E. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnology Progress*, v. 14, p. 8-20, 1998.
- GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. *Tese (doutorado)*. FEA/UNICAMP, Campinas, SP, 1990.
- GERSHENFELD, N. A. (1999) citado por GOMBERT, A. K.; NIELSEN, J. Mathematical modelling of metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 180-186, 2000.
- GILLILAND, S. E. (1985) citado por ZANNINI, E.; SANTARELLI, S.; OSIMANI, A.; DELL'AQUILA, L.; CLEMENTI, F. Effect of process parameters on the production of lactic acid bacteria in batch fermentation. *Annals of Microbiology*, v. 55(4), p. 273-278, 2005.
- GOLDBERG, D. E. *Genetic algorithms in search, optimization and machine learning*. Addison Wesley Publishing Company, USA, 1989.
- GOMBERT, A. K.; NIELSEN, J. Mathematical modeling of metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 180-186, 2000.

- GONÇALVES, L. M. D.; RAMOS, A.; ALMEIDA, J. S.; XAVIER, A. M. R. B.; CARRONDO, M. J. T. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, p. 346-350, 1997.
- HEINZLE, E.; SANER, U. (1991) citado por BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. Editora Edgar Blücher Ltda, São Paulo, SP, 2001, v. 2, Cap.7, p. 124.
- HIMMELBLAU, D. M.; EDGAR, T. F.; LASDON, L. S. *Optimization of chemical process*. 2^a. ed. New York: McGraw Hill, 2001.
- HISS, H. (2001). Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. Editora Edgar Blücher Ltda, São Paulo, SP, 2001, v. 2, Cap.6, p.107-108.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 87-107, 2000.
- HOLLAND, J. H. Adaptation in natural and artificial systems: an introductory analysis with applications to biology, control and artificial intelligence. *MIT Press*, Cambridge, USA, 1992.
- HOLMEN, R. E. Acrylates by catalytic dehydration of lactic acid and acrylates. *U. S. Pat. N.* 2859240, 1958.
- HOLTEN, C. H. Lactic acid: properties and chemistry of lactic acid and derivatives. *Weinheim: Chemie*, 1971
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Some chemicals used in plastics and elastômeros. *IARC Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, v. 39(7), p. 81-98, 1986.
- JÄRVINAN, M., MYLLYKOSKI, L., KEISKI, R., SCHLO, J. Separation of lactic acid from fermented broth by reactive extraction. *Bioseparation*, v. 9, p. 163 – 166, 2000.

- JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied in Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 524-534, 2007.
- KOCH, A. L. The Monod model and its alternatives. In: Koch, A. L.; Robinson, J.; Milliken, G. A. (Eds). *Mathematical modeling in microbial ecology*. Chapman and Hall, New York, p. 62-93, 1997.
- KOVAROVA-KOVAR, K.; EGLI, T. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62(3), p. 646-666, 1998.
- KOZA, J. R. Genetic programming. *Encyclopedia of Computer Science and Technology*, 1997, p. 1-26.
- KURLAND, J. J.; BRYANT, D. B. Shipboard polymerization of acrylic acid. *Plant Operations Progress*, v. 6(4), p. 203-207, 1987.
- KUMAR, R.; MAHAJANI, S. M.; NANAVATI, H.; NORONHA, S. B. Recovery of lactic acid by batch reactive distillation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 81, p. 1141-1150, 2006.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. Transient and steady states in continuous fermentation theory and experiment. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1(4), p. 431-459, 1959.
- LUYBEN, W. L. Distillation design and control using AspenTM simulation. John Wiley & Sons, Inc., 2006, Cap. 9, p. 232-250.
- LUYBEN, W. L. *Process modeling, simulation and control for chemical engineers*. 2a.ed., McGraw-Hill International Edition, 1989.
- MACIEL FILHO, R. *Apostila de Controle de Processos*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.
- MARTIN, A. (1996) Fermentation processes for the production of lactic acid. In: *Lactic acid bacteria*. BOZOGLU, T.; RAY, B. New York: Springer, p. 25-31, 1996.

- MARTINEZ-GONZÁLEZ, Y.; QUIROZ-CAMACHO, M. H.; LEDESMA-PEREZ, A. S.; JARAMILLO-CORONADO, J. C. Production of lactic acid from pretreated molasses using *Lactobacillus delbrueckii*. *Revista Latino- Americana de Microbiologia*, v. 30, p. 209-214, 1988.
- MEHTA, R. Modeling and simulation of poly(lactic acid) polymerization”, *Thesis (PhD)*, Thapar Institute of Engineering and Technology, India, 2006.
- MENDES, P.; KELL, D. B. Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics*, v. 14(10), p. 869-883, 1998.
- MOLINA, D. K. Esterificação direta de butenos com ácido acético em fase líquida. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews*, v. 3, p. 371-394, 1949.
- MONTEAGUDO, J. M.; RODRÍGUEZ, L.; RINCÓN, J.; FUERTES, J. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 68(3), p. 271-276, 1997.
- MONTESINOS, J. L.; LAFUENTE, J.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; SOLÀ, C. Structured modeling and state estimation in a fermentation process: lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 573-584, 1995.
- 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.
- NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *J. Biotechnol.* v. 7, n. 2, 2004. ISSN: 0717-3458. Disponível em: www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue2/full/7/. Acessado em: março de 2008.

- NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of Lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63(11), p. 4158-4163, 1997.
- NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71(5), p.2239-2243, 2005.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Modelling of microbial kinetics, review. *Chemical Engineering Science*, v. 47, p. 4225-4270, 1992.
- O'BRIEN, D. J.; PANZER, C. C.; EISELE, W. P. Biological Production of Acrylic Acid from cheese whey by resting cells of *Clostridium propionicum*. *Biotechnology Progress*, v. 6, p. 237-342, 1990.
- OH, H.; WEE, Y. J.; YUN, J. S.; RYU, H. W. Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 107, p. 603-613, 2003.
- OLIVA NETO, P. Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. Tese (doutorado). FEA/UNICAMP, Campinas, SP, 1995.
- OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 25-31, 1997.
- PAPARIZOS, C.; DOLHYJ, S.; SHAW, W. G. Catalytic conversion of lactic acid and ammonium lactate to acrylic acid. *U. S. Pat.N.* 4786756, 1988.
- PARK, E. Y.; KOSAKAI, Y.; OKABE, M. Efficient production of L(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. *Biotechnol. Prog.* v.14, p. 699–704, 1998.
- PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. Chemical Engineers' Handbook. *Mc-Graw-Hill Kogakusha Ltda*, 5ª ed., Tokyo, 1973.

- PINCHUK, R. J.; BROWN, W. A.; HUGHES, S. M.; COOPER, D. G. Modeling of biological processes using self-cycling fermentation and genetic algorithms. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 67(1), p. 19-24, 2000.
- PIRT, S. J. Principles of microbe and cell cultivation. *Blackwell Scientific Publications Inc.* California, 1975.
- PONDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAN, P. Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. *Asiatech Publishers*, New Delhi, 2001.
- REZENDE, M. C. A. F. Controle e otimização de um reator de hidrogenação trifásico. Dissertação (Mestrado). FEQ/UNICAMP, Campinas, SP, 2003.
- ROELS, J. A. Energetics and kinetics in biotechnology. *Elsevier Biomedical Press*, New York, USA, 1983.
- SAWICKI, R. A. Catalyst for dehydration of lactic acid to acrylic acid. *U. S. Pat. N.* 4729978, 1988.
- SEBORG, D. E.; EDGAR, T. F.; MELLICHAMP, D. A. *Process Dynamics and Control*, John Wiley & Sons, Inc., 1989.
- SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; KAUL, M. R. Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55(6), p.841-853, 1997.
- SEO, Y.; HONG, W. H. Kinetics of esterification of lactic acid with methanol in the presence of cation exchange resin using pseudo-homogeneous model. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 33(1), p. 128-133, 2000.
- SHARMA, M. M.; MAHAJANI, S. M. (2003) In: K. SUNDMACHER, A. KIENLE. *Reactive distillation: Status and future directions*. WILEY-VCH, Germany, 2003, p. 26-27.
- SINGH, S. K.; AHMED, S. U.; PANDEY, A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 991-1000, 2006.
- SODERGARD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, v. 27(6), p. 1123-1163, 2002.

- STEPHANOPOULOS, G. *Chemical process control: an introduction to theory and practice*. Prentice Hall, 1984.
- STOYANOV, S. Robust multiple-input-multiple-output control of non-linear continuous fermentation processes. *Bioprocess Engineering*, v. 23, p. 309-314, 2000.
- STRAATHOF, A. J. J.; SIE, S.; FRANCO, T. T.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Feasibility of acrylic acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, p. 727-734, 2005.
- STRIGUL, N.; DETTE, H.; MELAS, V. B. A practical guide for optimal designs of experiments in the Monod model. *Environmental Modelling & Software*, v. 24(9), p. 1019-1026, 2009.
- TANAKA, K.; YOSHIKAWA, R.; YING, C.; KITA, H.; OKAMOTO, K. Application of zeolite T membrane to vapor-permeation-aided esterification of lactic acid with ethanol. *Chemical Engineering Science*, v. 57(9), p. 1577-1584, 2002.
- TAY, A.; YANG, S. T. Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, p. 1-12, 2002.
- TROUPE, R. A., DIMILLA, E. Kinetics of the ethyl alcohol-lactic acid reaction. *Chem. Proc.* V. 49(5), p. 847-855, 1957.
- TUCHLENSKI, A.; BECKMANN, A.; REUSCH, D.; DÜSSEL, R.; WEIDLICH, U.; JANOWSKY, R. Reactive distillation – industrial applications process design & scale-up. *Chemical Engineering Science*, v. 56, p. 387-394, 2001.
- UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Cana-de-açúcar processada pelas usinadas brasileiras. Disponível em: www.unica.com.br. Acessado em: 05/05/2010.
- US Patent n^o 6.475.759 BI. Low pH lactic acid fermentation.
- VAZ, A. I. F. *Otimização semi-infinita*. Departamento de Produção e Sistemas, Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Disponível em: http://www.norg.uminho.pt/aivaz/binaries/aulas/slides_apresenta.pdf. Acessado em: dezembro de 2006.

- VERSYCK, K. J.; CLAES, J. E.; VAN IMPE, J. F. Practical identification of unstructured growth kinetics by application of optimal experimental design. *Bioetchnology Progress*, v. 13, p. 524-531, 1997.
- VICKROY, T. B. (1985). Lactic acid. In: *Comprehensive biotechnology*. MOO-YOUNG, M. (Ed). Pergamon Press, New York, 1985. p. 761-776.
- VICTORINO, I. R. S. Otimização de um reator industrial de produção de álcool cíclico utilizando algoritmos genéticos. *Tese (Doutorado)*. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.
- VOLESKY, B.; VOTRUBA, J. *Modeling and optimization of fermentation processes*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992.
- VU, D. T.; LIRA, C. T.; ASTHANA, N. S.; KOLAH, A. K.; MILLER, D. J. Vapor-liquid equilibria in the systems ethyl lactate + ethanol and ethyl lactate + water. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 51(4), p. 1220-1225, 2006.
- WASEWAR, K. L. Separation of lactic acid: recent advances. *Chemical and Biochemical Engineering*, v. 19(2), p. 159 – 172, 2005.
- WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44(2), p. 163-172, 2006.
- XU, X.; LIN, J.; CEN, P. Advances in the research and development of acrylic acid production from biomass. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 14(4), p. 419-427, 2006.
- YADAV, G. D.; KULKARNI, H. B. Ion-exchange resin catalysis in the synthesis of isopropyl lactate. *Reactive and Functional Polymers*, v. 44(2), p. 153-165, 2000.
- YEH, P. L. H.; BAJPAI, R. K.; IANNOTTI, E. L. An improved model for lactic acid fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 71(1), p.75-77, 1991.
- ZHANG, J.; LIN, J.; CEN, P. Catalytic dehydration of lactic acid to acrylic acid over sulfate catalysts. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 86, p. 1047-1053, 2008.

CAPÍTULO III

Seleção e Identificação do Microrganismo

Neste capítulo serão apresentadas as etapas de seleção e identificação do microrganismo utilizado na produção de ácido láctico. A seleção de um microrganismo é uma das etapas mais importantes a fim de desenvolver um processo eficiente e economicamente viável. A seleção não se restringe apenas na escolha de um microrganismo que forneça altos rendimentos e produtividade, mas também na escolha de um microrganismo com capacidade de fermentar matéria-prima barata e transformá-la em produto de valor agregado.

3.1 Seleção da Cepa Bacteriana

Inicialmente foram selecionadas, aleatoriamente, sessenta cepas bacterianas, pertencentes ao banco de culturas do Centro de Tecnologia Canavieira de Piracicaba (CTC). As cepas foram isoladas de diferentes usinas de açúcar e álcool do estado de São Paulo, as quais foram coletadas em dornas de fermentação, mosto e fermento tratado. Esta seleção teve como objetivo encontrar uma cepa, contaminante da fermentação alcoólica, para produção de ácido láctico a partir da sacarose. As cepas foram divididas em dois grupos, sendo cada grupo formado por 30 cepas, e avaliadas em duas etapas.

Cada uma das sessenta cepas foi semeada em placa de petri com meio ágar MRS (*Man-Rogosa-Sharpe*) para ativação, bem como, para avaliar a presença ou não de diferentes colônias em uma mesma cultura. Foi usada a técnica de semeadura de bactérias por estrias de esgotamento, buscando obter colônias isoladas em meio sólido. Com uma alça de semeadura bacteriológica, esterilizada por flambagem, foi retirada uma amostra da cultura e espalhada sobre a placa em forma de estrias em posições perpendiculares uma das outras. A semeadura foi realizada em câmara de fluxo laminar. Depois de semeadas, as placas foram identificadas com o número de cada amostra (nº 1 a 60) e com o nome da usina de onde foram coletadas (Figura

3.1.1), em seguida incubadas durante 48h a 35 °C. Depois do período de incubação as cepas foram avaliadas em relação ao isolamento das colônias e, caracterizadas em relação à cor (amarelada, branca, opaca, translúcida), tamanho e forma (circular, puntiforme, irregular), conforme mostra Figura 3.1.2.



Figura 3.1.1 - Semeadura por estria de esgotamento: identificação das amostras



Figura 3.1.2 - Semeadura por estria de esgotamento: caracterização das colônias

Depois de isoladas e identificadas as colônias, em relação a cor, forma e tamanho, foram avaliadas em meio líquido em relação a capacidade fermentativa, produção de gás (CO₂) e forma de crescimento (superfície, fundo, parede).

Foi preparado meio de cultivo MRS para inoculação das cepas. A composição do meio é apresentada na Tabela 3.1.1. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. As cepas foram inicialmente semeadas em meio MRS ágar e incubadas durante 48h, em seguida, inoculadas no meio de cultura MRS líquido e incubadas por mais 48h a 35 °C.

Tabela 3.1.1 - Composição do meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe)

Meio sintético MRS (Marca- <i>Acumedia</i>) para cultivo de <i>Lactobacillus</i> (Composição aproximada (g/L))	
Digestão enzimática de tecido animal	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Dextrose	20
Acetato de sódio	5
Polisorbato 80 (Tween 80)	1
Fosfato de sódio	2
Citrato de amônia	2
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de manganês	0,05
Ágar	15
pH final	6,5 ± 0,2 à 25 °C

Meio de cultura sintético (composição apresentada na Tabela 3.1.2) foi preparado, variando a fonte de carbono (sacarose, frutose e glicose). O meio foi dividido em 180 tubos com 10 mL de meio em cada tubo. Para determinação da produção de CO₂ foi colocado um tubo de Durham invertido em cada tubo, conforme Figura 3.1.3. Os tubos com meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Tabela 3.1.2 - Composição do meio sintético

Composição	Quantidade (g/L)
Caseína	5
Extrato de levedura	4
Substrato (frutose/glicose/sacarose)	50
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,55
Cloreto de potássio (KCl)	0,425
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,125
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,125
Sulfato de manganês (MnSO ₄)	0,0025
Sulfato ferroso (FeCl ₂)	0,0025
Verde bromocresol (indicador de pH)	0,022

**Figura 3.1.3** - Tubo de Durahm para determinação de produção de CO₂

O pH inicial dos meios foi medido com auxílio de um phmetro, marca Metrohm, modelo 827. Os valores de pH inicial dos meios com sacarose, frutose e glicose foram $6,33 \pm 0,03$, $5,03 \pm 0,04$ e $5,35 \pm 0,01$, respectivamente. Na sequência, 1 mL de cada amostra bacteriana (meio MRS)

foi inoculado em cada um dos três meios de cultura. Após inoculação, os tubos foram pesados e incubados durante 48h a 35 °C.

Depois do tempo de incubação, foram avaliadas as características de crescimento (floculante, fundo, parede, superfície) e produção de gás. A produção de gás foi avaliada pelo gás coletado no tubo de Durham, expulsando o líquido e, deixando a extremidade superior do tubo transparente, cheia de gás. A produção de ácido foi avaliada pela viragem de cor do meio de verde (indicador verde bromocresol) para amarelo e redução do pH, conforme Figura 3.1.4. O pH final das 180 amostras avaliadas são apresentados na Tabela A.1 no Apêndice A.

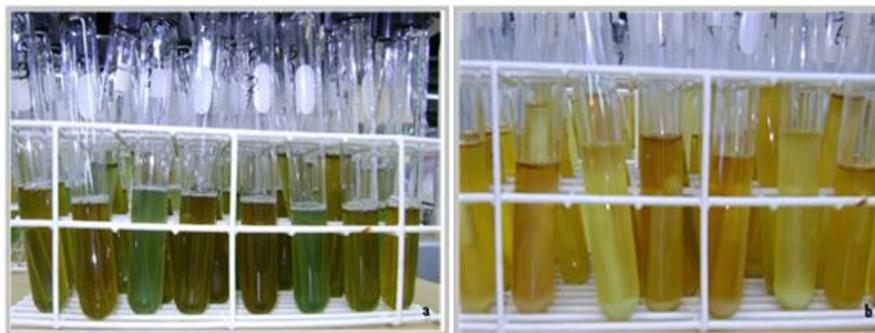


Figura 3.1.4 - Meios de cultivo ((a)após inoculação; (b) após 48h de incubação)

A densidade óptica (avaliação de turbidez) foi determinada através de um espectrofotômetro, marca Hatch, modelo DR 5000. O comprimento de onda (absorbância) usado foi de 660 nm. Este método de avaliação da turbidez é um método rápido, porém, indireto, pois, não permite distinguir entre células viáveis e mortas.

Depois de medido o pH e a densidade óptica, as 180 amostras foram centrifugadas em uma centrífuga, marca *Excelsa Baby*, modelo 208N, à 6000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi usado para determinação da concentração de ácido láctico e o precipitado foi descartado.

A concentração do ácido láctico foi determinada com auxílio de um lactímetro, marca *Roche*, modelo Accutrend Lactate e fitas reagentes de lactato (*BM Accutrend lactate*). Nas fitas reagentes existe uma zona de teste com reagentes de detecção, onde é inserido 50 µL da amostra a ser analisada. O lactímetro identifica apenas a concentração do isômero L(+) do ácido láctico produzido.

L(+)-ácido láctico é determinado por fotometria de reflexão com um comprimento de onda de 657 nm numa reação colorimétrica através de um mediador de *lactato-oxidase*. A partir dos resultados obtidos nas análises usando lactímetro, se percebeu a produção de L(+) ácido láctico por todas as bactérias estudadas, porém em diferentes quantidades. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela A.2 no Apêndice A.

A partir dos resultados obtidos nesta primeira etapa foram selecionadas as três melhores cepas, considerando produção de L(+)- ácido láctico, capacidade de fermentação de sacarose, características de crescimento e produção de CO₂. As três cepas selecionadas foram identificadas como cepas nº 7, 25 e 27. Duas destas cepas pertenciam ao primeiro grupo de cepas estudadas e uma ao segundo grupo.

A fim de determinar a concentração de ácido láctico total produzido por cada uma das três cepas, foram realizadas análises em cromatografia líquida das amostras das respectivas cepas. Foi usado um sistema de cromatografia líquida, marca Waters, equipado com detector de índice de refração (RI) e Ultravioleta (UV/Vis) e uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H. Solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM foi usada como eluente com vazão de 0,5 mL/min. Nas três amostras analisadas foi constatada a presença de ácido acético, que pode ter sido produzido pela falta de controle de pH. A Tabela 3.1.3 apresenta os rendimentos de ácido láctico obtidos pelas diferentes cepas. O rendimento foi determinado pela equação 3.1.1.

$$Y_{LA/S} = \frac{LA_f - LA_0}{S_0 - S_f} \times 100 \quad (3.1.1)$$

Onde, $Y_{LA/S}$ – rendimento de ácido láctico (g_{LA}/g_S); LA_0 – concentração inicial de ácido láctico (g/L); LA_f – concentração final de ácido láctico (g/L); S_0 - a concentração inicial de sacarose (g/L); S_f – concentração final de sacarose (g/L).

Tabela 3.1.3 – Rendimento de ácido láctico

Cepas	Rendimento (%)
7	51,53
25	74,08
27	58,51

Para finalizar esta primeira etapa de seleção bacteriana, foram feitos testes de coloração de gram das três cepas (7, 25 e 27) bem como a contagem de células, através da técnica de contagem por diluição de amostras.

A coloração de Gram é um método de coloração de bactérias desenvolvido por Hans Christian Joachim Gram e consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, usando cristal violeta, lugol, etanol-acetona e safranina (contracorante) como reagentes. Este método permite a separação de amostras bacterianas em Gram-positivas e Gram-negativas e a determinação da morfologia e do tamanho das amostras analisadas (Tortora *et al.*, 2002).

A coloração de Gram utiliza características diferenciais das células bacterianas. Estas características se referem à estrutura da parede celular das bactérias. As bactérias que contêm altos teores de ácido teicóico em sua parede celular se coram, pela coloração de Gram, em violeta e são chamadas de Gram-positivas. As bactérias que contêm lipopolissacarídeos na membrana externa somente se coram com o contracorante (safranina), mostrando-se da cor vermelha, e são denominados Gram-negativas. As células de microrganismos Gram-positivas provenientes de culturas velhas, lesadas também podem ser coradas pela safranina (Tortora *et al.*, 2002). A Figura 3.1.5 apresenta os resultados obtidos pelo método de coloração de Gram.

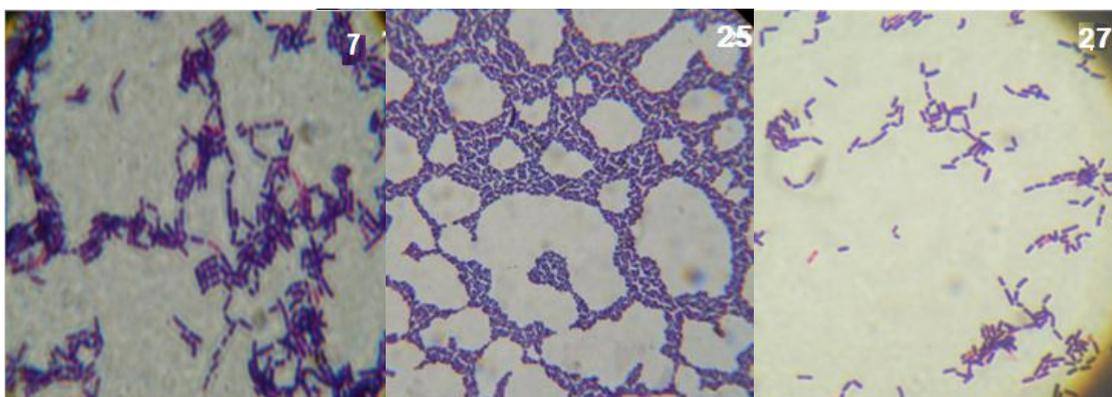


Figura 3.1.5 - Coloração de Gram

A contagem das células foi realizada através de diluições decimais (10^{-5} a 10^{-9}) de cada amostra em água destilada. Em seguida, um mililitro (1 mL) de cada diluição foi espalhado em placa de Petri, e adicionado meio de cultura MRS ágar sobre as placas. As placas foram fechadas e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Depois do tempo de incubação foi selecionada a melhor diluição para ser usada na contagem de células. Geralmente, placas com 25 a 250 colônias são usadas (Tortora et al., 2002). A contagem das células foi feita em Câmara de Neubauer e quantificadas como unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL). Como cada colônia supostamente se originou da multiplicação de um único indivíduo, o resultado da contagem das colônias multiplicado pelo fator de diluição é a estimativa do número de microrganismos presentes em 1 mL da cultura original. A Figura 3.1.6 ilustra a técnica de contagem por diluição e a Figura 3.1.7 mostra as placas de Petri com as amostras usadas na contagem das UFC. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.1.4.

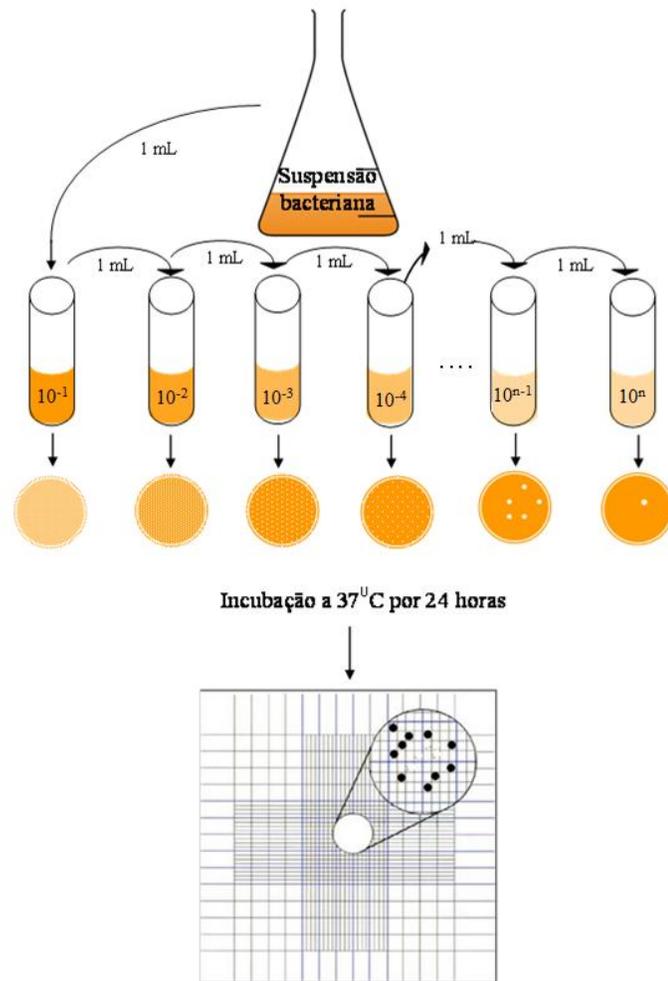


Figura 3.1.6 - Técnica de contagem de células por diluição

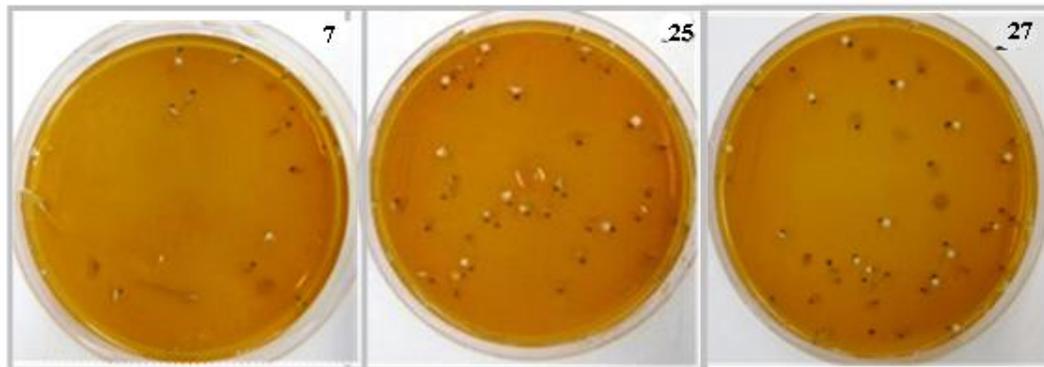


Figura 3.1.7 - Contagem de células por diluição

Tabela 3.1.4 – Unidades formadoras de colônia

Cepas	Diluição	UFC/mL
25	10 ⁻⁸	3,9 X 10 ⁹
27	10 ⁻⁸	4,1 X 10 ⁹
7	10 ⁻⁸	1,7 X 10 ⁹

3.2 Seleção da Melhor Cepa e Otimização do Meio de Cultivo

Como objetivo de selecionar uma única cepa para a produção de ácido láctico, bem como otimizar o meio de cultivo a fim de obter alto rendimento e alta concentração de produto, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2⁴⁺¹ em duplicata com um ponto central para cada cepa, a saber, 7, 25 e 27.

Os ensaios foram desenvolvidos em Shaker agitado a 200 rpm. Cada planejamento foi composto por nove ensaios, resultando em um total de cinquenta e quatro ensaios. As amostras foram coletadas no início do processo, em 24h e 48h para determinação de pH, densidade óptica (crescimento celular) e concentração de ácido láctico.

Ácido láctico, bioproductos (etanol e ácido acético) e sacarose residual foram quantificados por análise em HPLC (do inglês - *High Performance Liquid Chromatography*), marca Varian, modelo 9010. Foi usado detector UV/Vis ($\lambda = 215 \text{ nm}$) para identificar ácidos orgânicos e índice de refração para açúcar e etanol e uma coluna cromatográfica marca Bio-Rad modelo HPX 87H a 37 °C.

A fase móvel usada foi solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM. A solução foi filtrada em membrana Millipore 45 µm de diâmetro e desgaseificada em banho de ultra-som durante 30 minutos para evitar a formação de bolhas, as quais podem danificar a bomba injetora ou até mesmo gerar picos falsos ao passar pelo detector.

Inicialmente, foi realizada análise qualitativa através da comparação do tempo de retenção das amostras padrões e das amostras experimentais. Em seguida foram realizadas as análises quantitativas das amostras. A concentração dos componentes da solução foi determinada a partir de uma curva de calibração.

Para obtenção da curva de calibração foi preparada uma solução padrão (coquetel) de sacarose (20 g/L), glicose (10 g/L), frutose (10 g/L), etanol (10 g/L), ácido acético (10 g/L) e DL-ácido láctico (Sigma Aldrich) (10 g/L). Esta solução foi dividida em oito alíquotas que foram diluídas na faixa de 1:2 a 1:40 e analisadas para determinação da área e do tempo de retenção de cada componente. De posse dos valores das áreas correspondentes a cada concentração da solução padrão, foram construídas as curvas para os componentes e determinada as equações da reta, que foram usadas para determinar a concentração de ácido láctico, ácido acético, etanol e açúcares presentes em cada amostra, a partir das áreas obtidas.

No planejamento fracionário 2^{4-1} foram avaliadas as influências da temperatura, concentração inicial de sacarose, extrato de levedura e de fosfato de potássio sobre o rendimento de ácido láctico. A Tabela 3.2.1 apresenta os fatores avaliados no planejamento e seus valores. A Tabela 3.2.2 apresenta a matriz codificada dos valores dos fatores avaliados no planejamento 2^{4-1} .

Tabela 3.2.1 – Fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (1)
Temperatura – T (°C)	35,0	38,0	40,0
Sacarose – S ₀ (g/L)	40,0	50,0	60,0
Extrato de levedura (g/L)	2,0	4,0	6,0
Fosfato de potássio– KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,35	0,55	0,75

Tabela 3.2.2 – Matriz codificada dos fatores

Ensaio	T (°C)	S ₀ (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que o tempo para a obtenção do rendimento máximo de ácido láctico em um processo sem controle de pH é de 48 horas. As Tabelas 3.2.3 (a-c) apresentam os rendimentos obtidos nos nove ensaios do planejamento fracionário durante 48 horas de processo, usando as cepas 7, 25 e 27, respectivamente.

O rendimento de ácido láctico foi determinado pela equação (3.1.1).

$$Y_{LA} = \frac{LA_f - LA_0}{S_0 - S_f} \times 100 \quad (3.1.1)$$

Tabela 3.2.3a – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 7

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)
Rendimentos	5,1	3,9	3,5	2,6	20,5	5,7	3,8	3,6	5,6
	4,3	3,8	4,2	2,7	21,2	5,2	5,2	2,6	3,7
Média	4,8	3,8	3,8	2,7	20,8	5,5	4,5	3,1	4,6
Desvio padrão	0,8	0,1	0,5	0,1	0,5	0,4	1,0	0,7	1,4

Contrastes	1=234 (1 = T)	2=134 (2 = S)	3=124 (3 = Ext.)	4=123 (4 = KH ₂ PO ₄)	12=34	13=24	14=23
	-5,5	-6,0	5,5	4,3	4,3	-4,4	-4,9

Tabela 3.2.3b – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 25

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)
Rendimentos	22,7	7,4	14,2	4,9	22,4	6,6	22,7	3,6	21,0
	26,8	7,0	21,1	3,7	25,5	9,5	20,2	4,8	20,8
Média	24,7	7,2	17,5	4,3	23,9	8,0	21,5	4,2	20,9
Desvio padrão	2,8	0,3	4,9	0,8	2,2	2,1	1,8	0,8	0,1

Contrastes	1=234 (1 = T)	2=134 (2 = S)	3=124 (3 = Ext.)	4=123 (4 = KH ₂ PO ₄)	12=34	13=24	14=23
	-16,0	-4,1	0,9	-1,4	0,7	-0,6	0,9

Tabela 3.2.3c – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 27

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)
Rendimentos	23,5	4,5	17,4	2,4	23,7	7,0	16,7	2,9	21,7
	17,1	3,9	19,2	2,8	23,6	9,3	13,8	4,7	20,5
Média	20,1	4,2	18,3	2,6	23,7	8,2	15,3	3,9	21,1
Desvio padrão	4,5	0,4	0,9	0,3	0,1	1,6	2,1	1,3	0,8

Contrastes	1=234 (1 = T)	2=134 (2 = S)	3=124 (3 = Ext.)	4=123 (4 = KH ₂ PO ₄)	12=34	13=24	14=23
	-14,7	-4,1	1,4	0,9	1,1	1,2	-2,3

No planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foram realizados nove ensaios, sendo um ensaio relacionado ao ponto central, o que possibilita a estimação de apenas oito grandezas independentes. Portanto, não será possível determinar os efeitos das seis interações separadamente, assim, se ignorou o efeito de três interações, a saber, 14, 24, 34, que são idênticas as interações 23, 13 e 12, respectivamente.

As respostas obtidas com a realização do planejamento fatorial fracionário foram analisadas com o auxílio do Software STATISTICA 7, possibilitando a determinação dos efeitos dos fatores sobre o rendimento de ácido láctico obtido usando as cepas 7, 25 e 27.

As Figuras 3.2.1(a-c) apresentam os gráficos de Pareto dos efeitos, onde é possível visualizar os efeitos da temperatura, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e fosfato de potássio e das interações entre temperatura e concentração de sacarose, temperatura e concentração de extrato de levedura, concentração de sacarose e concentração de extrato de levedura sobre o rendimento de ácido láctico após 48 horas de processo, para um intervalo de confiança de 95%.

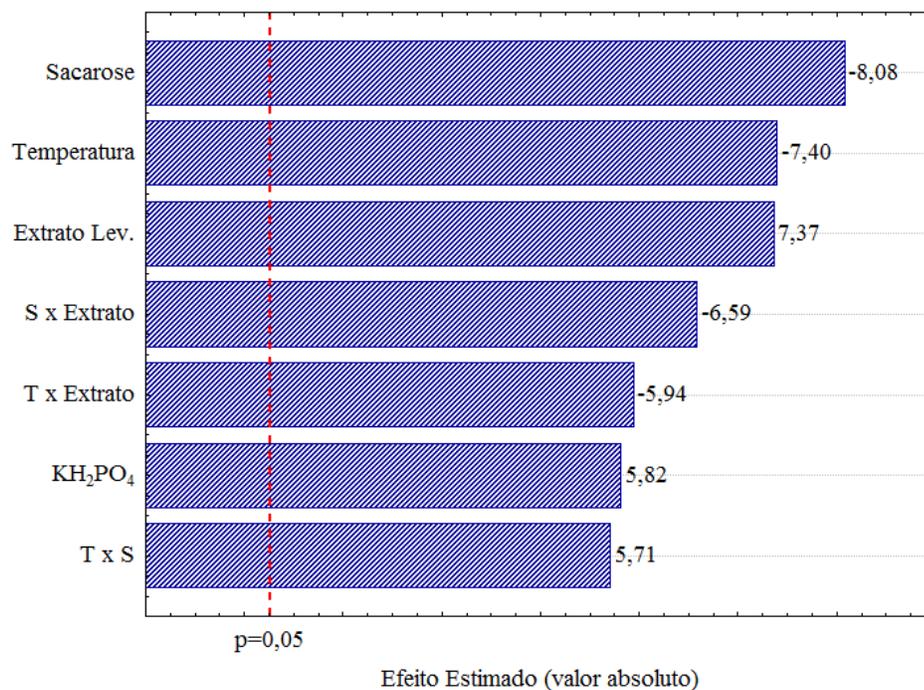


Figura 3.2.1a - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (cepa 7)

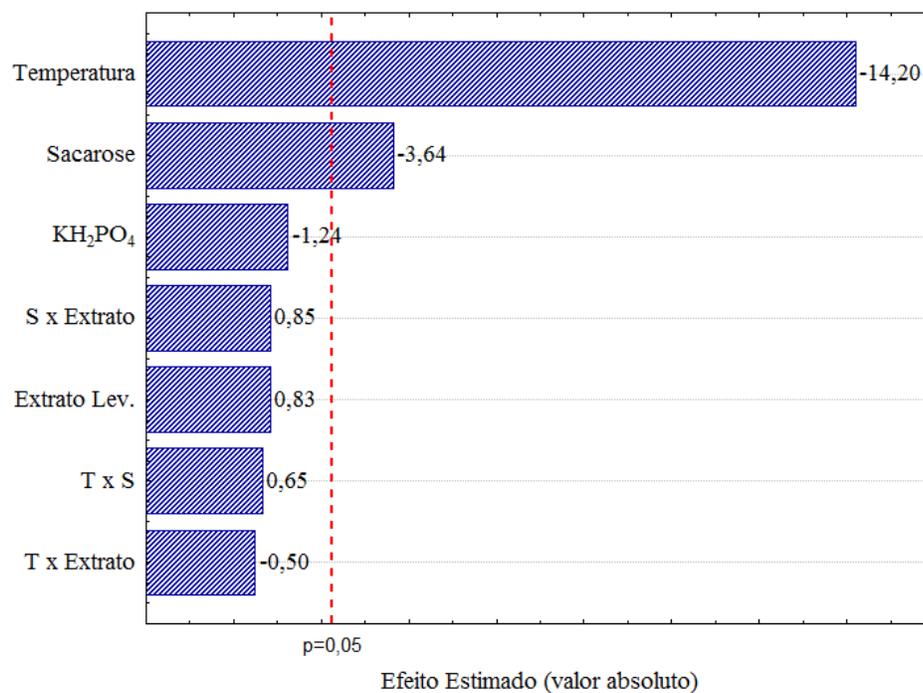


Figura 3.2.1b - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (cepa 25)

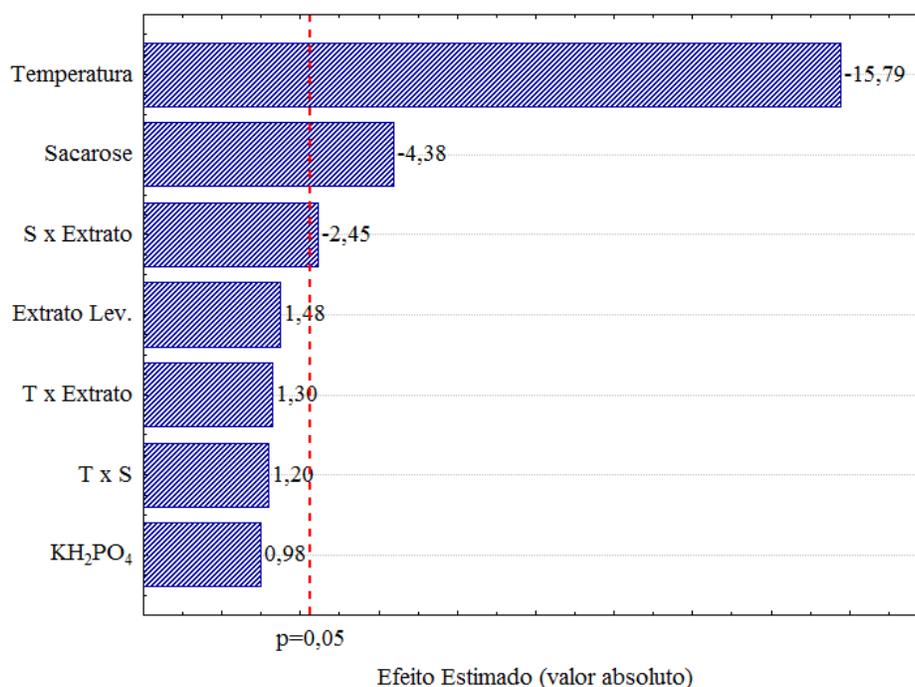


Figura 3.2.1c - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (cepa 27)

De acordo com a Figura 3.2.1a, os quatro parâmetros analisados e suas interações exercem influência estatisticamente significativa sobre o rendimento do ácido láctico, quando a cepa 7 é usado na fermentação. As Figuras 3.2.1b e 3.2.1c mostram que a temperatura e a concentração de sacarose exercem influência estatisticamente significativa sobre o rendimento de ácido láctico, quando as cepas 25 e 27 são usadas. Pelos resultados apresentados se percebe que a temperatura exerce influência bem maior sobre o rendimento em relação à concentração de sacarose, porém os dois parâmetros exercem influências negativas. Portanto, para aumentar o rendimento de ácido láctico, é necessário diminuir a temperatura de fermentação (nível inferior) bem como, reduzir a concentração inicial de sacarose. Quando a cepa 27 foi usada na fermentação, a interação entre a concentração de sacarose e a concentração de extrato de levedura também apresentou efeito significativo sobre o rendimento de ácido láctico.

Com base nos resultados do planejamento e também nos valores das concentrações, obtidos através da análise em cromatografia líquida, onde se percebeu um baixo consumo de sacarose, decidiu-se realizar um novo planejamento fracionário, usando menores concentrações de açúcar e menores temperaturas, a fim de aumentar o rendimento de ácido láctico bem como a

conversão de sacarose. Apesar da concentração de extrato de levedura apresentar apenas influência estatisticamente significativa quando a cepa 7 foi usada, optou-se em aumentar sua concentração no novo planejamento, a fim de avaliar sua influência quando uma menor concentração de açúcar é usada.

Foi realizado um novo planejamento fatorial fracionário 2^{4+1} em duplicata com 2 pontos centrais para cada cepa (7, 25 e 27). Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers com 200 mL de meio fermentativo e mantidos em Shaker durante 48 horas. Foram coletadas amostras a cada 24 horas para determinação de pH e densidade celular (DO) e, 9 mL foram centrifugados para determinação das concentrações de ácido lático, ácido acético, etanol e sacarose. Cada planejamento foi composto por 20 ensaios, resultando em um total de 60 ensaios.

A Tabela 3.2.4 apresenta os valores dos parâmetros analisados no planejamento fatorial fracionário.

Tabela 3.2.4 – Fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4+1}

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (1)
Temperatura – T (°C)	30,0	35,0	40,0
Sacarose – S (g/L)	15,0	30,0	45,0
Extrato de levedura (g/L)	2,5	5,0	7,5
Fosfato de potássio– KH_2PO_4 (g/L)	0,35	0,55	0,75

As Tabelas 3.2.4 (a-f) apresentam os rendimentos obtidos nos dez ensaios do planejamento fracionário durante 24 e 48 horas de processo, usando as cepas 7, 25 e 27, respectivamente.

Tabela 3.2.4a – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 7 (24 horas)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)	10(C)
Rendimentos	13,9	15,2	10,7	9,7	42,6	23,7	10,8	12,6	27,3	30,9
	8,8	10,3	17,8	8,5	40,3	16,5	18,9	8,4	36,9	32,3
Média	10,9	12,7	14,0	9,1	41,4	20,3	15,9	10,4	32,0	31,6
Desvio padrão	3,7	3,5	5,0	0,8	1,6	5,1	5,9	3,0	6,8	1,0

Contrastes	1=234 (1 = T)	2=134 (2 = S)	3=124 (3 = Ext.)	4=123 (4 = KH ₂ PO ₄)	12=34	13=24	14=23
		-7,4	-9,2	9,9	5,9	2,6	-5,5

Tabela 3.2.4b – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 7 (48 horas)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)	10(C)
Rendimentos	46,6	8,4	31,3	5,2	57,7	22,2	30,2	12,8	32,0	26,8
	48,5	15,6	28,6	8,7	49,7	27,4	17,6	14,4	32,5	31,2
Média	47,6	11,9	29,9	6,8	53,7	24,8	22,1	13,6	32,3	29,0
Desvio padrão	1,45	5,1	1,9	2,5	5,7	3,7	9,3	1,4	0,4	3,1

Contrastes	1=234 (1 = T)	2=134 (2 = S)	3=124 (3 = Ext.)	4=123 (4 = KH ₂ PO ₄)	12=34	13=24	14=23
		-24,4	-15,9	4,9	1,5	7,8	4,8

Tabela 3.2.4c – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 25 (24 horas)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)	10(C)
Rendimentos	33,7	46,4	32,5	20,0	58,5	52,0	34,3	26,1	36,7	31,7
	38,6	52,2	27,4	20,4	58,8	54,0	37,1	23,5	36,2	34,3
Média	36,1	49,3	29,9	20,2	58,6	53,0	35,7	24,8	36,5	33,0
Desvio padrão	3,5	4,1	3,6	0,3	0,2	1,4	2,0	1,8	0,4	1,8

Contrastes	1=234 (1 = T)	2=134 (2 = S)	3=124 (3 = Ext.)	4=123 (4 = KH ₂ PO ₄)	12=34	13=24	14=23
		3,3	-21,6	10,0	4,4	-7,0	-5,0

Tabela 3.2.4d – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 25 (48 horas)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)	10(C)
Rendimentos	42,8	39,6	33,5	22,6	65,4	42,8	33,0	23,8	37,4	36,6
	39,7	46,3	30,5	22,8	72,0	45,8	36,9	22,1	38,7	35,3
Média	41,3	43,0	32,0	22,7	68,7	44,3	35,0	23,0	38,1	36,0
Desvio padrão	2,2	4,7	2,1	0,1	4,7	2,1	2,8	1,2	0,9	0,9

Contrastes	1=234 (1 = T)	2=134 (2 = S)	3=124 (3 = Ext.)	4=123 (4 = KH ₂ PO ₄)	12=34	13=24	14=23
		-11,0	-21,2	8,0	5,8	0,3	-7,2

Tabela 3.2.4e – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 27 (24 horas)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)	10(C)
Rendimentos	50,5	76,0	29,1	40,9	60,3	55,3	31,8	27,2	35,7	34,7
	47,5	71,6	29,1	34,5	59,2	61,5	32,1	33,0	33,9	36,3
Média	49,0	73,8	29,1	37,7	59,8	58,4	32,0	30,1	34,8	35,5
Desvio padrão	2,1	3,1	0,0	4,5	0,8	4,4	0,2	4,1	1,3	1,1

Contrastes	1=234	2=134	3=124	4=123	12=34	13=24	14=23
	(1 = T)	(2 = S)	(3 = Ext.)	(4 = KH ₂ PO ₄)			
	7,6	-28,0	-2,4	3,9	-4,2	-9,1	-0,03

Tabela 3.2.4f – Rendimentos de ácido láctico usando cepa 27 (48 horas)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9(C)	10(C)
Rendimentos	46,0	48,9	33,6	26,2	64,4	34,2	36,9	27,7	34,8	33,8
	55,9	49,1	30,4	31,7	59,0	28,2	30,9	28,1	35,3	33,7
Média	51,0	49,0	32,0	29,0	61,7	31,2	33,9	27,9	35,1	33,8
Desvio padrão	7,0	0,1	2,3	3,9	3,8	4,2	4,2	0,3	0,3	0,1

Contrastes	1=234	2=134	3=124	4=123	12=34	13=24	14=23
	(1 = T)	(2 = S)	(3 = Ext.)	(4 = KH ₂ PO ₄)			
	-10,4	-17,5	-1,5	6,4	5,9	-7,9	2,0

As respostas obtidas com a realização do planejamento fatorial fracionário foram analisadas com o auxílio do Software STATISTICA 7, possibilitando a determinação dos efeitos dos fatores sobre o rendimento de ácido láctico obtido, usando as três cepas bacterianas em estudo.

As Figuras 3.2.2(a-f) apresentam os gráficos de Pareto dos efeitos, onde é possível visualizar os efeitos da temperatura, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura e fosfato de potássio e das interações entre temperatura e concentração de sacarose, temperatura e concentração de extrato de levedura, concentração de sacarose e concentração de extrato de levedura sobre o rendimento de ácido láctico após 24 e 48 horas de processo, para um intervalo de confiança de 95%.

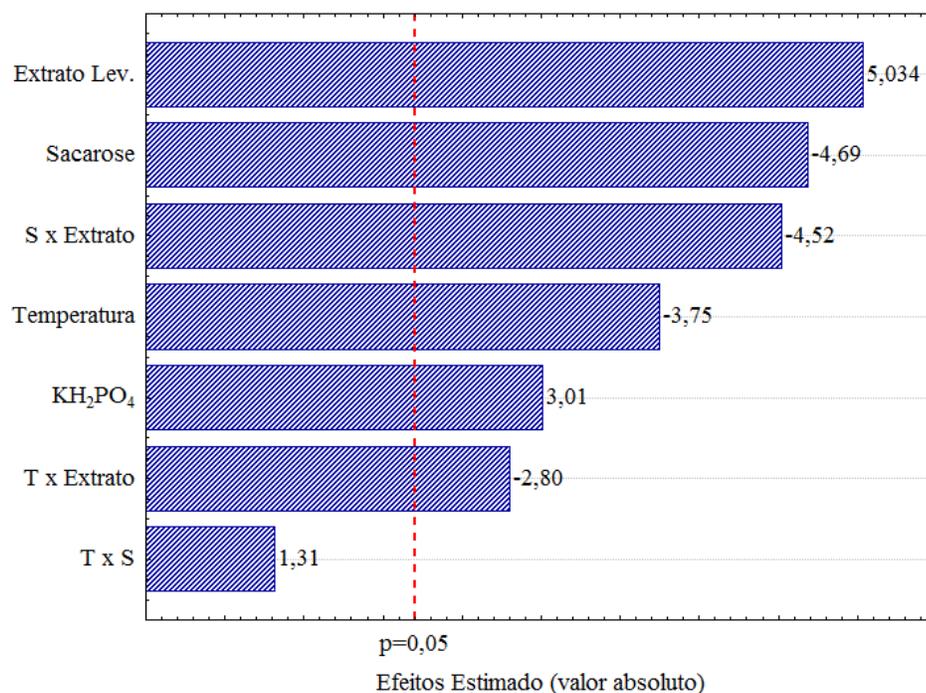


Figura 3.2.2a - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (24 horas - cepa 7)

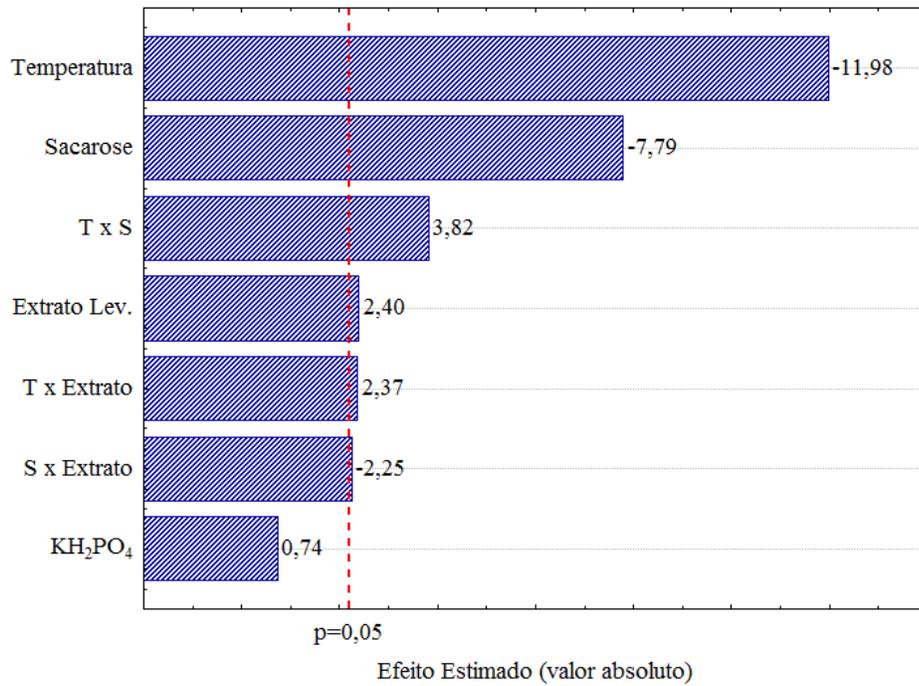


Figura 3.2.2b - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (48 horas - cepa 7)

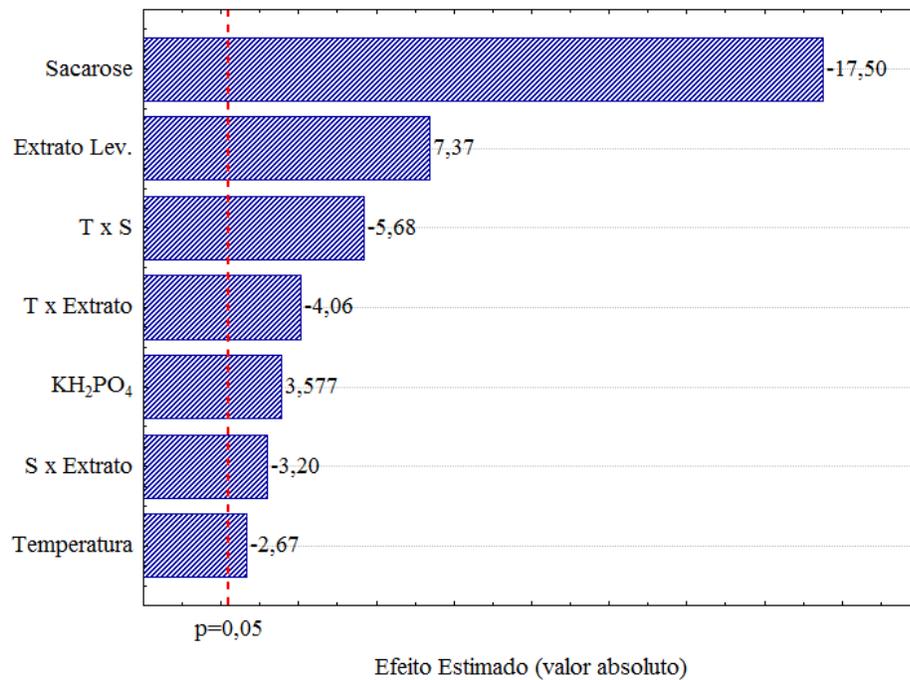


Figura 3.2.2c - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (24 horas - cepa 25)

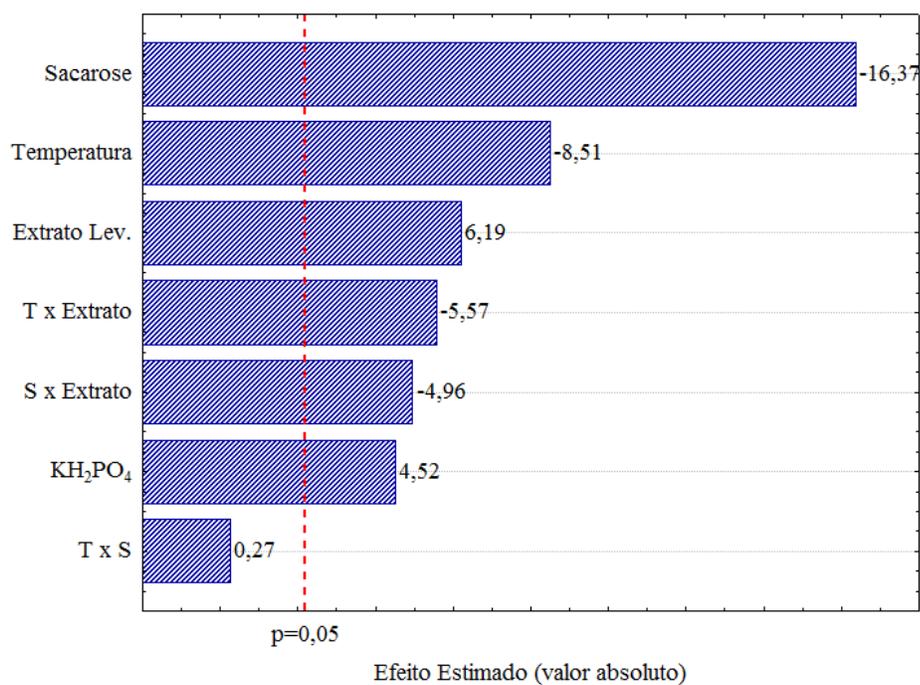


Figura 3.2.2d - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (48 horas - cepa 25)

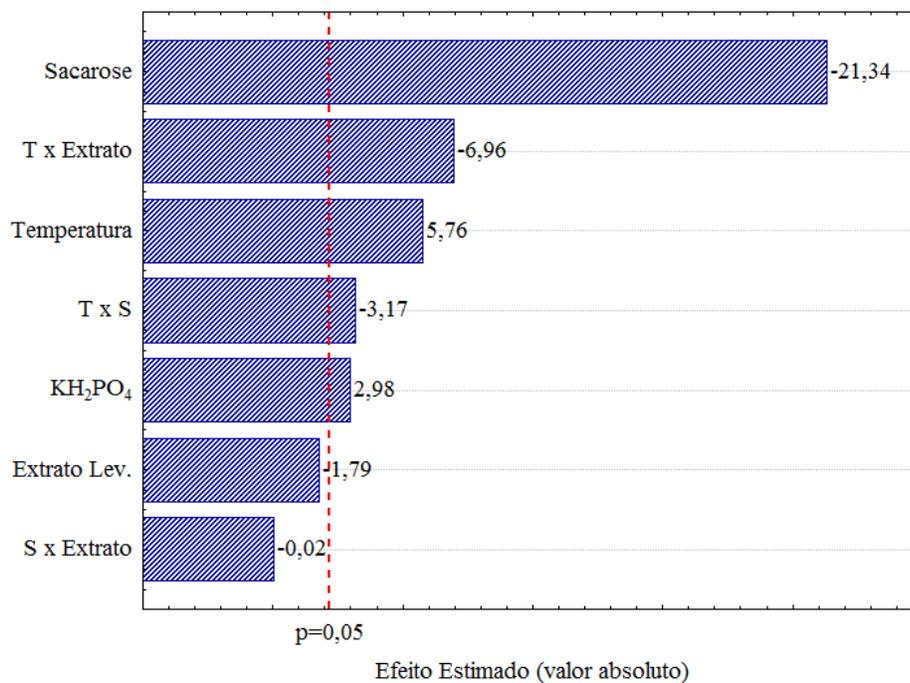


Figura 3.2.2e - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (24 horas - cepa 27)

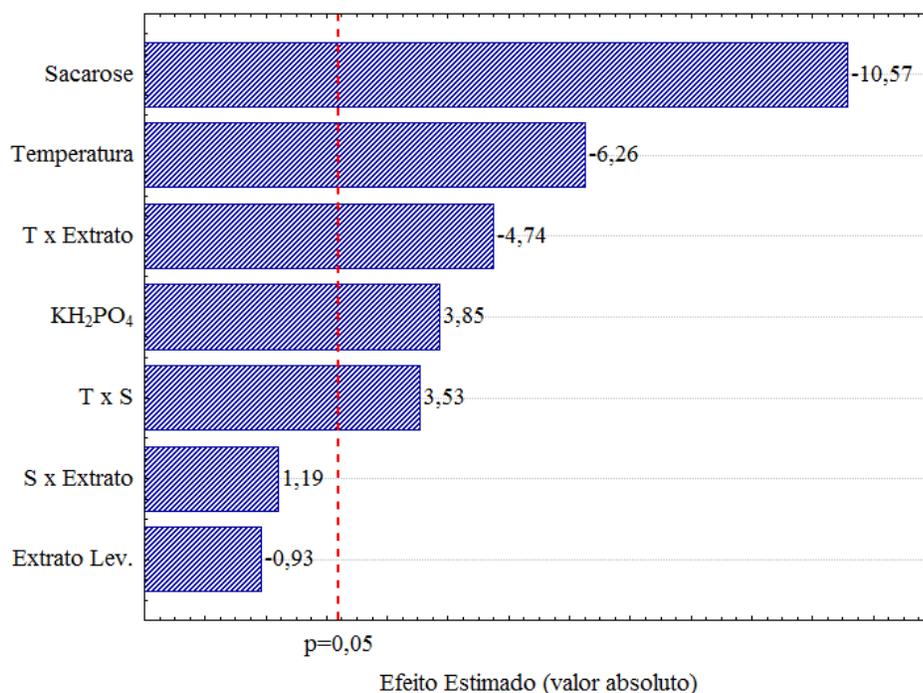


Figura 3.2.2f - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de ácido láctico (48 horas - cepa 27)

Através dos resultados apresentados nas Figuras 3.2.2 (a-f) foi possível perceber uma variação nos parâmetros mais influentes sobre o rendimento de ácido láctico após 24 horas de processo, conforme a cepa usada. Entretanto, depois de 48 horas de processo é possível visualizar que a temperatura e a concentração de sacarose são os fatores que mais influenciam o rendimento de ácido láctico para as três cepas (7, 25 e 27) e, exercem influências negativas sobre o mesmo. De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 3.2.4 (a-f), o maior rendimento para as três cepas foi obtido no ensaio 5, onde a temperatura e a concentração de sacarose são usados em seus valores inferiores e a concentração de extrato de levedura e de fosfato de potássio em seus valores superiores. Portanto, para se ter um processo eficiente de produção de ácido láctico, deve-se trabalhar com menores temperaturas, controlar a inibição de substrato através de um processo em batelada alimentada e adicionar extrato de levedura no meio de cultivo para atender as exigências nutricionais da bactéria. As Tabelas A.3 – A.8 (Apêndice A) apresentam as concentrações de ácido láctico e ácido acético, obtidas em 48 horas de processo. Nas amostras analisadas, não foi constatado a presença de etanol.

Analisando os resultados obtidos nos dois planejamentos fracionários realizados e, levando em consideração o rendimento e a concentração de ácido láctico bem como, a menor produção de ácido acético, concluiu-se que a cepa 25 é a mais adequada para a produção de ácido láctico e, portanto, foi selecionada para ser usada nos estudos posteriores deste trabalho, bem como as condições do meio de cultivo correspondentes ao ensaio número cinco dos planejamentos fracionários realizados.

3.3 Identificação da cepa

A identificação e classificação do microrganismo foram realizadas através da observação de características morfológicas da célula, fermentação de carboidratos (frutose, glicose e sacarose), produção de ácido láctico, produção de gás e também, testes de gram. Para finalizar a etapa de identificação, com o objetivo de obter resultados confiáveis em relação a espécie selecionada, foi realizada análise molecular utilizando sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S. A análise foi realizada no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP. De acordo com os resultados emitidos pelo Centro de Pesquisa, a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da cepa 25 (CPQBA 183-10DRM) apresentou 100% de similaridade com as sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus sp* presentes na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). A Figura 3.3.1 apresenta a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S do microrganismo analisado.

A análise filogenética (Figura 3.3.2) confirmou os resultados de busca de similaridade nas bases de dados, juntamente com as linhagens das espécies *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus*, não sendo possível a identificação em nível de espécie. Segundo Whitman *et al.* (2009) o RNA ribossomal 16S do *Lactobacillus plantarum* e do *Lactobacillus pentosus* é altamente conservado nestas duas espécies e a distinção entre elas é dada pela determinação do conteúdo de C+G e pela fermentação dos carboidratos arabinose e xylose.

De acordo com Skerman, *et al.* (1980) a linhagem *Lactobacillus pentosus* foi omitida da lista de nomes de bactérias aprovados sendo tratada como sinônimo da linhagem de *Lactobacillus plantarum*. Entretanto, conforme Zanoni *et al.* (1987), *Lactobacillus pentosus* pode ser

distinguido de *Lactobacillus plantarum* por sua característica bioquímica de fermentar ácido a partir de D-xylose.

```
>CPQBA 183-10 DRM
GTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCT
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGG
CCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGG
CGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTA
CAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCA
TTTCACCGCTACACATGGAGTTCCTACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTC
CCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGAC
TTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTT
CTGGTTA
```

Figura 3.3.1 - Sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra analisada

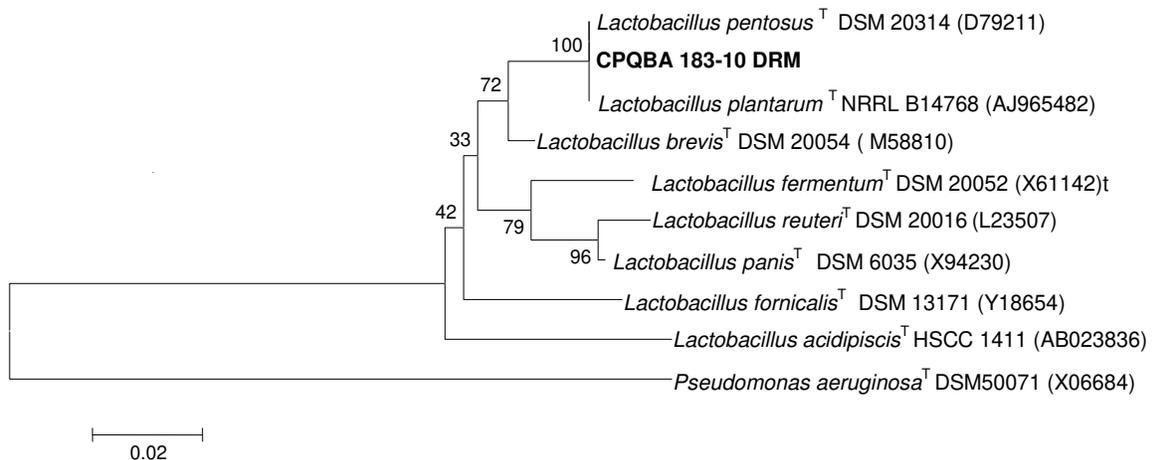


Figura 3.3.2 - Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra 25 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank

A fim de classificar a espécie como *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus pentosus* foi realizada uma fermentação usando D- xylose como fonte de carboidrato.

3.3.1. Fermentação de xylose

3.3.1.1 Preparo do inóculo

Para preparação do inóculo foi usada uma amostra de cultura estoque conservada em tubo de criogênio. Essa cultura foi ativada em 10 mL de caldo MRS, previamente esterilizado a

121 °C por 15 minutos. O inóculo foi mantido em incubadora a 35 °C durante 48 horas. Depois do período de incubação 2 mL do inóculo foram repicados em 18 mL de meio MRS e incubados a 35 °C durante 48h. Na sequência, o volume foi transferido para um Erlenmeyer contendo 180 mL de meio MRS fresco esterilizado. O Erlenmeyer com o inóculo foi mantido em Shaker durante 24 horas à 35 °C e agitação de 150 rpm.

3.3.1.2 Meio de fermentação

A Tabela 3.3.1 apresenta a composição do meio usada na fermentação. Os componentes do meio foram diluídos em 1.800 mL de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Foi usado um volume de inóculo correspondente a 10% do volume total de fermentação (volume do meio + volume de inóculo).

Tabela 3.3.1 - Composição do meio fermentativo

Componente	Composição (g/L)
Xylose	12,5
Caseína	5,0
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,1
Cloreto de potássio (KCl)	0,425
Extrato de levedura	5,0
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,55
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,1
Sulfato de manganês (MnSO ₄)	0,05

3.3.1.3 Fermentação

A fermentação foi realizado em um biorreator, marca New Brunswick Scientific, modelo BioFlo III, com volume de trabalho de 2.000 mL. A temperatura e a agitação da fermentação foram mantidas constantes a 35 °C e 200 rpm. O pH foi controlado em 5,0 através da adição de

NaOH (4 M). Os parâmetros do processo (temperatura, pH, produção de CO₂ e turbidez) foram monitorados e controlados pelo software LabVIEW[®].

3.3.1.4 Metodologia analítica

As amostras coletadas foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm em uma centrífuga, marca Jouan, modelo MR 1812. O sobrenadante foi filtrado em membranas millipore de 0,22 µm e usado para determinação das concentrações de ácido láctico, xylose, ácido acético. O precipitado foi usado para determinação da concentração celular.

As concentrações de açúcar, ácido láctico e bioproductos (ácido acético e etanol) foram determinadas através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), marca Varian, modelo 9010. Para avaliar a concentração de xylose foi usada uma coluna Sugar-Pak a temperatura de 80 °C, detector de índice de refração (RI) e água deionizada como eluente com vazão de 0,5 mL/min. Para análise dos ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético) foi usada uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a temperatura de 43 °C e detector Ultravioleta (UV/Vis) com comprimento de onda (λ) de 210 nm. Solução de ácido sulfúrico (5 mM) foi usada como fase móvel com vazão de 0,6 mL/min. As concentrações foram determinadas através de curvas de calibração (Figuras 3.3.3 a-c), obtidas a partir de soluções padrões de ácido acético, ácido láctico e xylose.

A concentração celular foi determinada pelo método de gravimetria. Para determinação da concentração celular por gravimetria, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e centrifugado. A massa celular foi colocada em tubos eppendorfs, previamente pesados e secos, e seca em estufa a 70 °C por 72 horas.

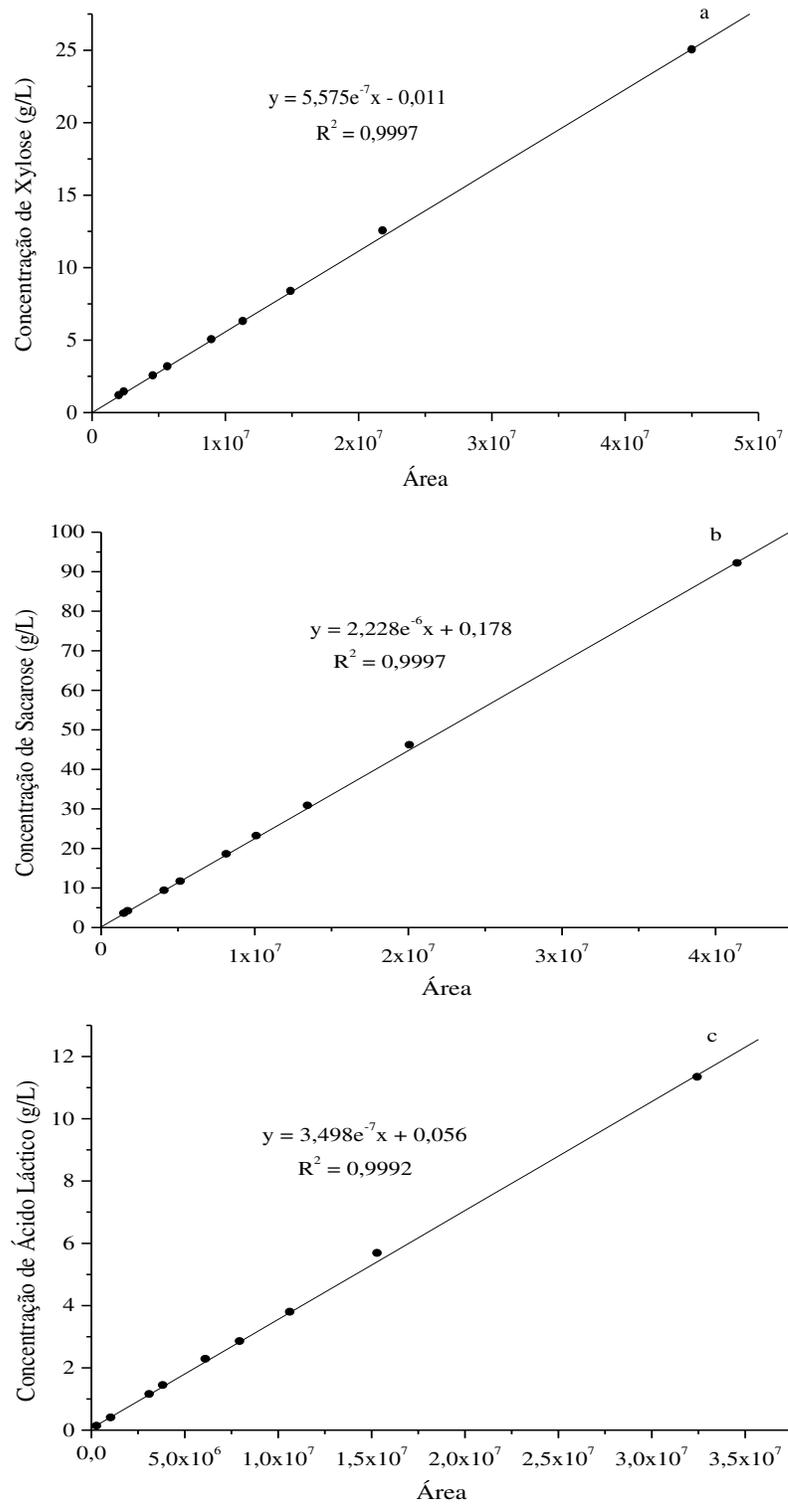


Figura 3.3.3 - Curvas de calibração para determinação das concentrações (a – xylose; b – sacarose; c – ácido láctico)

3.3.1.5 Resultados do processo fermentativo

A fermentação foi realizada em processo batelada durante 120 horas, com concentração inicial de xylose de 12,5 g/L. Durante as primeiras horas de processo não se percebeu adição de NaOH (agente neutralizante) no meio fermentativo, e conseqüentemente, ausência de produção de ácido. Depois de 24 horas de processo foi adicionado um pulso de açúcar composto por (6,25 g/L de xylose e 3,13 g/L de sacarose) e após 48 horas foi adicionado um pulso de açúcar composto por 3,13 g/L de xylose e 3,125 g/L de sacarose. Os açúcares foram diluídos em água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. O volume da solução foi o mesmo que o volume retirado durante as coletas de amostras até o momento do pulso.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.3.4, é possível visualizar que ácido láctico foi produzido somente quando a sacarose foi adicionada no processo e, apenas, sacarose foi consumida. A concentração final de xylose foi a soma de suas concentrações adicionadas no processo. Portanto, a partir dos resultados obtidos neste processo fermentativo pode-se perceber que o microrganismo é hábil para fermentar sacarose, mas não xylose. A partir destes resultados e dos demais apresentados anteriormente neste capítulo, o microrganismo foi classificado como sendo da espécie *Lactobacillus plantarum*. Porém, outros estudos poderão ser realizados, em trabalhos futuros, para avaliar a espécie da bactéria e assim, obter resultados definitivos da mesma.

Lactobacillus plantarum é uma espécie versátil, flexível, capaz de crescer em uma variedade de fontes de carboidratos. É encontrada em uma variedade de nichos ambientais (Kleerebezem *et al.*, 2003). A flexibilidade ecológica do *Lactobacillus plantarum* é refletida pela fato desta espécie ter um dos maiores genomas conhecidos entre as bactérias do ácido láctico (Chevallier *et al.*, 1994).

Lactobacillus plantarum é classificado no grupo de lactobacilos heterofermentativos facultativos, podendo fermentar açúcar pelo caminho EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) ou por phosphoketolase, levando a perfis de fermentação homolática e heterolática, respectivamente (Kandler, 1983 citado por Kleerebezem *et al.*, 2003). Quando glicose é usada como fonte de carbono, *Lactobacillus plantarum* exibe um perfil homoláctico, degradando glicose a piruvato via

EMP, que é convertido em quantidades aproximadamente equimolares dos isômeros L(+) e D(-) do ácido láctico pelas atividades de estereoespecificidade das enzimas lactato desidrogenase (Ferain *et al.*, 1996). O rendimento teórico é 105% (m/m), entretanto o rendimento pode variar com as condições de fermentação e, é altamente dependente do pH devido a inibição do crescimento celular pelo produto ácido formado (Mathews e Fu, 2000).

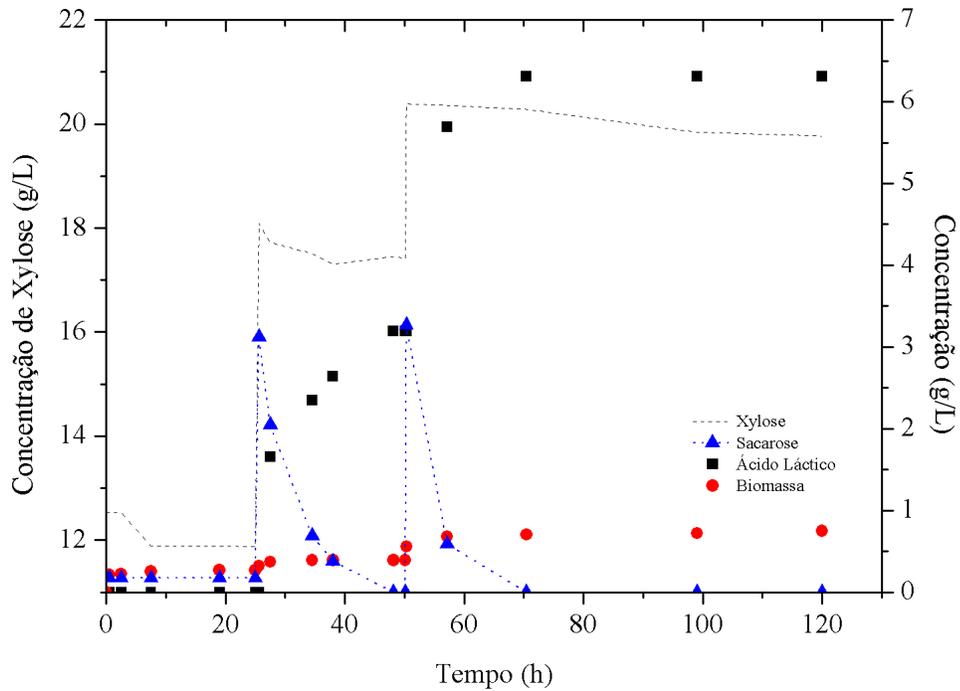


Figura 3.3.4 - Perfis de concentração obtidos no processo fermentativo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEVALLIER, B.; HUBERT, J. C.; KAMMERER, B. Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 120, p. 51-56, 1994.
- FERAIN, T.; SCHANCK, A. N.; DELCOUR, J. ¹³C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an *ldhL-ldhD* double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, v. 178(24), p. 7311-7315, 1996.
- KANDLER, O. (1983) citado por KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O. P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S. A.; SANDBRINK, H. M.; FIERS, M. W. E. J.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R. M. K.; BRON, P. A.; HOFFER, S. M.; GROOT, M. N. N.; KERKHOVEN, R.; VRIES, M.; URSING, B.; VOS, W. M.; SIEZEN, R. J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 100(4), p. 1990-1995, 2003.
- KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O. P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S. A.; SANDBRINK, H. M.; FIERS, M. W. E. J.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R. M. K.; BRON, P. A.; HOFFER, S. M.; GROOT, M. N. N.; KERKHOVEN, R.; VRIES, M.; URSING, B.; VOS, W. M.; SIEZEN, R. J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 100(4), p. 1990-1995, 2003.
- MATHEWS, A. P.; FU, W. Fermentation kinetics in the production of lactic acid from high strength wastewaters. *Proceeding of the Third Asia-Pacific Conference on Sustainable Energy Environmental Technologies*, p. 611- 616, 2000.
- SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 30, p. 225-420, 1980.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C .L. Microbiologia. 6ª ed. Porto Alegre: Artes médicas Sul, 2000.

WHITMAN, W. B.; DEVOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H. (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, 2ª ed., v. 3, 2009.

ZANONI, P.; FARROW, J. A. E.; PHILLIPS, B. A.; COLLINS, M. D. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson)sp. *Intenational Journal of Systematic Bacteriology*, v. 37(4), p. 339-341, 1987.

CAPÍTULO IV

Produção de Ácido Lático

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nos processos fermentativos para a produção do ácido lático, bem como, a modelagem, simulação, otimização e controle do processo. Primeiro serão apresentados os resultados obtidos a partir do processo fermentativo usando sacarose pura e na sequência os resultados da fermentação usando melão de cana-de-açúcar, os quais serão apresentados em forma de artigo.

4.1 Fermentação de Sacarose para Produção de Ácido Lático

Nesta seção serão apresentados os resultados experimentais obtidos na produção de ácido lático a partir da fermentação da sacarose pela bactéria láctica selecionada no estudo apresentado no Capítulo III.

4.1.1 Microrganismo

O *Lactobacillus plantarum* foi selecionado a partir de um estudo realizado com 60 cepas bacterianas isoladas da fermentação alcoólica e pertencentes ao banco de culturas do Centro de Tecnologia Canavieira de Piracicaba. A escolha deste microrganismo foi baseada nos estudos apresentados no Capítulo III. A cepa foi conservada em tubos de criogênio de 2 mL contendo caldo MRS e glicerol à -78 °C.

4.1.2 Preparo do inóculo

Para preparação do inóculo foi usada a cultura de um tubo de criogênio. Essa cultura foi ativada em 10 mL de caldo MRS, previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. O inóculo foi mantido em incubadora a 35 °C durante 48 horas. Depois do período de incubação, 5 mL do inóculo foram repicados em 45 mL de caldo MRS e incubados a 35 °C durante 48h. Na sequência, o volume foi transferido para um Erlenmeyer contendo 450 mL de meio MRS fresco

esterilizado. O Erlenmeyer com o inóculo foi mantido em Shaker durante 30 horas a 35 °C e sob agitação de 150 rpm.

4.1.3 Meio de fermentação

A composição do meio de fermentação foi baseada nos resultados dos planejamentos fracionários apresentados no Capítulo III, e é apresentada na Tabela 4.1.1. Os componentes do meio foram diluídos em 4.320 mL de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Foi usado um volume de inóculo correspondente a 10% do volume total de fermentação (volume do meio + volume de inóculo).

Tabela 4.1.1 - Composição do meio fermentativo

Componente	Composição (g/L)
Sacarose	13,0
Caseína	5,0
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,1
Cloreto de potássio (KCl)	0,425
Extrato de levedura	5,0
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,55
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,1
Sulfato de manganês (MnSO ₄)	0,05

4.1.4 Fermentação

A fermentação foi realizado em um biorreator, marca New Brunswick Scientific, modelo BioFlo III. O biorreator consiste em vaso de vidro com volume máximo de trabalho de 5.000 mL, montado sobre uma base de controle que permite controlar algumas variáveis do processo, como temperatura, pH, turbidez, CO₂, agitação.

A Figura 4.1.1 mostra o biorreator usado no processo fermentativo para a produção de ácido láctico a partir da sacarose. A temperatura e a agitação da fermentação foram mantidas

constantes a 34 °C e 200 rpm. O pH foi controlado em 5,0 pela adição de NaOH (4 M). O controle contínuo de pH na fermentação para produção de ácido lático é vantajoso, uma vez que o rendimento e a produtividade geralmente aumentam (Burgos-Rubio *et al.*, 2000). Os parâmetros do processo (temperatura, pH, produção de CO₂ e turbidez) foram monitorados e controlados pelo software LabVIEW[®] codificado por Atala (2004).



Figura 4.1.1 - Processo fermentativo para produção de ácido lático

4.1.5 Metodologia analítica

As amostras coletadas durante o processo foram centrifugadas por 15 minutos a 4.000 rpm em uma centrífuga, marca Jouan, modelo MR 1812. O sobrenadante foi filtrado em membranas millipore de 0,22 µm e usado para determinação das concentrações de ácido lático, sacarose, ácido acético e etanol e o precipitado foi usado para determinação da concentração celular.

As concentrações de açúcar, ácido lático e subprodutos (ácido acético e etanol) foram determinadas através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), marca Varian, modelo 9010. Foi usada uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 37 °C. Para identificação de açúcares e etanol foi usado o detector de índice de refração (RI) e para os ácidos orgânicos (ácido lático e ácido acético) detector ultravioleta (UV/Vis) com comprimento de onda (λ) de 215 nm. Solução de ácido sulfúrico (5 mM) foi usada como fase móvel com vazão de 0,6 mL/min. As concentrações foram determinadas através de curvas de calibração, obtidas a partir de soluções padrões de ácido acético, ácido lático, etanol, frutose, glicose e sacarose.

A concentração celular foi determinada pelo método de gravimetria e também por espectrofotometria. Para determinação da concentração celular por gravimetria, o precipitado foi

lavado duas vezes com água destilada e centrifugado. A massa celular foi colocada em placas de petri previamente pesadas e secas em estufa a 70 °C por 72 horas.

Para determinação da concentração celular por espectrofotometria, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro, marca Hatch, modelo DR 5000, com comprimento de onda (λ) de 660 *nm*. Os valores foram convertidos em concentração (g/L).

4.1.6 Resultados do processo fermentativo

As curvas de calibração para determinação das concentrações de sacarose, ácido láctico, ácido acético e biomassa são apresentadas nas Figuras B.1 – B.4 no Apêndice B. Através das análises realizadas em HPLC não foi constatado a produção de etanol e, a produção de ácido acético foi pequena e, portanto, negligenciada. A partir dos resultados obtidos através do controle on-line do sistema fermentativo, não se constatou a formação de dióxido de carbono (CO₂).

O processo pode ser representado pelas seguintes reações



A reação estequiométrica do processo pode ser escrita de acordo com



A conversão completa da reação acima resulta num rendimento de 105% (m/m).

Uma concentração alta de açúcar no meio pode exercer um severo estresse osmótico nas células bacterianas. Para o metabolismo ativo ocorrer, as condições intracelulares devem permanecer relativamente constante no que diz respeito à composição iônica, pH, e níveis de metabólitos (Csonka e Hanson, 1991). Considerando a possibilidade de estresse das células por altas concentrações de substrato, bem como os resultados obtidos nos planejamentos fracionários apresentados no Capítulo III, foi usada uma concentração inicial de sacarose de 13 g/L e adicionados pulsos de sacarose ao longo do processo fermentativo para evitar a inibição celular e aumentar a concentração final de ácido láctico.

Na Tabela 4.1.2 são apresentados os resultados obtidos no processo fermentativo de produção de ácido láctico a partir de sacarose por *Lactobacillus plantarum*. A Figura 4.1.2a mostra os perfis de concentração de sacarose e ácido láctico e a solução de hidróxido de sódio adicionada no meio fermentativo ao longo do processo. Através desta figura é possível visualizar que a sacarose adicionada inicialmente no processo foi consumida em aproximadamente 9 horas. Depois de 25 horas de processo foi realizado um pulso de sacarose (~ 9 g/L), que foi consumida em 5 horas, resultando em uma concentração de 24 g/L de ácido láctico. Um novo pulso de sacarose (~ 6 g/L) foi realizado quando o processo fermentativo completava 43 horas. O processo foi finalizando depois de 65 horas de operação, resultando em uma concentração final de ácido láctico de aproximadamente 30 g/L, com rendimento de 98% e produtividade máxima de 1,8 g/L·h. Também, é possível visualizar que a produção de ácido láctico é diretamente proporcional ao consumo de hidróxido de sódio (NaOH) adicionado no meio para ajuste de pH.

Conforme os perfis de concentração mostrados na Figura 4.1.2b se percebe a produção de ácido láctico associada ao crescimento celular. Burgos-Rubio *et al.* (2000) avaliaram o efeito da concentração de substrato no crescimento microbiano e na produção de ácido láctico. Quando a concentração de substrato usado foi menor que 10,4 g/L, toda a produção de ácido láctico foi associada com o crescimento celular. Para concentrações acima de 20 g/L, depois de um tempo de residência de 6 horas, foi observada uma produção de ácido láctico não associado ao crescimento.

Tabela 4.1.2 - Resultados obtidos na fermentação láctica

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0,0	13,08	0,00
0,0*	13,22	1,91
2,0	12,70	3,64
4,0	11,87	6,63
6,0	7,24	10,24
8,5	1,78	11,86
10,5	0,00	14,81
12,5	0,00	14,81
14,5	0,00	14,81
16,5	0,00	14,81
18,5	0,00	14,81
20,5	0,00	14,81
22,5	0,00	14,81
24,5	0,00	14,81
25,5**	9,26	14,81
26,5	8,31	15,21
28,5	5,39	17,76
30,5	2,79	22,76
32,8	0,00	23,70
34,5	0,00	23,70
36,5	0,00	23,70
38,5	0,00	23,70
40,5	0,00	23,70
42,5	0,00	23,70
43,5**	6,20	23,70
44,5	5,04	24,67
47,5	1,25	28,38
50,5	0,00	29,37
53,5	0,00	29,37
65,8	0,00	29,37

* Inoculação ** Pulso

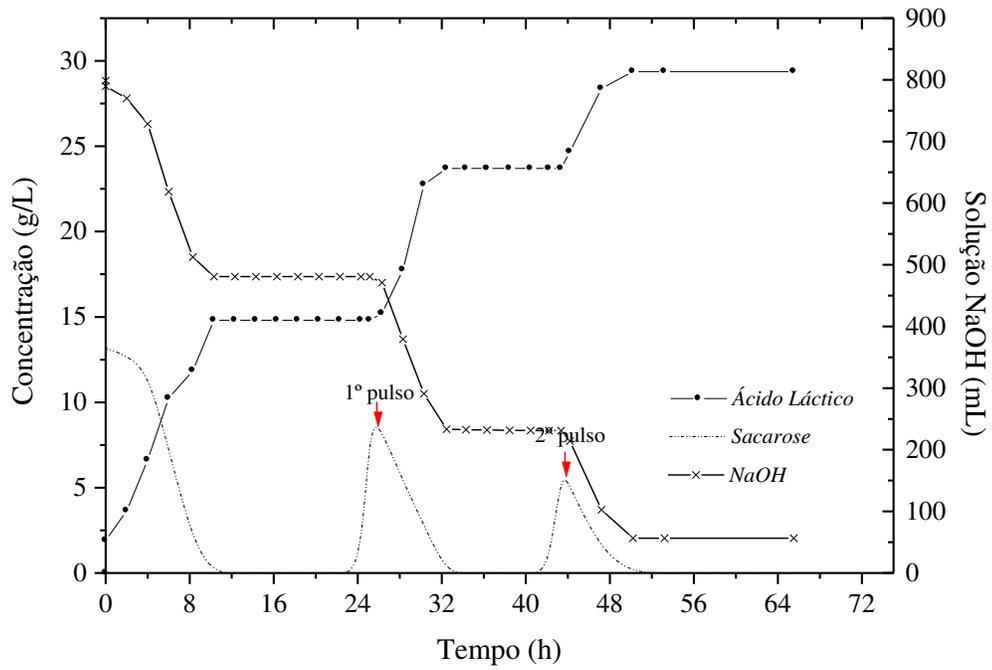


Figura 4.1.2a - Perfis de concentração de sacarose e ácido láctico e solução de NaOH consumida durante o processo fermentativo

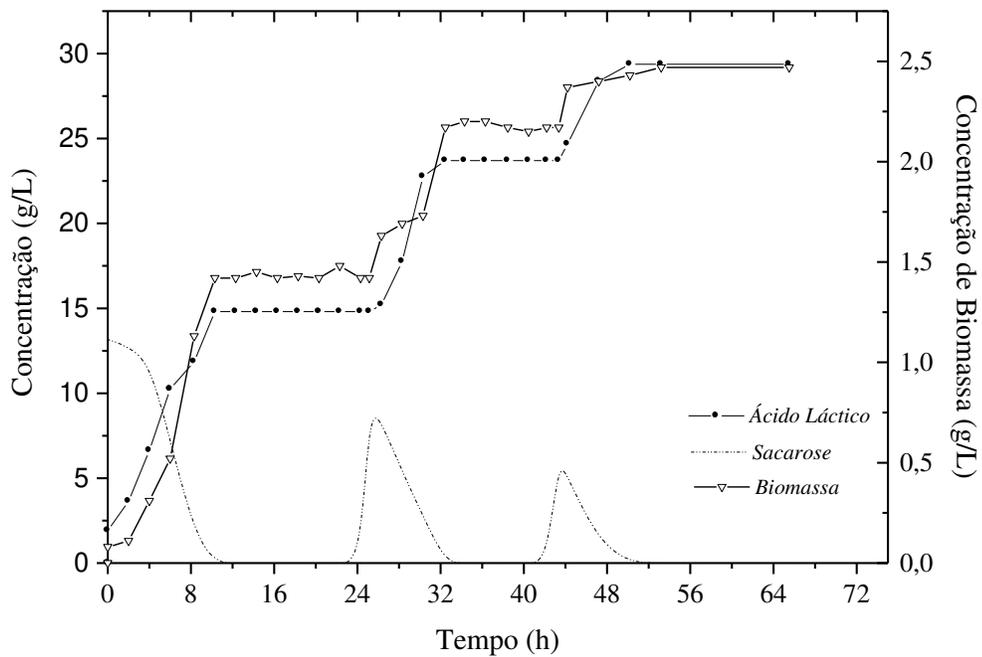


Figura 4.1.2b - Perfis de concentração de sacarose, ácido láctico e biomassa

Finalizada a fermentação, o vinho final foi centrifugado a 8.000 rpm durante 15 minutos em uma centrífuga marca Jouan, modelo MR 1812, em seguida foi filtrado à vácuo com membrana millipore 45 μm . O vinho centrifugado e filtrado foi concentrado em um rotaevaporador, marca Buchi, modelo EL 130, à vácuo e 55 °C durante 40 minutos e, posteriormente, foi usado no processo de esterificação de ácido láctico com etanol para produção de lactato de etila.

4.1.7 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para ajustar os dados experimentais do processo foi usada uma função sigmoideal (Equação 4.1.2). A função foi escolhida por ser simples, de fácil derivação e por apresentar um bom ajuste dos dados. O ajuste foi realizado com o auxílio do software TableCurve 2D (versão 5.0 – *Systat*). Os dados de cada batelada foram ajustados separadamente ($t = 0$ a $t = 24\text{h}30\text{min}$; $t = 25$ h a $t = 42\text{h}30\text{min}$; $t = 43$ h a $t = 65$ h), obtendo-se valores das constantes (a , b , c , d) para cada batelada.

$$y = a + \frac{b}{(1 + \exp(-(t - c)/d))} \quad (4.1.2)$$

A equação (4.1.2) descreve a concentração (y) (ácido láctico, sacarose ou biomassa) no meio como uma função do tempo (t). Os termos (a , b , c e d) são constantes que podem ser determinadas por regressão linear (Venus e Richter, 2006). A derivada primeira desta equação representa a velocidade de reação (crescimento, produção e consumo) durante todo o processo.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\frac{a}{b} \exp(-(t - c)/d)}{(1 + \exp(-(t - c)/d))^2} \quad (4.1.3)$$

As Figuras 4.1.3 e 4.1.4 apresentam as concentrações obtidas a partir dos dados experimentais da primeira batelada do processo fermentativo ($t = 0$ a $t = 24\text{h}30\text{min}$) e de todo o processo ($t = 0$ a $t = 65$ h), ajustados a partir da Eq. (4.1.2).

Para determinação inicial dos parâmetros cinéticos do processo foram considerados os dados experimentais obtidos na primeira etapa do processo (1ª batelada ($t = 0$ a $t = 24\text{h}30\text{min}$)),

que posteriormente foram usados como estimativa inicial para estimar os valores dos parâmetros, considerando ($t = 0$ a $t = 65h$).

A partir das concentrações celulares obtidas ao longo do tempo ($t = 0$ a $t = 24h30min$) foi determinada a fase de crescimento linear através do intervalo de tempo, onde se conseguiu um melhor ajuste da reta, conforme Figura 4.1.5a. O melhor ajuste foi determinado a partir do melhor valor do coeficiente de regressão (R^2) obtido. Desta forma, definiu-se que a fase de crescimento linear está entre 5 h e 8 h. Para determinar a fase de crescimento exponencial, um gráfico semilog da concentração celular em função do tempo foi construído, conforme Figura 4.1.5b.

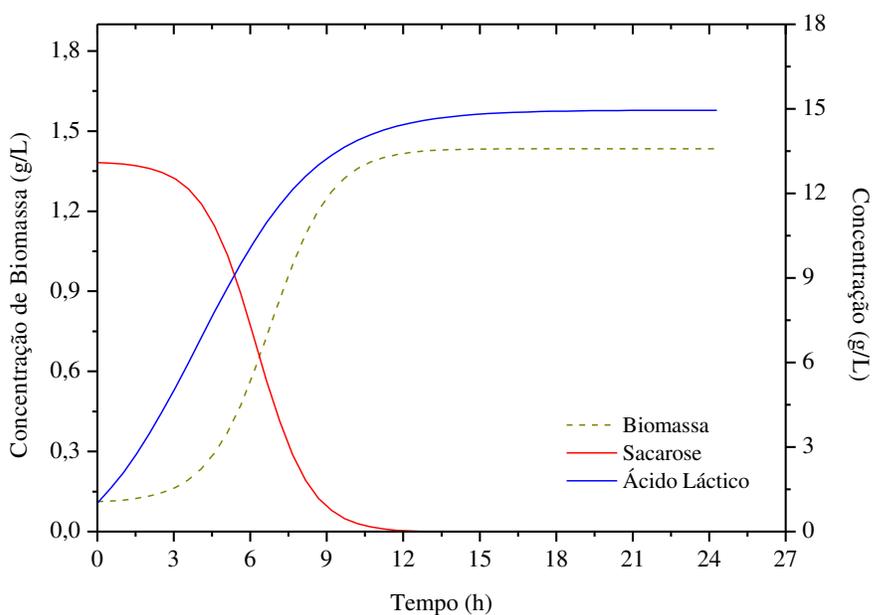


Figura 4.1.3 - Perfis de concentração de sacarose, ácido láctico e biomassa obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais da 1ª batelada

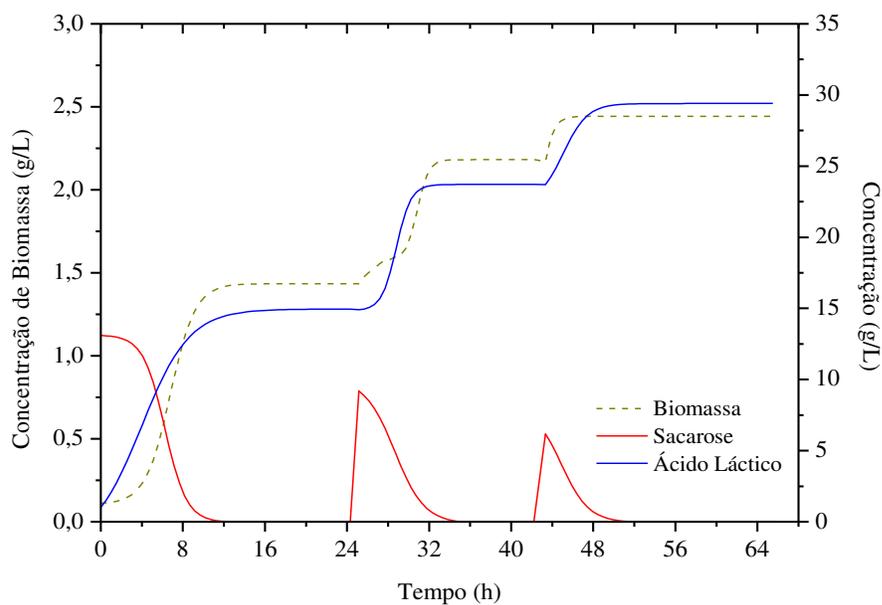


Figura 4.1.4- Perfis de concentração de sacarose, ácido láctico e biomassa obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais

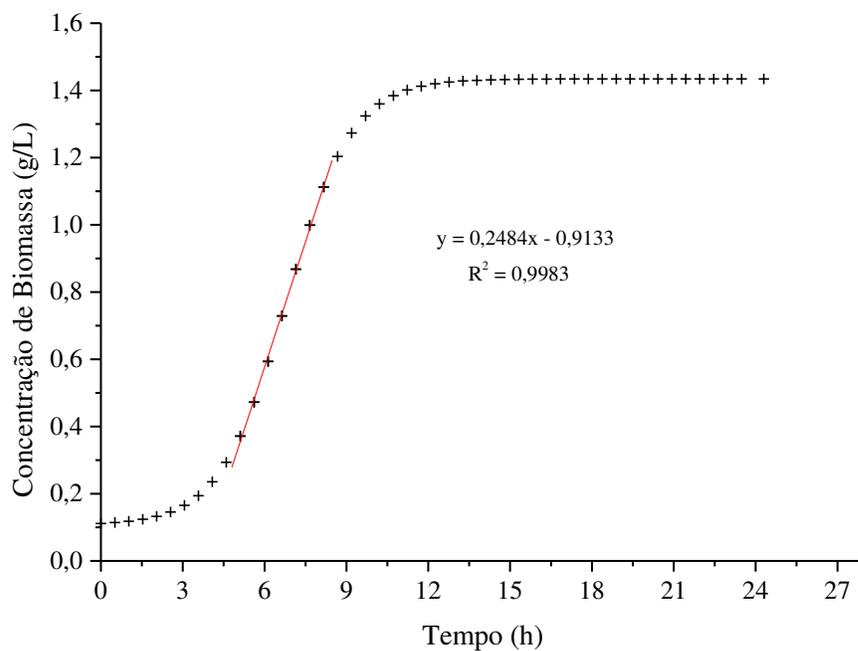


Figura 4.1.5a - Concentração celular (a reta corresponde à fase de crescimento linear)

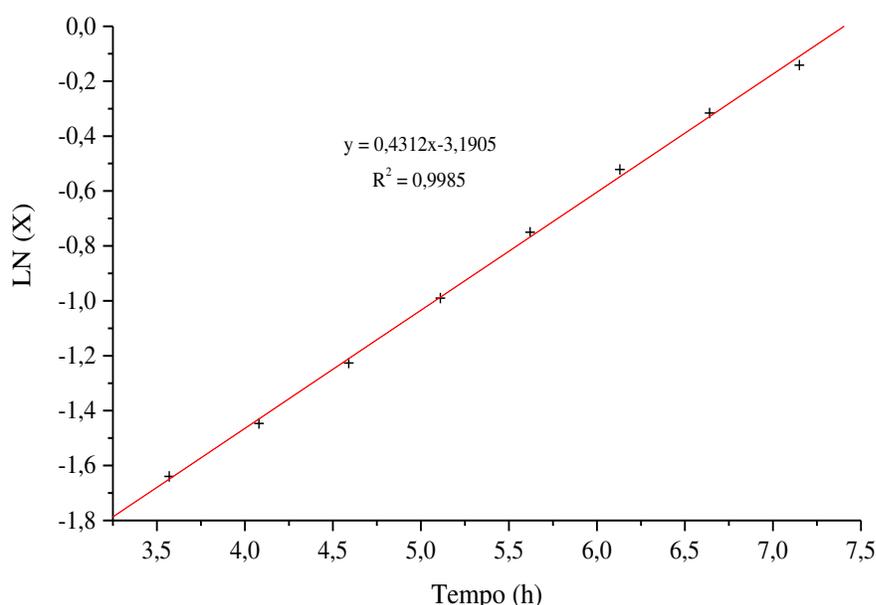


Figura 4.1.5b - Gráfico semilog da concentração celular

As velocidades de reação (velocidade de consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular) foram determinadas de acordo com as equações (4.1.4, 4.1.7, 4.1.11), respectivamente. A Figura 4.1.6 mostra os perfis das velocidades de reação obtidas. As constantes cinéticas (α , β , μ_{\max} , K_S , P_{\max} , $Y_{P/S}$) foram determinadas por regressão linear, conforme mostram as Figuras 4.1.7 (a-c). Os tipos de inibição celular pelo produto, a saber, linear (eq. 4.1.13), exponencial (eq. 4.1.14) e hiperbólica (eq. 4.1.15), foram avaliadas a partir de regressão linear da concentração de produto e de células obtidas durante o processo fermentativo em batelada, a fim de identificar o modelo que melhor representasse a inibição celular pelo produto. Os melhores resultados foram obtidos com o modelo de inibição linear, apresentados na Figura 4.1.8.

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (4.1.4)$$

$$r_s = \mu_s X \quad (4.1.5)$$

$$\mu_s = \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_x X + \frac{1}{Y_{P/S}} \mu_p X + mX \right) \quad (4.1.6)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \quad (4.1.7)$$

$$r_p = \mu_p X \quad (4.1.8)$$

$$\mu_p = \alpha \mu_x + \beta \quad (4.1.10)$$

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad (4.1.11)$$

$$r_x = \mu_x X \quad (4.1.12)$$

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) \quad (4.1.13)$$

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_S + S} e^{-K_p P} \quad (4.1.14)$$

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_S + S} \frac{K_p}{K_p + P} \quad (4.1.15)$$

Onde, P, S e X são as concentrações de ácido láctico, sacarose e biomassa, respectivamente; r_p , r_S e r_X são as velocidades de reação de produção, consumo e crescimento; m é o coeficiente de manutenção; $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ são os rendimentos de ácido láctico e biomassa em relação ao consumo de substrato; α é a constante de produção associada ao crescimento; β é a constante de produção não associada ao crescimento; μ_p , μ_S e μ_X são as velocidades específicas de produção, consumo e crescimento, respectivamente.

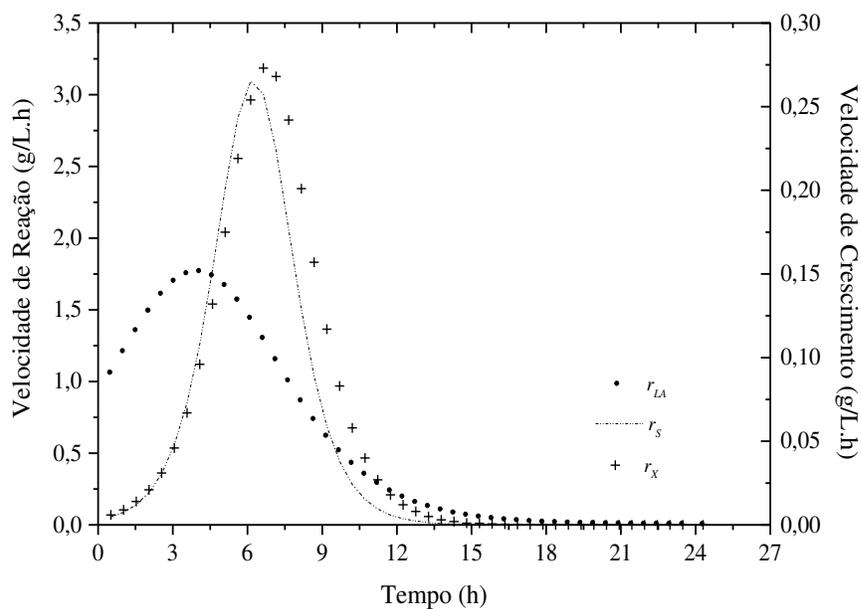


Figura 4.1.6 - Perfis das velocidades de reação de consumo de sacarose (r_s), produção de ácido láctico ($r_{LA} = r_p$) e crescimento celular (r_x)

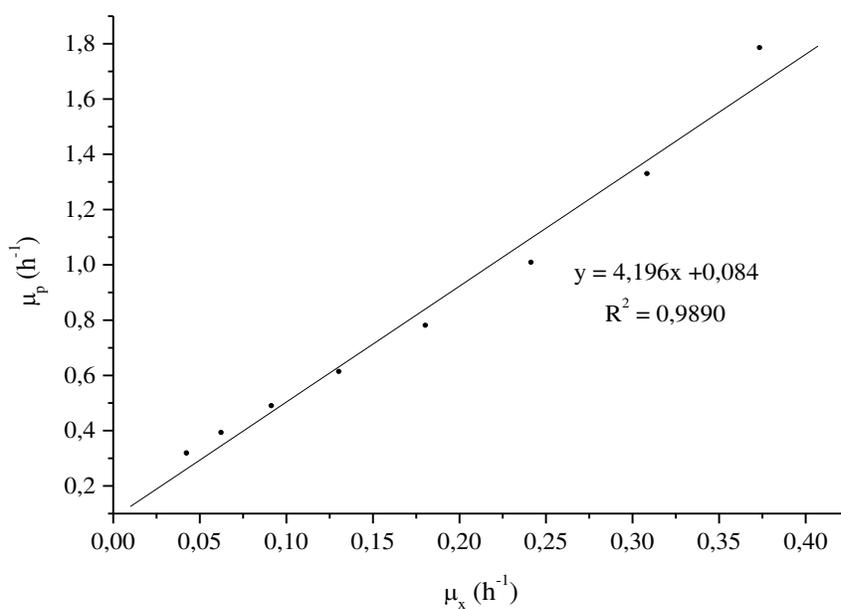


Figura 4.1.7a - Velocidade específica de produção de ácido láctico como função da velocidade específica de crescimento (determinação de α , β)

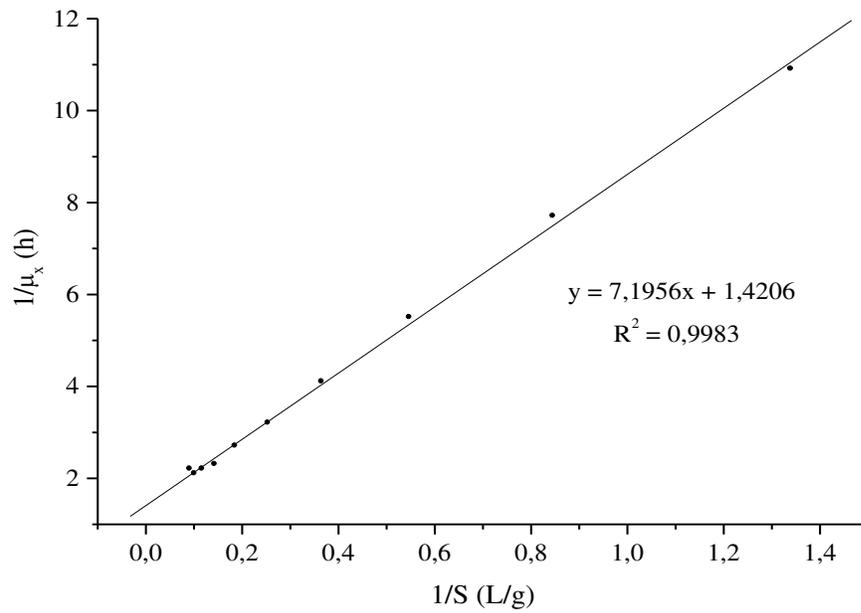


Figura 4.1.7b - Gráfico da equação de Monod linearizada para determinação de μ_{\max} e K_s

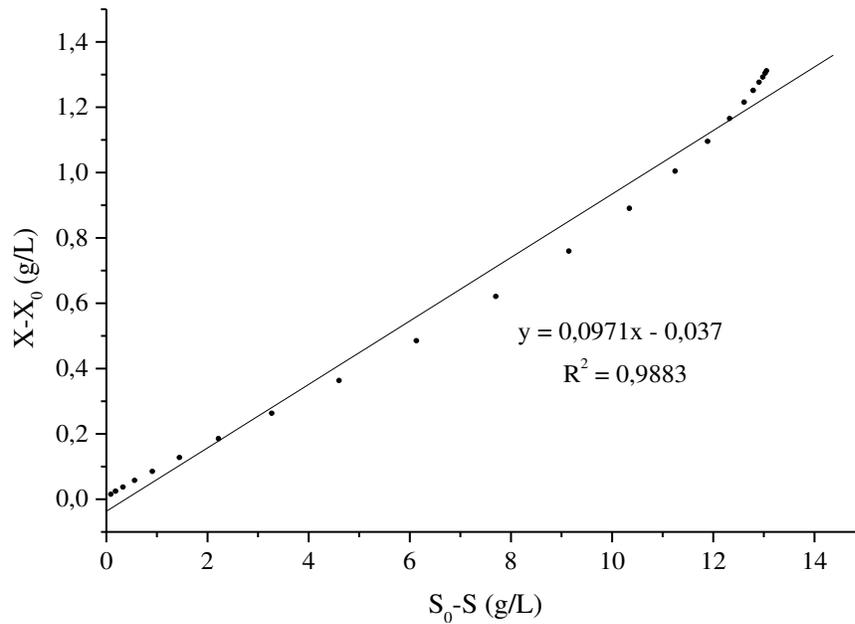


Figura 4.1.7c - Regressão linear ($\Delta X \times \Delta S$) para determinação de $Y_{X/S}$

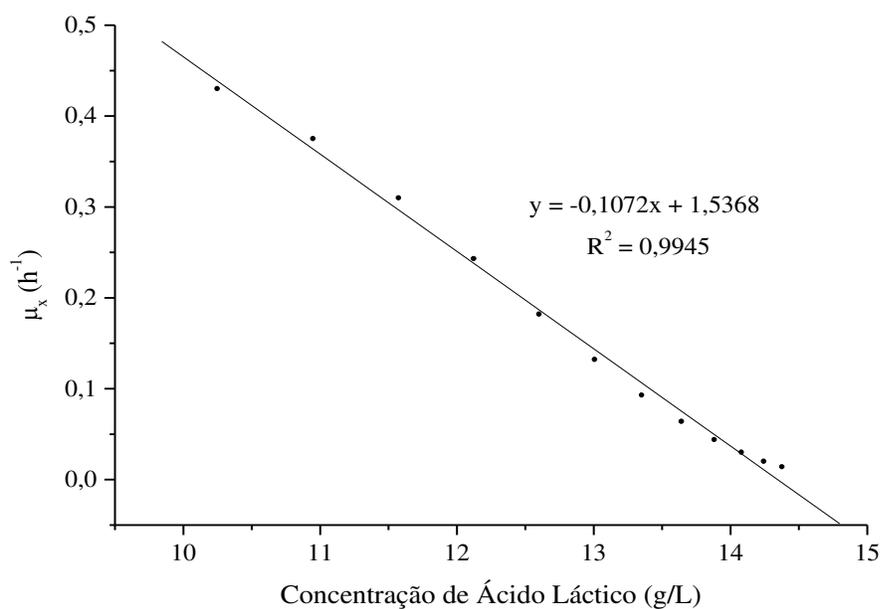


Figura 4.1.8 - Representação da inibição celular pelo produto através do modelo linear de inibição

A Tabela 4.1.3 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos obtidos por regressão linear de acordo com resultados apresentados nas Figuras 4.1.7 (a-c). Estes valores serão usados como estimativa inicial na simulação para ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo.

Tabela 4.1.3 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos dados experimentais da 1ª batelada para produção de ácido láctico

Parâmetro	Valor
α	4,196
β	0,084
K_s (g/L)	5,065
μ_{max} (h^{-1})	0,704
P_{max} (g/L)	30,00
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,097

Para simulação do processo de produção de ácido láctico a partir da fermentação da sacarose por *Lactobacillus plantarum* foram avaliados alguns modelos apresentados na Tabela 2.6.1 (Capítulo II). Os melhores resultados foram obtidos quando o modelo proposto por Levenspiel (produção de produto metabólico e inibitório) foi usado considerando também crescimento num único substrato limitante e inibidor. Para representar a produção de ácido láctico foi usado o modelo proposto por Luedeking e Piret (1959). Os modelos usados na simulação são apresentados nas equações (4.1.16 – 4.1.18)

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X \quad (4.1.16)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X + \beta X \quad (4.1.17)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X \quad (4.1.18)$$

Para estimação dos parâmetros cinéticos do modelo foi usado algoritmo genético. Para ajuste dos parâmetros foi usada a função Sigmoidal (eq. 4.1.2). A Tabela 4.1.4 apresenta os valores das constantes da equação (4.1.2) para as três bateladas (t = 0 h a t = 24h30min; t = 25 h a t = 42h30min; t = 43 h a t = 65h).

Como objetivo de minimizar a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) e encontrar um bom ajuste para os dados experimentais do processo de produção de ácido láctico em batelada, a equação (4.1.19) foi usada como função objetivo na otimização dos parâmetros cinéticos do processo.

$$f = SQR = \sum_{n=1}^{np} \frac{(X_n - X_{\text{exp}n})^2}{X_{\text{expmax}}^2} + \frac{(La_n - La_{\text{exp}n})^2}{La_{\text{expmax}}^2} + \frac{(S_n - S_{\text{exp}n})^2}{S_{\text{expmax}}^2} \quad (4.1.19)$$

Onde, X_n , La_n e S_n são as concentrações de biomassa, ácido láctico e sacarose, respectivamente, computadas pelo modelo nos tempos de amostragem; $X_{\text{exp}n}$, $La_{\text{exp}n}$, $S_{\text{exp}n}$ são as concentrações medidas nos tempos de amostragem; X_{expmax} , La_{expmax} , S_{expmax} são as máximas concentrações de biomassa, ácido láctico e sacarose obtidas durante o processo.

Com código binário de seis parâmetros (67 interações), algoritmo genético é aplicado no modelo do processo de fermentação láctica e, com os dados experimentais da fermentação em batelada, os valores dos parâmetros (μ_{\max} , K_s , P_{\max} , α , β e $Y_{x/s}$) das equações (4.1.16 - 4.1.18) são calculados a partir da minimização da função objetivo (eq. 4.1.19). Os valores foram obtidos com 200 gerações e 821 crossovers. As Figuras 4.1.9 (a-c) apresentam os resultados da simulação do processo. É possível visualizar que modelo cinético estimado foi adequado para ajustar os dados experimentais do processo. A Tabela 4.1.5 apresenta os valores dos parâmetros do modelo estimados por algoritmo genético.

Tabela 4.1.4 - Constantes da função sigmoideal

Variáveis	Constantes				
	R ²	a	b	c	d
1ª Batelada					
Ácido Láctico	0,9868	-1,501	16,456	3,990	2,330
Biomassa	0,9965	0,107	1,327	6,788	1,211
Sacarose	0,9994	-0,028	13,160	6,251	-1,059
2ª Batelada					
Ácido Láctico	0,9997	14,848	8,863	28,803	0,713
Biomassa	0,9079	1,576	0,606	30,841	0,547
Sacarose	0,9913	-0,109	10,122	28,653	-1,447
3ª Batelada					
Ácido Láctico	0,9991	22,326	7,075	45,047	1,197
Biomassa	0,7292	-2,723	5,166	41,508	0,638
Sacarose	0,9976	-0,052	8,406	44,809	-1,380

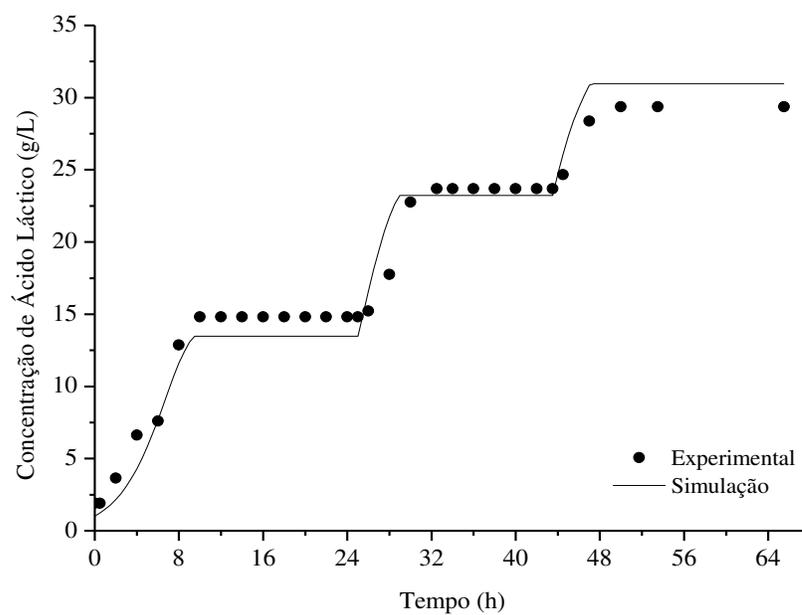


Figura 4.1.9a - Perfil de concentração de ácido láctico

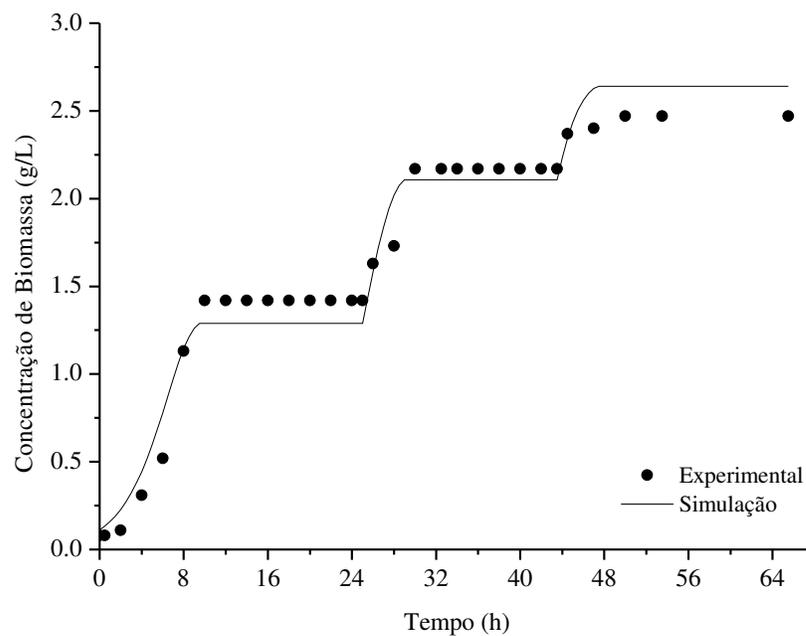


Figura 4.1.9b - Perfil de concentração de biomassa

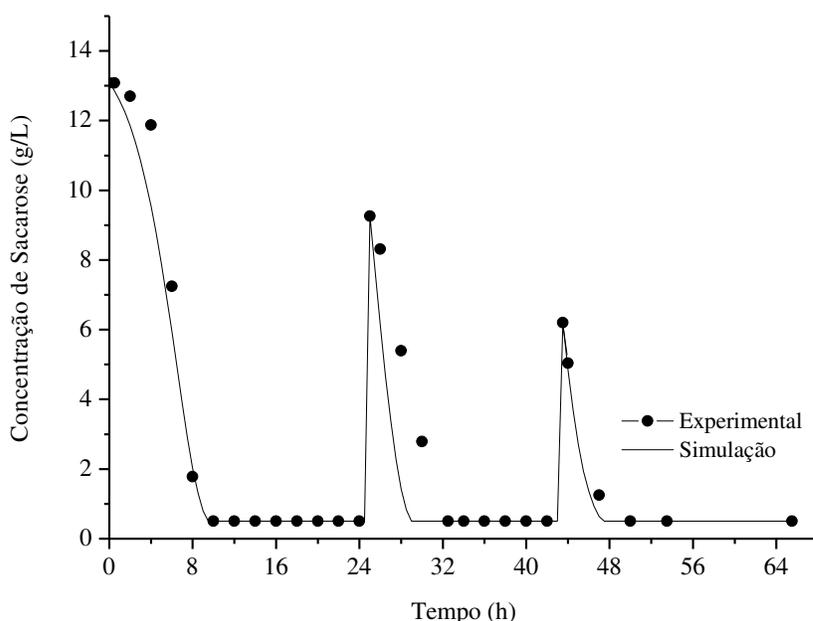

Figura 4.1.9c - Perfil de concentração de sacarose

Tabela 4.1.5 - Valores dos parâmetros cinéticos do modelo estimados por algoritmo genético

Parâmetros					
μ_{\max} (h ⁻¹)	K_S (g/L)	P_{\max} (L/g)	α (g/g)	β (g/h)	$Y_{X/S}$ (g/g)
0,461	6,317	39,40	8,810	0,286	0,086

O modelo de fermentação láctica também foi estendido para o processo batelada alimentada e contínuo.

4.1.8 Processo batelada alimentada

Para o processo batelada alimenta foram considerados os modelos apresentados nas equações (4.1.20 – 4.1.21)

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X + \frac{F}{V} (X_0 - X) \quad (4.1.20)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(\alpha \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) + \beta \right) X + \frac{F}{V} (P_0 - P) \quad (4.1.21)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X + \frac{F}{V} (S_0 - S) \quad (4.1.22)$$

$$V = V_0 + F \times t \quad (4.1.23)$$

$$D = \frac{F}{V} \quad (4.1.24)$$

$$D = \frac{F}{V_0 + F \times t} \quad (4.1.25)$$

No processo batelada alimentada a taxa de diluição (D) diminui ao longo do tempo, com o aumento do volume. Assim, o substrato residual diminui a medida que D diminui, resultando num aumento da concentração celular.

Os valores dos parâmetros cinéticos do modelo usados na simulação para o processo batelada alimentada, foram estimados usando algoritmo genético e a função objetivo, apresentada na equação (4.1.19). A Tabela 4.1.6 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos do modelo estimados. Para avaliar o comportamento do processo foram realizadas simulações variando a vazão de alimentação (F). A concentração inicial de sacarose e biomassa no processo foi de 13 g/L e 1,2 g/L, respectivamente, e, após 8 horas de processo foi iniciada a alimentação com uma concentração de sacarose de 33 g/L. As Figuras 4.1.10 – 4.1.13 apresentam os resultados obtidos na simulação do processo em batelada alimentada, com diferentes vazões de alimentação.

Tabela 4.1.6 - Valores dos parâmetros cinéticos do modelo estimados por algoritmo genético

Parâmetros					
μ_{\max} (h ⁻¹)	K_S (g/L)	P_{\max} (g/L)	α (g/g)	β (g/h)	$Y_{X/S}$ (g/g)
0,832	5,578	70,00	5,613	0,246	0,081

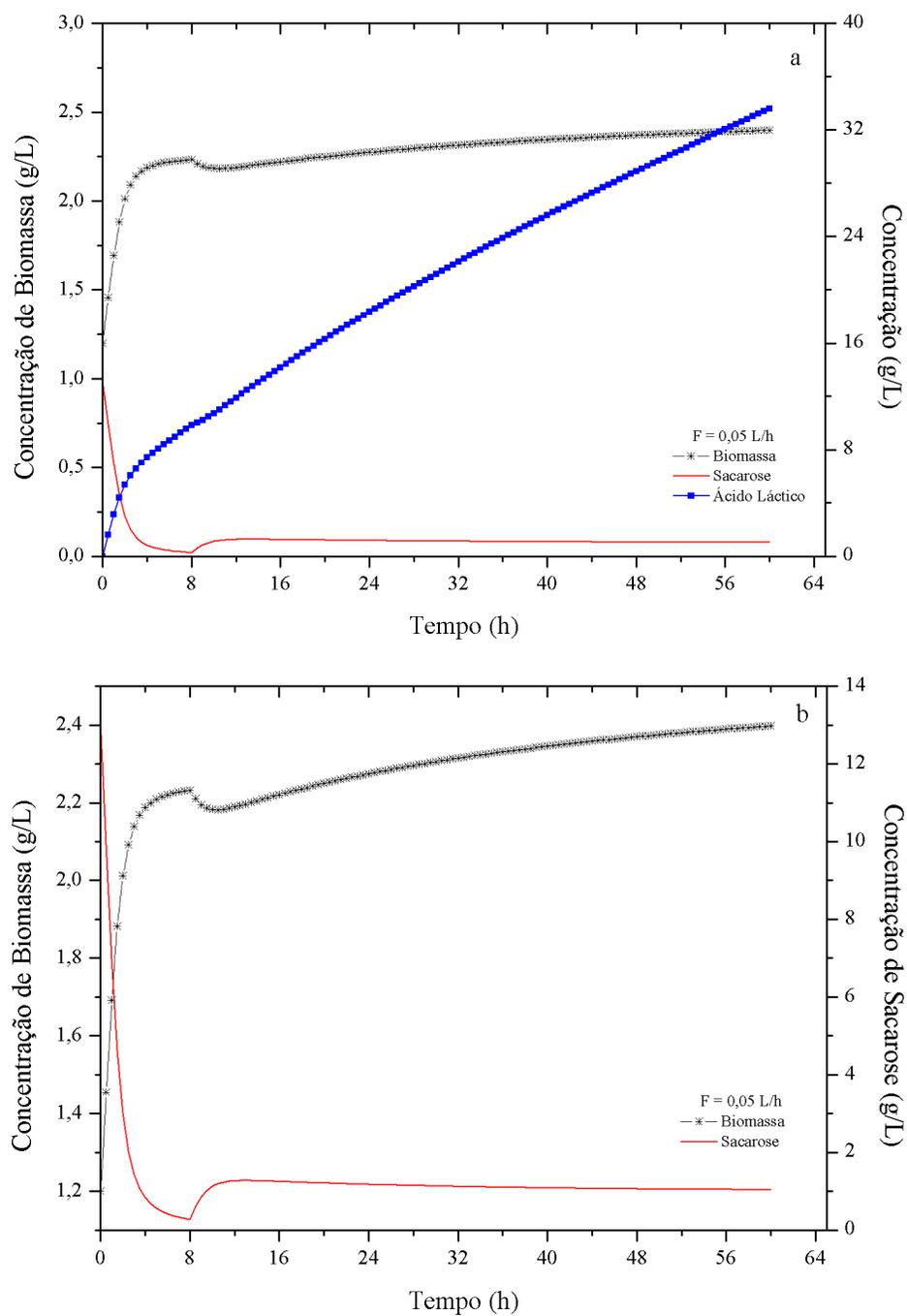


Figura 4.1.10 - Perfis de concentrações obtidos no processo batelada alimentada ($F = 0,05 \text{ L/h}$)

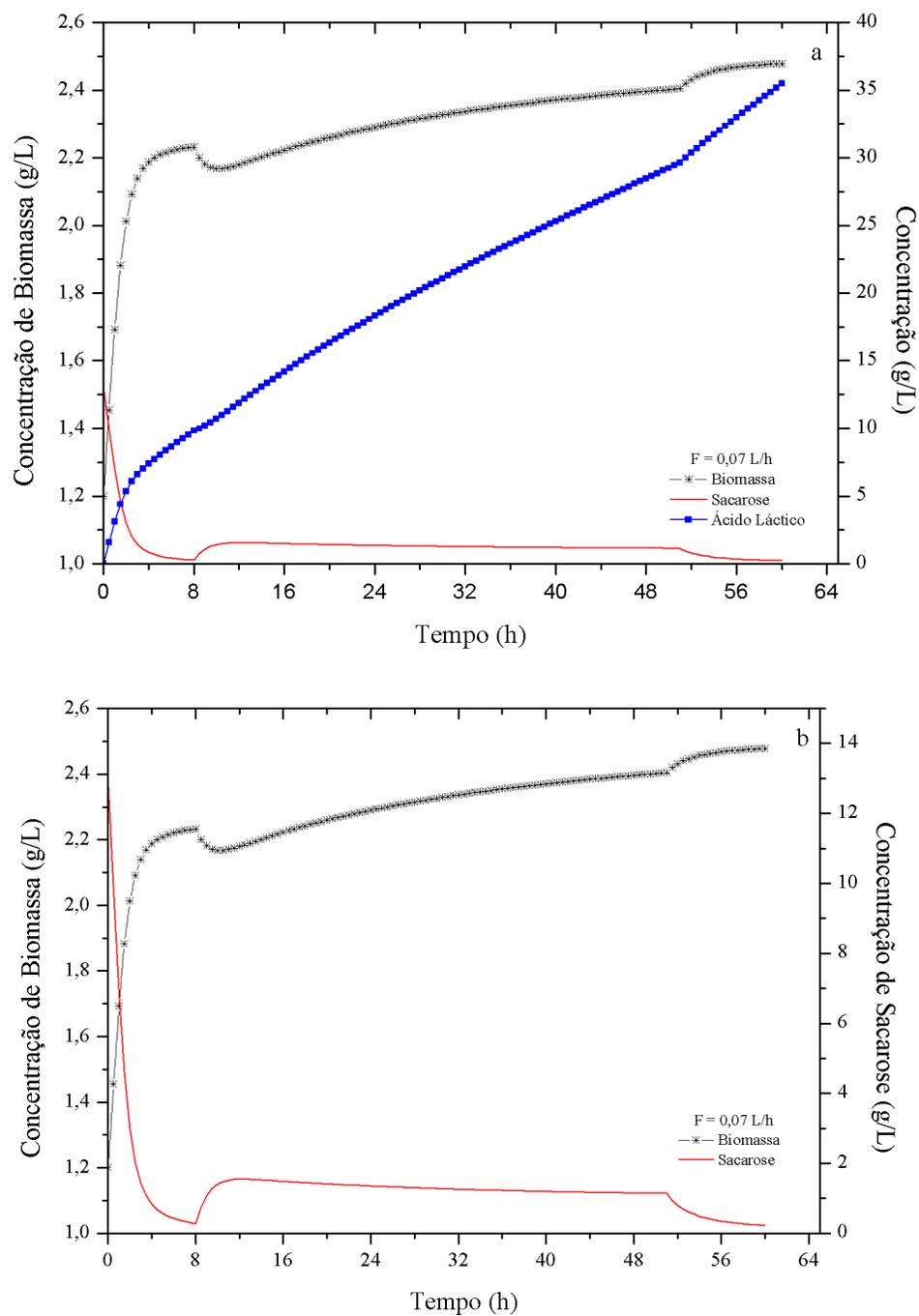


Figura 4.1.11 - Perfis de concentrações obtidos no processo batelada alimentada ($F = 0,07 \text{ L/h}$)

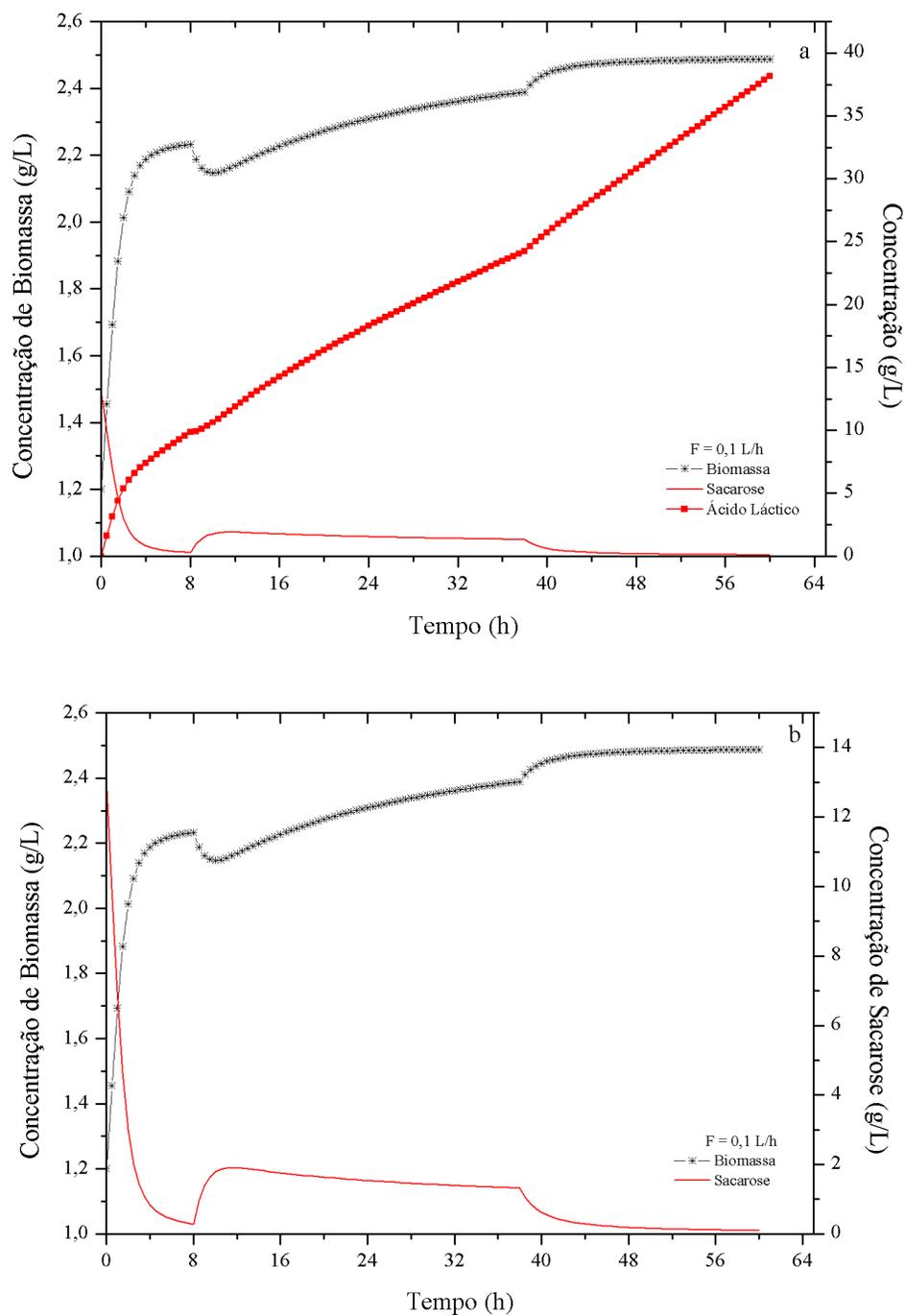


Figura 4.1.12 - Perfis de concentrações obtidos no processo batelada alimentada ($F = 0,1 \text{ L/h}$)

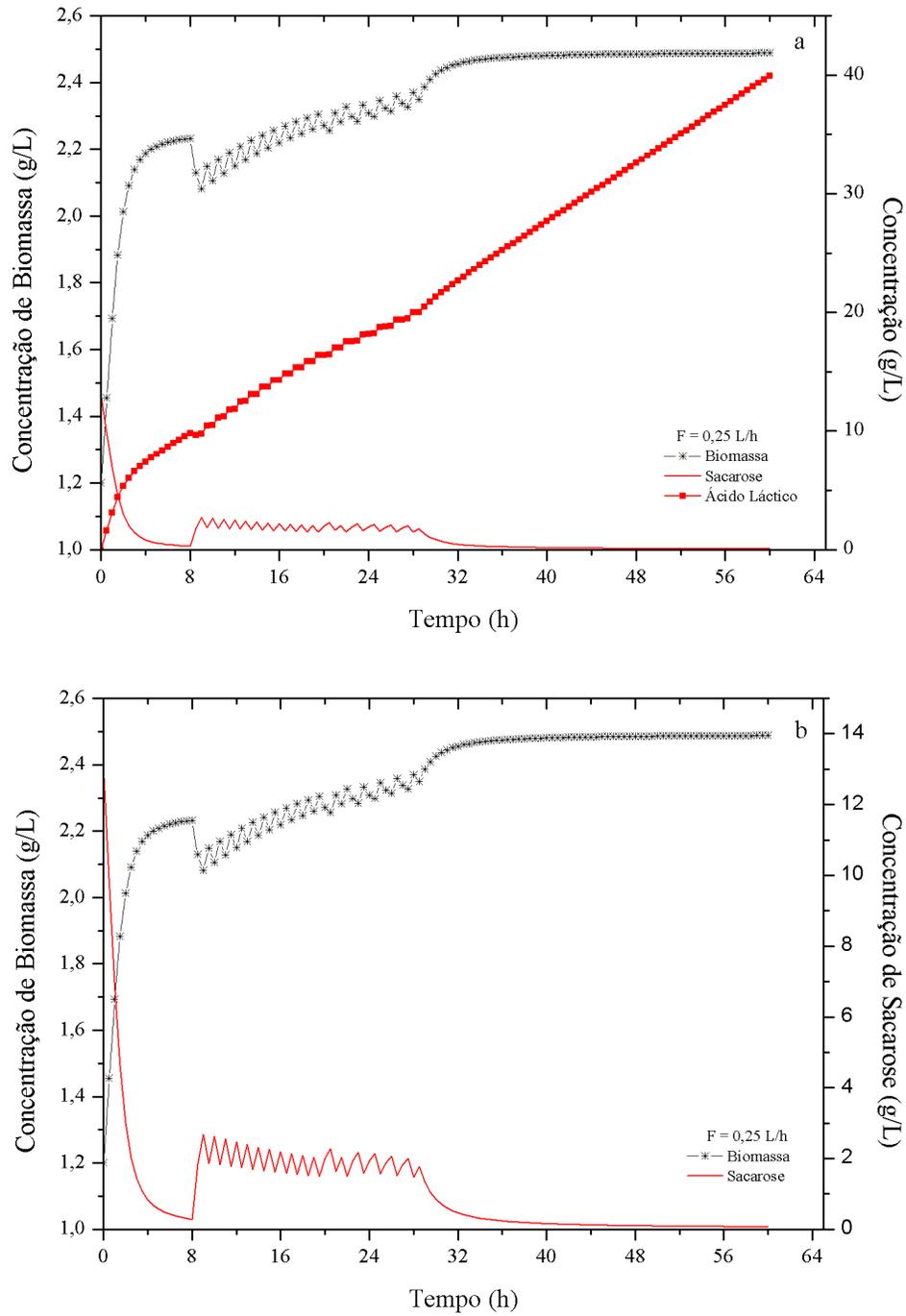


Figura 4.1.13 - Perfis de concentrações obtidos no processo batelada alimentada ($F = 0,25 \text{ L/h}$)

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 4.1.10 – 4.1.13, é possível perceber que a medida que a vazão de alimentação (F) aumenta, maior a concentração final de ácido lático e, a concentração de biomassa atinge um estado pseudo-estacionário em um menor período de tempo.

4.1.9 Processo contínuo

Para o processo contínuo foram considerados os modelos apresentados nas equações (4.1.26 – 4.1.28), e os valores dos parâmetros cinéticos usados foram os mesmos do processo batelada alimentada (Tabela 4.1.6).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X + D(X_0 - X) \quad (4.1.26)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(\alpha \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) + \beta \right) X + D(P_0 - P) \quad (4.1.27)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X + D(S_0 - S) \quad (4.1.28)$$

No estado estacionário a concentração celular permanece constante, assim

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{dX}{dt} = 0 \quad (4.1.29)$$

$$\mu X = DX \quad (4.1.30)$$

$$\mu = D \quad (4.1.31)$$

Portanto, em condições de estado estacionário a velocidade específica de crescimento é controlada pela taxa de diluição.

Em processo batelada, o microrganismo irá crescer em sua velocidade específica máxima, portanto, os processos contínuos devem ser operados com taxas de diluição (D) abaixo da velocidade específica máxima de crescimento (Facciotti, 2001).

O processo de fermentação contínua normalmente tem início em um processo descontínuo, ou seja, alimenta o meio de cultura no fermentador, inocula com o microrganismo e

após algum tempo de operação descontínua, inicia-se a alimentação do meio de cultura e retirada do vinho (Facciotti, 2001). Assim, foi considerada uma concentração inicial de células e de substrato no biorreator de 1,2 g/L e 5,1 g/L, respectivamente. Após um período de operação foi iniciada a alimentação com uma concentração de substrato de 33 g/L e uma taxa de diluição de $0,034 \text{ h}^{-1}$.

Para avaliar o comportamento dos perfis de concentração de ácido láctico, biomassa e sacarose ao longo do tempo em função da taxa de diluição, foram realizadas simulações com diferentes taxas, conforme mostra as Figuras 4.1.14 – 4.1.16.

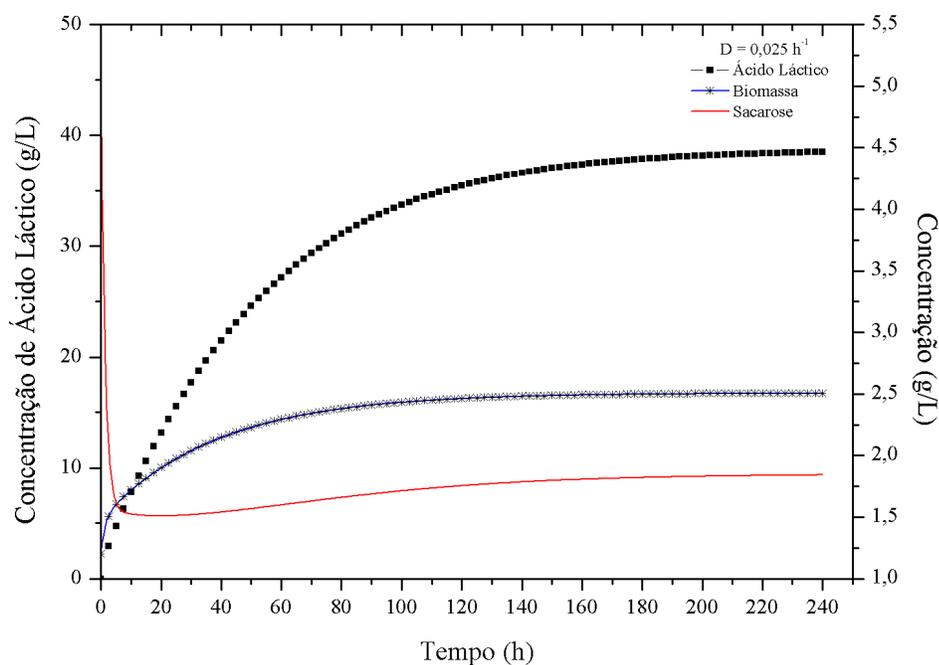


Figura 4.1.14 - Perfis de concentrações obtidos no processo contínuo ($D = 0,025 \text{ h}^{-1}$)

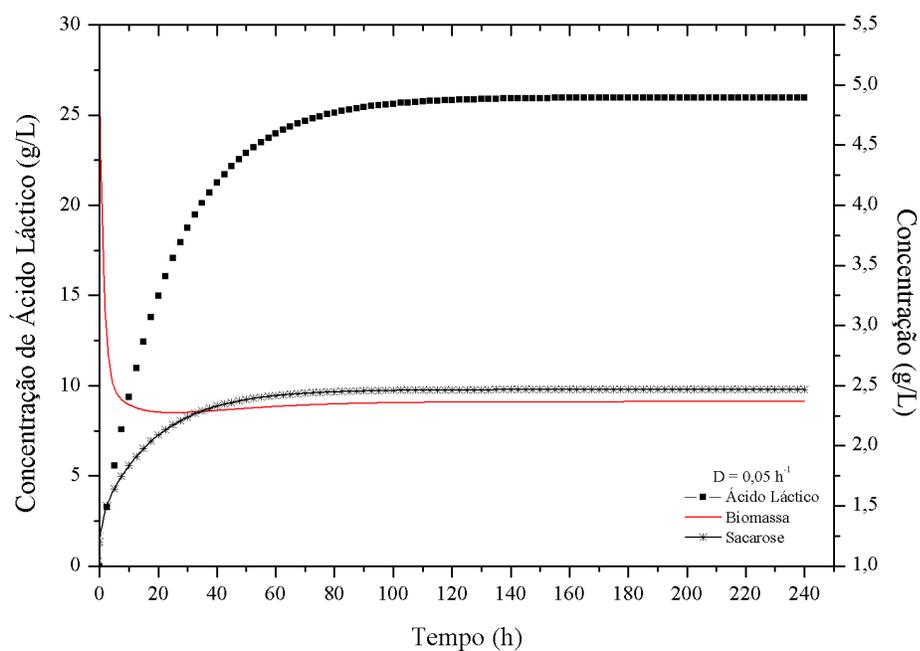


Figura 4.1.15 - Perfis de concentrações obtidos no processo contínuo ($D = 0,05 \text{ L/h}$)

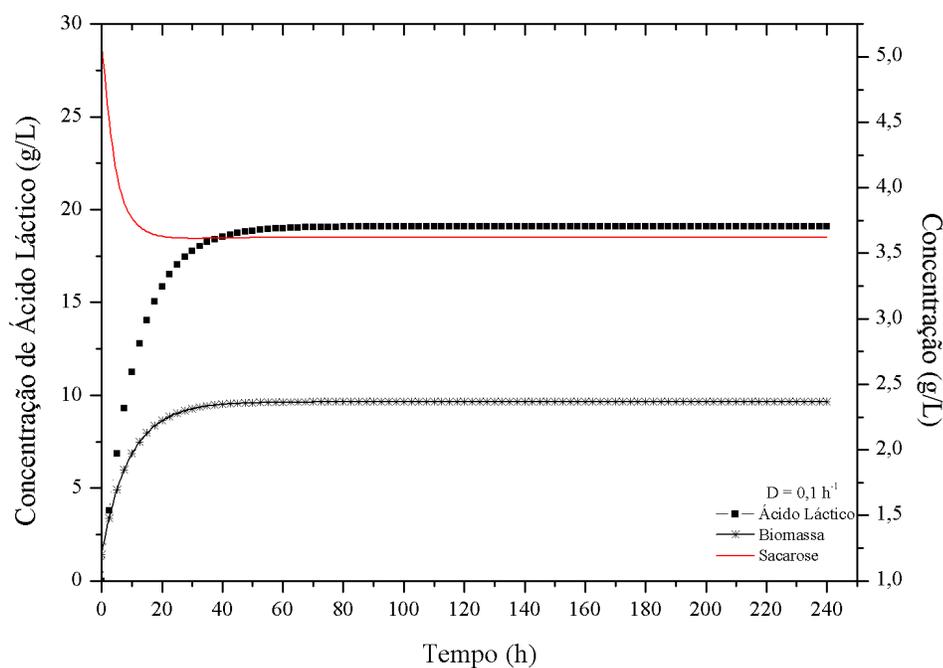


Figura 4.1.16 - Perfis de concentrações obtidos no processo contínuo ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$)

De acordo com os perfis de concentrações apresentados nas Figuras 4.1.14 – 4.1.16, a concentração de ácido láctico é favorecida quando taxas de diluições menores são usadas. A

concentração celular atinge um estado pseudo-estacionário em um menor período de tempo, quando a taxa de diluição aumenta.

Em processos contínuos, é de fundamental importância conhecer o comportamento das concentrações de biomassa, produto e substrato, no estado estacionário, em função da taxa de diluição, a fim de se determinar condições operacionais que levam à alta produtividade (Facciotti, 2001). Em função disso, foi avaliada a influência da taxa de diluição (D), no estado estacionário, sobre as concentrações de biomassa, produto e substrato, bem como sobre suas produtividades, conforme mostram as Figuras 4.1.17 e 4.1.18 .

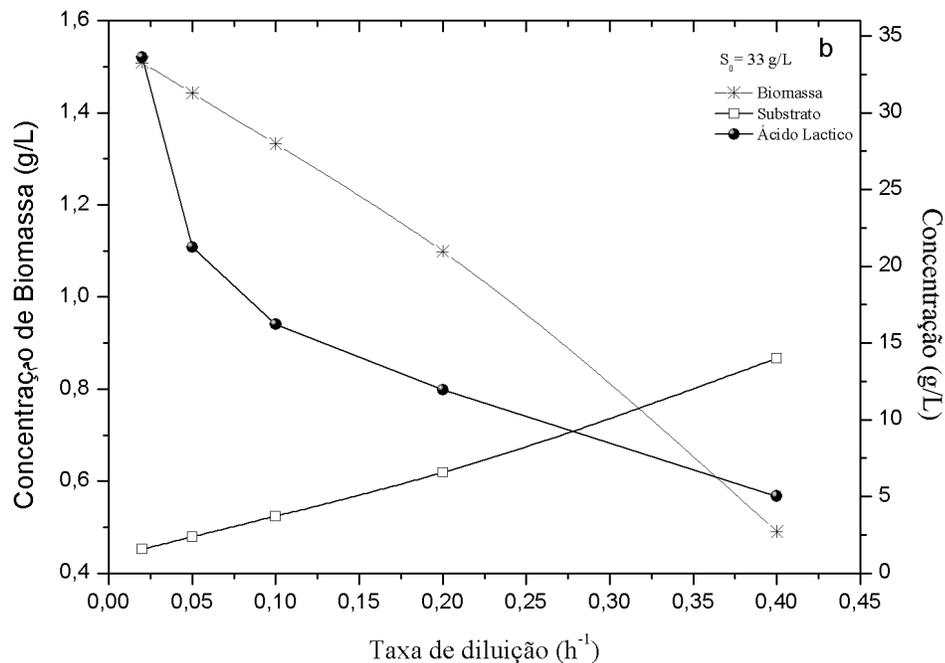


Figura 4.1.17 - Perfis de concentração no estado estacionário em função da taxa de diluição (D)

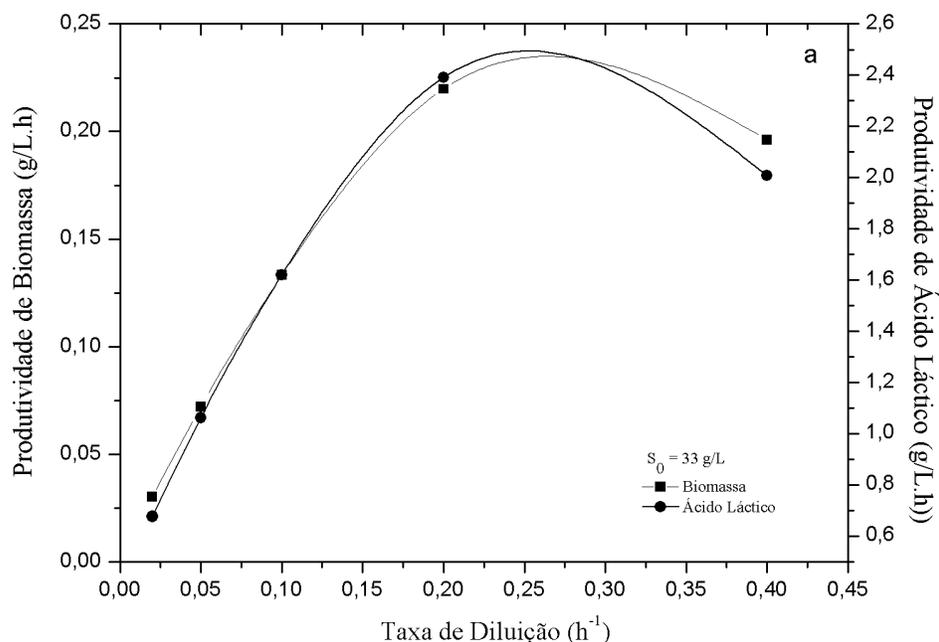


Figura 4.1.18 - Produtividade em função da taxa de diluição (D)

Conforme Figura 4.1.17, é possível perceber que taxas de diluições altas favorecem a concentração de substrato, reduzindo a concentração de células e de produto. No entanto, em taxas de diluições baixas, o substrato é extensivamente consumido, favorecendo o crescimento celular, como também a concentração de produto. A taxa de diluição ideal para se obter maior concentração de produto e de células, deve estar entre $0,01$ e $0,05 h^{-1}$ para o processo em estudo. Porém, para se obter maiores produtividades de ácido lático e de células deve-se trabalhar com taxa de diluição de aproximadamente $0,20 h^{-1}$, como mostrado na Figura 4.1.18.

Uma estratégia de controle ótimo foi desenvolvida a fim de otimizar e controlar a concentração final de ácido lático pela manipulação da taxa de diluição (D), buscando evitar a inibição do crescimento celular por altas concentrações de sacarose, bem como por altas concentrações de ácido na saída do biorreator. Foram determinados os perfis “ótimos” de concentração de ácido lático e biomassa ao longo do processo. Esses perfis foram definidos como *set point* do processo. Assim, a função de controle ótimo foi formulada com o objetivo de minimizar a diferença entre a concentração da simulação atual ($Y_{i_j}^{sim}$) e do perfil ótimo ($Y_{i_j}^{opt}$). A concentração de substrato na saída do biorreator (S_f) foi incluída na função objetivo, como uma restrição, conforme equação (4.1.32).

$$\min_{F(t)} F = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (Y_{ij}^{sim} - Y_{ij}^{opt})^2 + \phi \langle g(x) \rangle^2 \quad (4.1.32)$$

Sujeita a seguinte restrição:

$$S \leq 2 \text{ g/L}$$

A violação da restrição é penalizada durante a avaliação da função objetivo. O parâmetro ‘ ϕ ’ permite variar a importância relativa da concentração de substrato nas saídas do biorreator sobre as concentrações de ácido láctico e biomassa ao longo do processo.

A partir da estratégia de controle ótimo desenvolvida, uma taxa de diluição de $0,034 \text{ h}^{-1}$, foi obtida, com uma concentração de alimentação de substrato de 33 g/L .

A Figura 4.1.19 mostra os perfis de concentração de biomassa, ácido láctico e sacarose obtidos no processo contínuo usando taxa de diluição (D) de $0,034 \text{ h}^{-1}$, determinada pela estratégia de otimização.

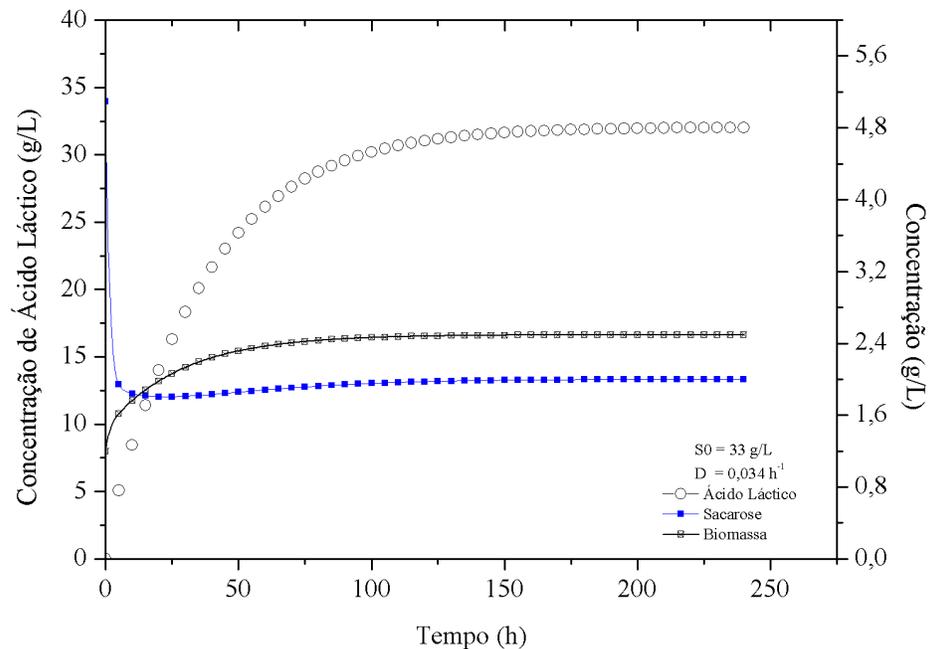


Figura 4.1.19 -Perfis de concentração obtidos no processo contínuo usando D ótimo

4.1.10 Controle do Processo Fermentativo Contínuo

Para finalizar a simulação do processo fermentativo de ácido láctico a partir da sacarose, foi aplicada estratégia de controle *feedback* no processo contínuo, com o objetivo de regular a concentração de ácido láctico na saída do biorreator a partir da manipulação dos parâmetros operacionais. O algoritmo de controle aplicado foi o preditivo DMC (do inglês – *Dynamic Matrix Control*). Para avaliar o desempenho do controlador, a taxa de diluição (D) foi usada como variável manipulada e a concentração de ácido láctico (P), como variável controlada e, foi realizada uma perturbação degrau de -5% na concentração de substrato alimentada no biorreator. Diversas simulações foram realizadas, variando os parâmetros do controlador, a saber, horizonte de convolução (NM), horizonte de controle (NC), horizonte de predição mínima (NP_{\min}) e máxima (NP_{\max}), constante de trajetória de referência (α_R), fator de supressão (λ), a fim de determinar os melhores valores e, conseqüentemente, obter a melhor ação de controle sobre o processo. As Figuras 4.1.20 – 4.1.24 mostram os resultados obtidos nas simulações realizadas.

O modelo utilizado pelo controlador DMC, geralmente, é obtido a partir da aplicação de um degrau nas variáveis de entrada do processo, seguido da correspondente medição das respostas das variáveis de saída. Através, do modelo de resposta ao degrau, pode-se prever as mudanças futuras das saídas do processo como uma combinação linear das variações nas entradas (Qin e Badgwell, 1997).

Os perfis de concentração de ácido láctico e da taxa de diluição, apresentados nas Figuras 4.1.20 – 4.1.24, mostram a eficiência do controlador DMC aplicado ao processo fermentativo de produção láctica. Através da análise dos perfis da concentração de ácido láctico e da taxa de diluição obtidos em cada simulação e, considerando o tempo necessário para alcançar o *set point*, os melhores resultados foram obtidos quando usado um horizonte de convolução (NM) de 20, constante de trajetória de referência (α_R) de 0,45 e um fator de supressão (λ) de 150. De acordo com os resultados apresentados nas figuras a constante de trajetória de referência (α_R) e o fator de supressão (λ) são os parâmetros que mais influenciam o processo. Quanto maior o valor do fator de supressão mais suave a ação do controlador e mais estável o processo.

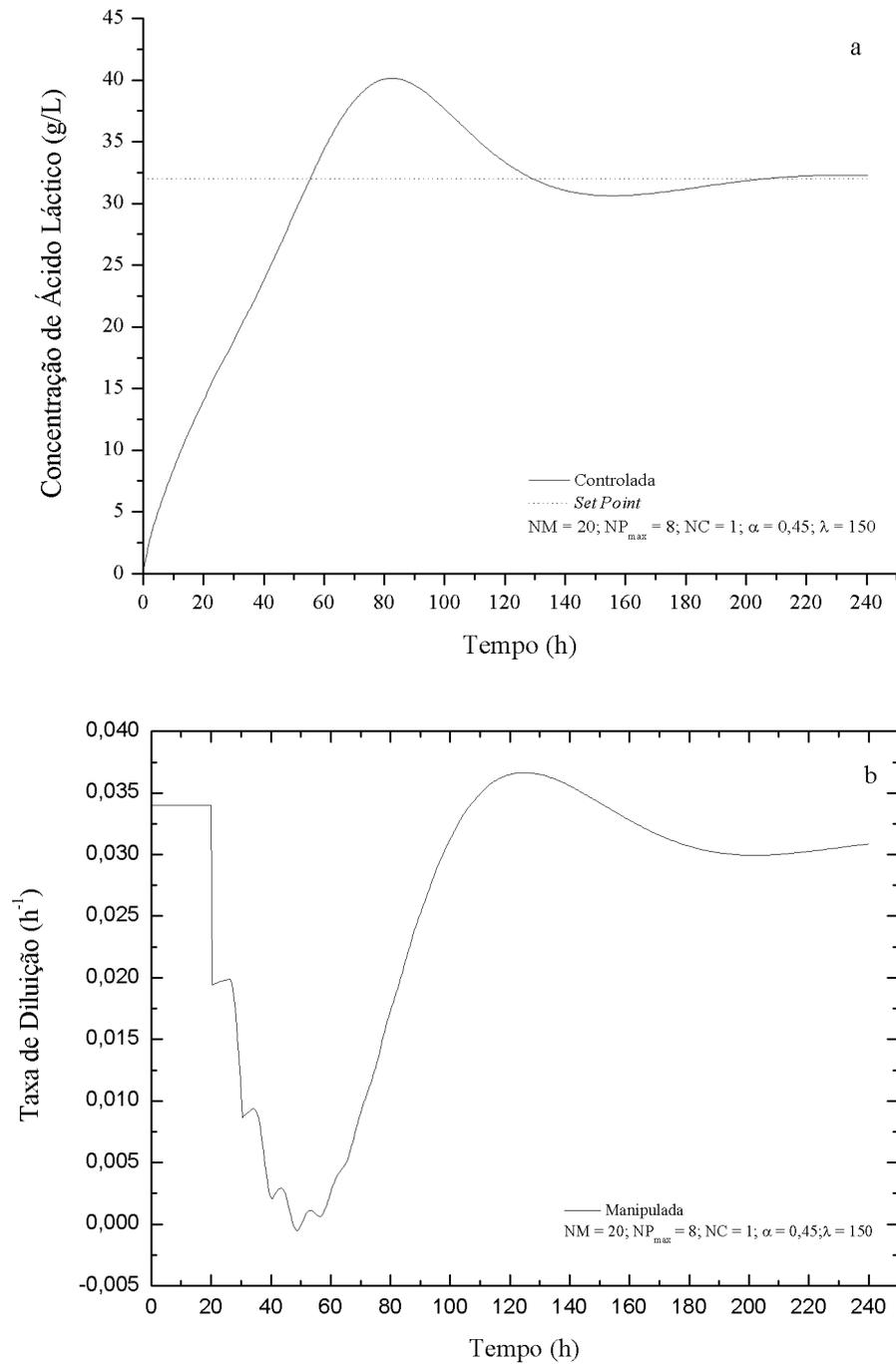


Figura 4.1.20 - Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC

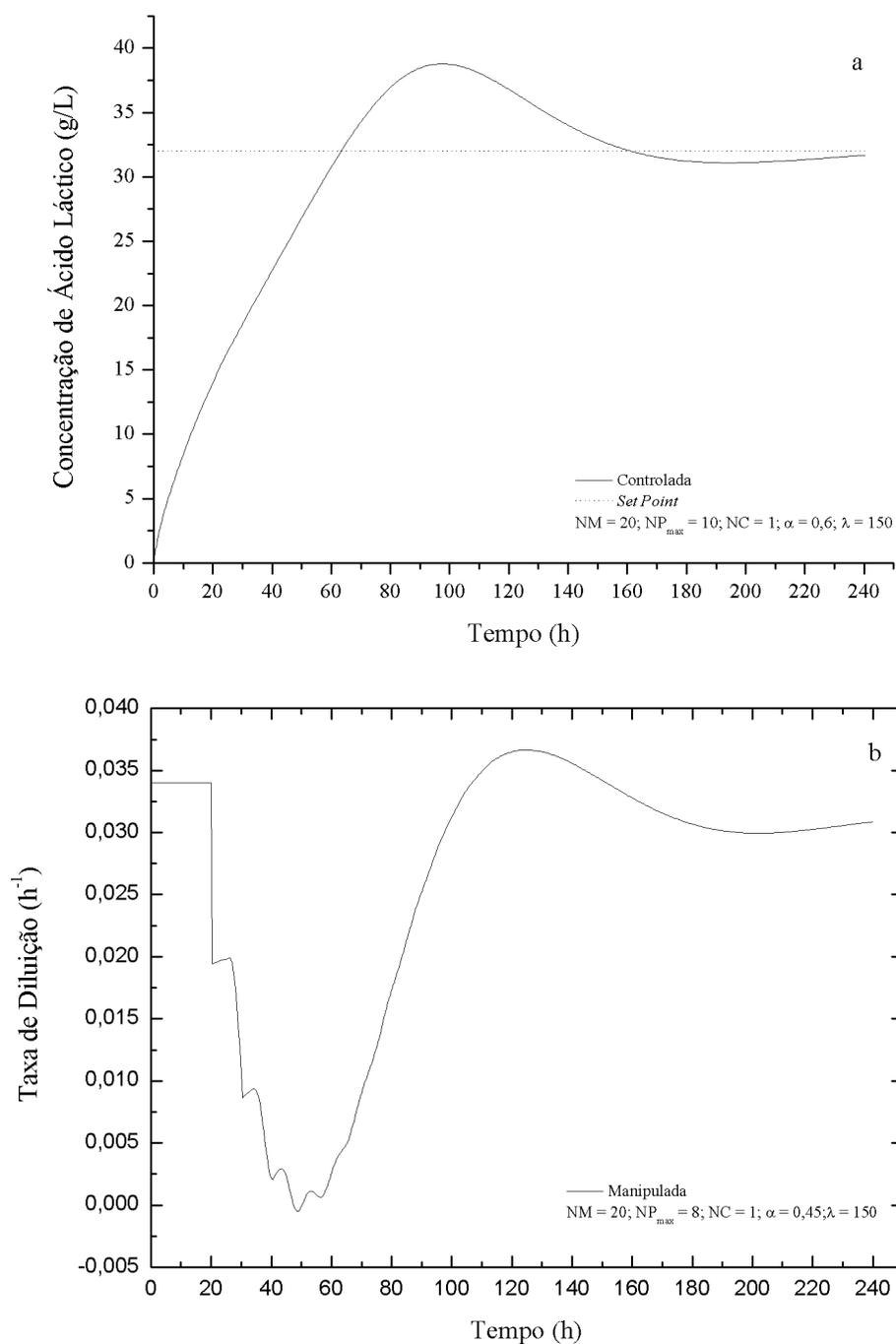


Figura 4.1.21 - Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC

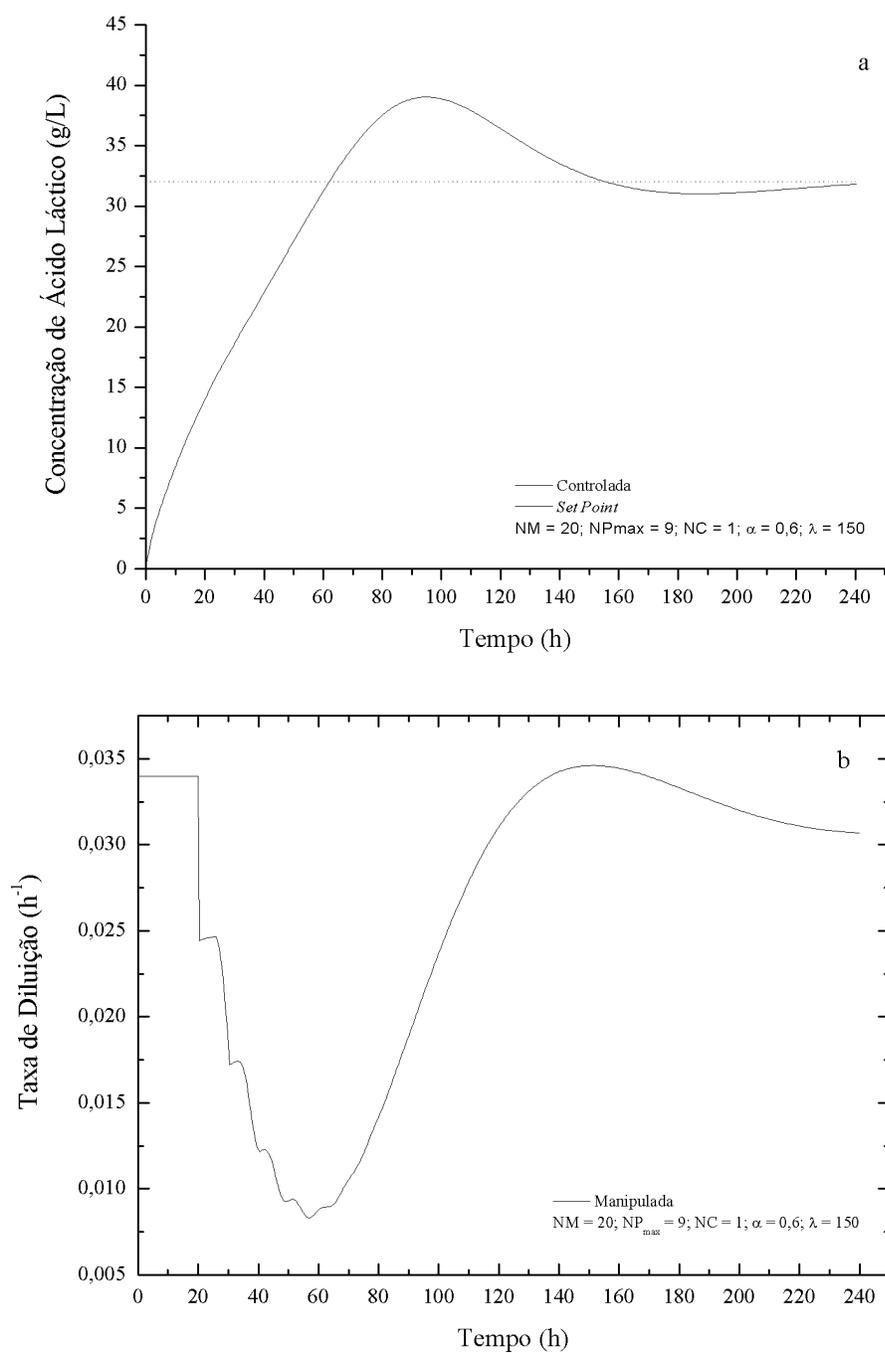


Figura 4.1.22 - Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC

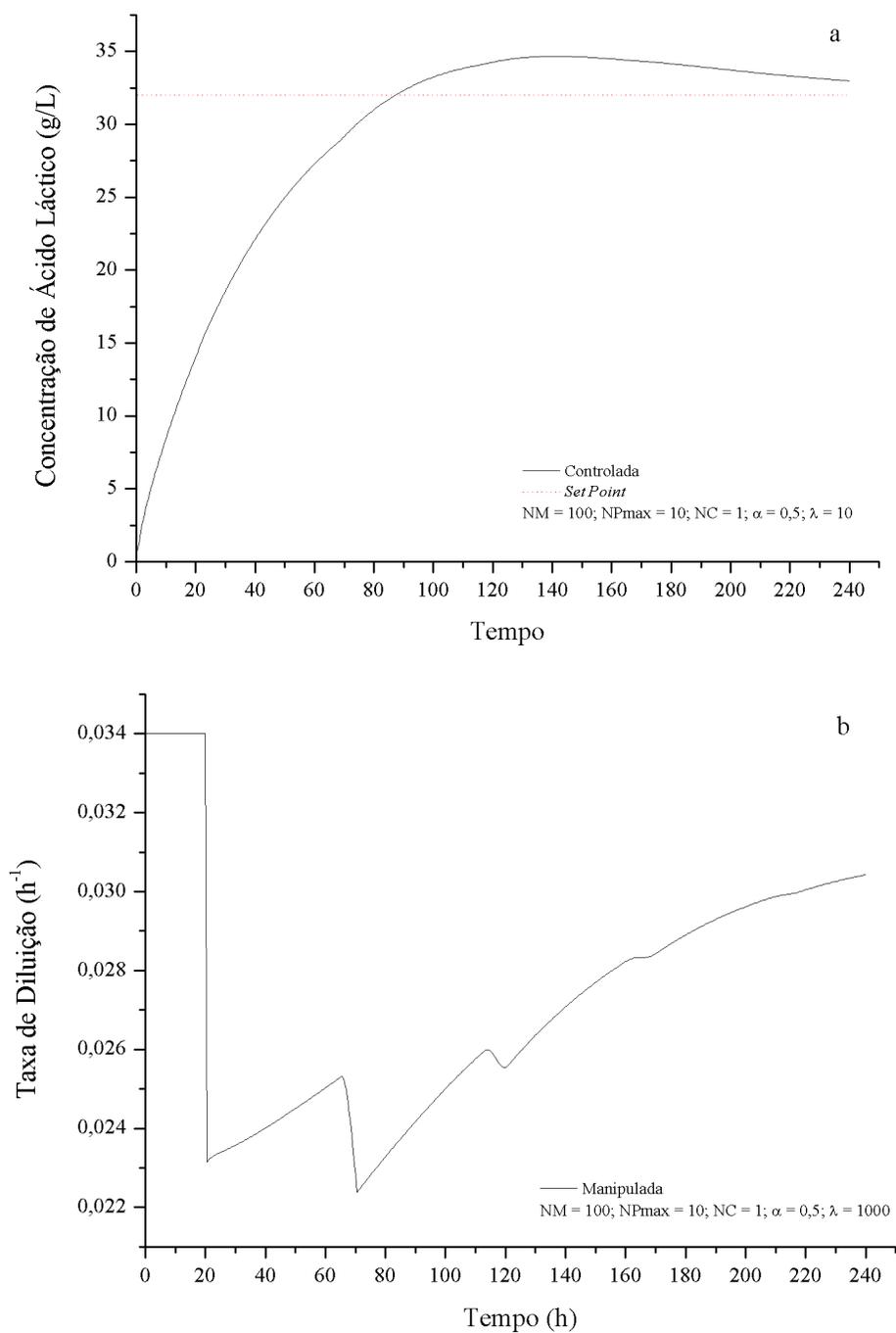


Figura 4.1.23 - Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC

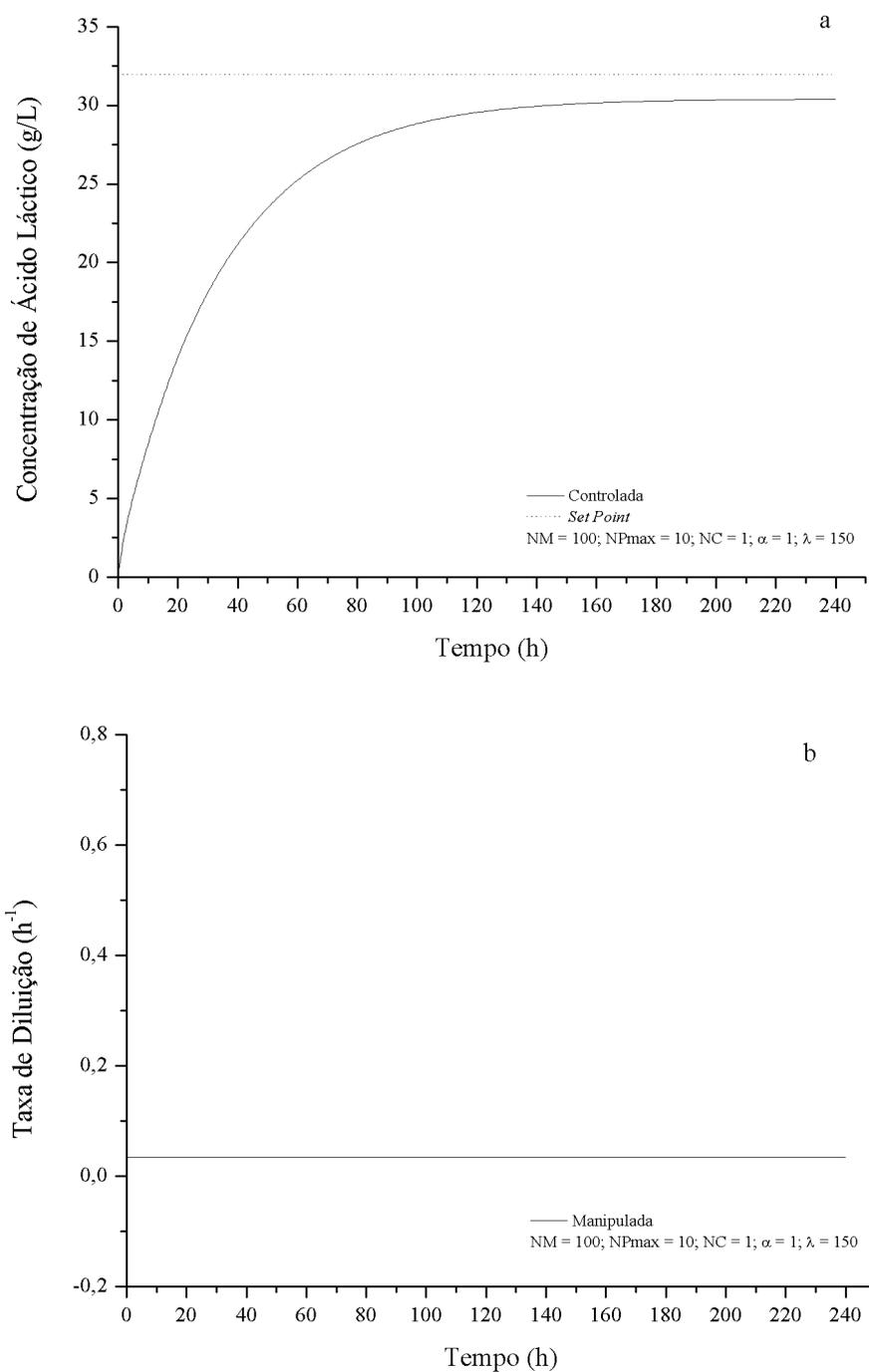


Figura 4.1.24 - Respostas obtidas em malha fechada alterando os parâmetros do controlador DMC

Através da aplicação da estratégia de controle no processo fermentativo foi possível determinar o melhor valor para a variável manipulada de forma a aumentar a concentração de ácido láctico, bem como controlar o processo dentro das especificações desejadas.

Na sequência serão apresentados alguns resultados obtidos a partir da fermentação de melaço de cana para produção de ácido láctico.

4.2 Fermentação de Melaço de Cana para Produção de Ácido Láctico

Antes de realizar a fermentação em um biorreator, decidiu-se fazer ensaios em Shaker para definir as melhores condições e composições do meio que seriam usadas na fermentação. Para produção de ácido láctico foi usado *Lactobacillus plantarum*, porém os ensaios foram realizados com as três cepas, a saber, 7, 25 e 27, selecionadas na primeira etapa do trabalho, apresentada no Capítulo II.

Foram realizados 14 ensaios para cada cepa usando diferentes composições, totalizando 42 ensaios. As amostras foram coletadas em 6, 10 e 24 horas. Cada amostra foi analisada em HPLC para determinação das concentrações de ácido láctico, ácido acético e açúcares residuais. A metodologia analítica usada para a quantificação foi a mesma usada na fermentação apresentada no item 4.1.

O melaço de cana-de-açúcar usado nos ensaios e na fermentação foi fornecido pela Usina Iracema. Inicialmente uma amostra do melaço foi analisada em HPLC para determinação das concentrações de açúcares, conforme composição apresentada na Tabela 4.2.1. A Tabela 4.2.2 apresenta a composição dos meios usados nos 14 ensaios desenvolvidos. O melaço foi diluído em água destilada até obter a concentração desejada de açúcar. Depois de diluído o mel foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min. Os ensaios foram realizados em Shaker com agitação de 150 rpm e 37 °C. O volume de cada ensaio foi de 350 mL.

Tabela 4.2.1 – Concentrações de açúcares no melaço de cana analisado

Concentrações de açúcar em 100 g de melaço	
Frutose	3,08 (% m/m)
Glicose	3,46 (% m/m)
Sacarose	54,5 (% m/m)
ART	61,04 (% m/m)

Tabela 4.2.2 - Composição dos meios

Ensaio	Melaço (g/L)	Fosfato (KH₂PO₄) (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Peptona (g/L)
1	24,6	0,0	0,0	0,0
2	49,2	0,0	0,0	0,0
3	24,6	0,0	2,5	0,0
4	49,2	0,0	2,5	0,0
5	24,6	0,0	5,0	0,0
6	49,2	0,0	5,0	0,0
7	24,6	0,35	2,5	0,0
8	49,2	0,35	2,5	0,0
9	24,6	0,35	5,0	0,0
10	49,2	0,35	5,0	0,0
11	24,6	0,55	5,0	0,0
12	49,2	0,55	5,0	0,0
13	49,2	0,0	0,0	2,5
14	49,2	0,0	2,5	2,5

A Figura 4.2.1 apresenta os rendimentos de ácido láctico e ácido acético obtidos em cada ensaio, usando as cepas 7, 25 e 27. O rendimento foi calculado de acordo com a equação (4.2.1).

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_o}{S_0 - S} \times 100 \quad (4.2.1)$$

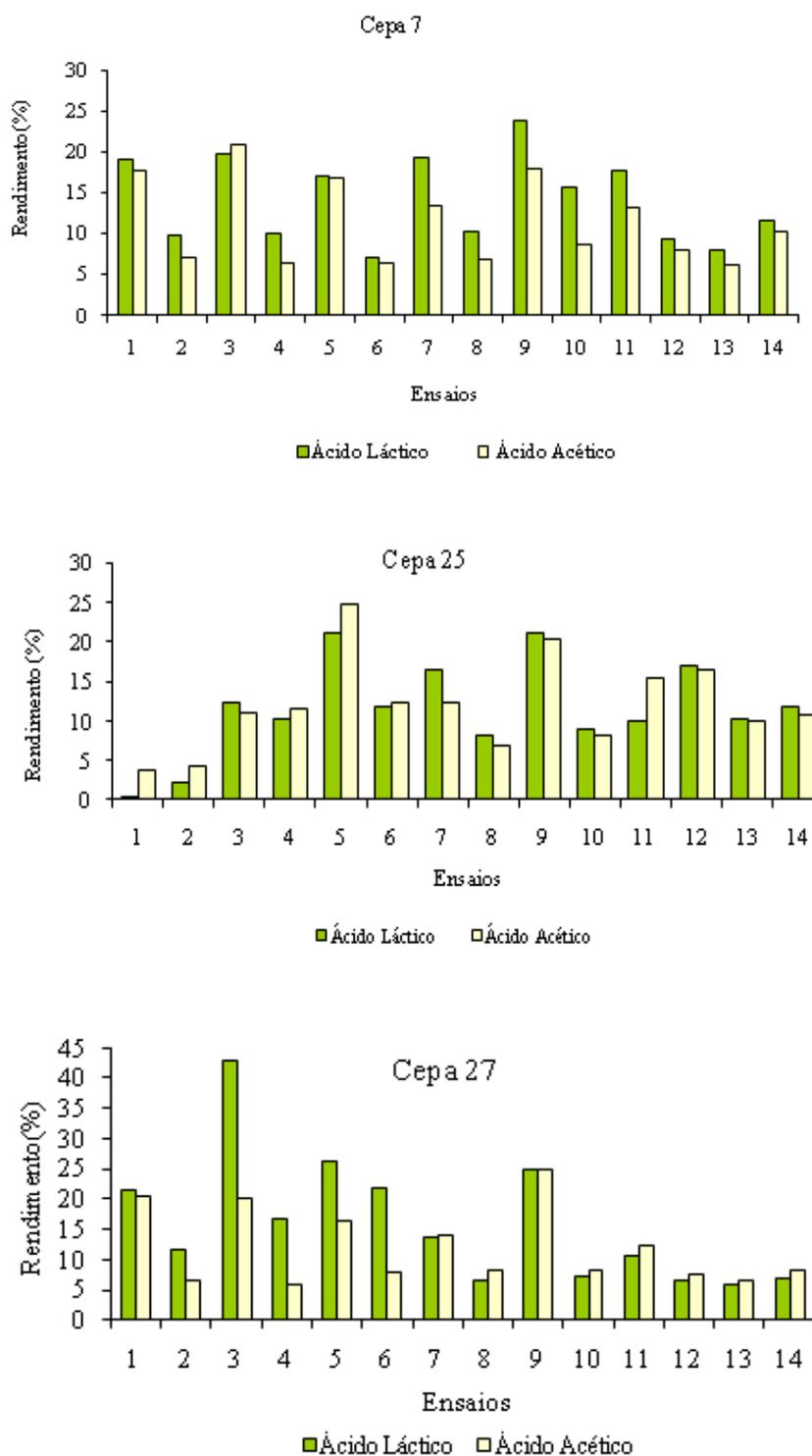


Figura 4.2.1 - Rendimentos de ácido lático e ácido acético usando melão de cana como fonte de carboidrato

A cepa 27 apresentou um melhor desempenho quando melaço de cana foi usado como fonte de carboidrato, resultando num rendimento de 42% de ácido láctico no ensaio 3. Os melhores rendimentos foram obtidos quando concentrações menores de melaço foram usadas. A produção de ácido acético pode ter sido beneficiada pela falta de controle de pH.

Todos os ensaios foram realizados com melaço sem pré-tratamento, e os resultados comprovam a habilidade das três cepas fermentarem sacarose, que é o açúcar presente em maior quantidade na cana, eliminando assim, a necessidade de hidrólise da sacarose, ou seja, a quebra dos carboidratos da sacarose, transformando-os em glicose e frutose. A hidrólise da sacarose é geralmente feita pela enzima invertase.

Na etapa de *screening* apresentada no Capítulo III foi selecionada a cepa nº 25 como sendo a melhor para fermentar sacarose para produção de ácido láctico, portanto decidiu-se usar a mesma cepa na fermentação de melaço de cana. A composição do meio fermentativo foi baseada nos resultados apresentados na Tabela 4.2.1 (ensaio 3).

Buscando-se diminuir ou eliminar a formação de ácido acético e aumentar a concentração e o rendimento de ácido láctico na fermentação, o pH foi ajustado em 5,0 pela adição de NaOH (4M) e foi usada uma concentração inicial de sacarose de 12 g/L, obtida a partir do melaço de cana diluído. Pulsos de melaço e de melaço sintético foram realizados ao longo do processo fermentativo. O melaço usado na fermentação foi enriquecido com 5 g/L de extrato de levedura.

A fermentação foi realizada em um biorreator modelo BioFlo III, marca New Brunswick Scientific. O volume de trabalho foi de 2.500 mL com 14 % (v/v) de inóculo. A temperatura e a agitação da fermentação foram mantidas constantes em 34 °C e 200 rpm, respectivamente. Os parâmetros do processo (temperatura, pH, produção de CO₂ e turbidez) foram monitorados e controlados pelo software LabVIEW®. O vinho final da fermentação foi centrifugado, filtrado e concentrado para ser usado no processo de esterificação de ácido láctico com etanol para produção de lactato de etila.

Depois de finalizada a fermentação, os parâmetros cinéticos do processo foram determinados a partir dos resultados experimentais. De posse dos parâmetros cinéticos, um modelo matemático foi desenvolvido para representar a produção de ácido láctico a partir da

fermentação da sacarose obtida do melaço de cana-de-açúcar. Os detalhes desta fermentação, como também o modelo matemático desenvolvido são apresentados no artigo a seguir, publicado na *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 227-237, 2010.

Production of Lactic Acid from Sucrose:

Strain Selection, Fermentation and Kinetic Modeling

B. H. Lunelli^a, R. R. Andrade^a, D. I. P. Atala^b, M. R. Wolf Maciel^a, F. Maugeri Filho^c,
R. Maciel Filho^a

^aLaboratory of Optimization, Design and Advanced Control
Department of Chemical Processes, School of Chemical Engineering
State University of Campinas, P.O. Box: 6066, ZIP: 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^bSugarcane Technology Center,
Fazenda Santo Antônio, P.O. Box: 162, ZIP: 13400-970, Piracicaba, SP, Brazil

^cLaboratory of Bioprocess Engineering
School of Food Engineering, State University of Campinas, P. O. Box: 6121, Campinas, SP, Brazil
E-mail: betania@feq.unicamp.br

Abstract: Lactic acid is an important product arising from the anaerobic fermentation of sugars. It is used in the pharmaceutical, cosmetic, chemical and food industries as well as for biodegradable polymers and green solvents production. In this work, several bacterial strains were isolated from industrial ethanol fermentation and the most efficient strain for lactic acid production was selected. The fermentation was conducted in a batch system under anaerobic conditions for 50 hours at a temperature of 34°C, a pH value of 5.0, and an initial sucrose concentration of 12 g/L using diluted sugarcane molasses. Throughout the process, pulses of molasses were added in order to avoid the cell growth inhibition due to high sugar concentration as well as increased lactic acid concentrations. At the end of the fermentation about 90% of sucrose was consumed to produce lactic acid and cells. A kinetic model has been developed to simulate the batch lactic acid fermentation results. The data obtained from the fermentation were used for determining the kinetic parameters of the model. The developed model for lactic acid production, growth cell and sugar consumption simulates the experimental data well.

Key words: fermentation, sugarcane molasses, ethanol fermentation contaminants, lactic acid, kinetic modeling

Introduction

Lactic acid was first discovered in 1780 and has two stereoisomers called D(-)-lactic acid and L(+)-lactic acid. Lactic acid is used in the food, cosmetic, pharmaceutical, chemicals, and biodegradable polymer production. It is a naturally occurring organic acid that can be produced by fermentative or chemical synthesis. The chemical synthesis is mainly based on the hydrolysis of lactonitrile by strong acid, where a racemic mixture of the two forms (D(-) and L(+)) lactic acid is produced (1). In fermentative process the isomers either D(-) or L(+) of lactic acid, depending on the stereospecificity of the lactate dehydrogenase, are present in the cells. Racemic mixture may be formed when both L- and D- lactate dehydrogenase are present in the same cell or in rare cases by action of an inducible lactate racemic and combination with a constitutive L- lactate dehydrogenase (2).

The biotechnological production of lactic acid has received a significant interest, since it is an attractive process for both, environmental viewpoint and economic, due the combination of the low cost of production from sugarcane fermentation, reduction of dependency of fossil based feedstock and biocatalyst use.

Lactic acid is produced in fermentation using lactic acid bacteria (LAB) or fungi. The desirable characteristics of industrial microorganisms are their ability to rapidly and completely ferment cheap raw materials, requiring minimal amount of nitrogenous substances, providing high yields of preferred stereospecific lactic acid under conditions of low pH and high temperature, production of low amounts of cell mass and negligible amounts of other byproducts (3). The LAB are classified into homofermentative that produce virtually a single product, lactic acid and heterofermentative the bacteria produce other products such as ethanol, CO₂, acetoin, diacetyl formate or acetic acid along with lactic acid (4).

A number of different substrates have been used for the fermentative production of lactic acid by lactic acid bacteria. The carbon source for microbial production of lactic acid can be either sugar in pure form such as glucose, sucrose, lactose or sugar-containing materials such as molasses, whey, and sugarcane bagasse (5). The purest product is obtained when a pure sugar is fermented, resulting in lower purification costs, but this is economically unfavourable, because pure sugars are expensive and lactic acid is a cheap product (6).

In this work, were used several bacterial strains isolated from industrial ethanol fermentation to select the best strain to lactic acid production. In a next stage fermentation was carried out the fermentation using sucrose obtained from sugarcane molasses for lactic acid production. The sugarcane is a renewable carbon source, abundant and cheap and is a major culture developed in Brazil. The production and yield are growing due to agriculture advances as well as are the industrial process related to sugar and bioethanol production.

Materials and Methods

Screening – It was isolated a total of sixty strains of LAB from samples of industrial ethanol fermentation obtained from different ethanol plants and belonging to bacteria culture collection of the Sugarcane Technology Center.

The strains were initially plated in MRS (Man-Rogosa-Sharpe) agar and incubated at 35⁰C for 48 h. After incubation time, the stains were classified on basis of their morphological characteristics (shape, color, size). Next, the strains were cultivated in medium containing yeast extract: 4.0 g/L; casein: 5.0 g/L; K₂HPO₄: 0.55 g/L; KCl: 0.425 g/L; CaCl₂: 0.125 g/L; MgSO₄: 0.125 g/L; MnSO₄: 0.0025 g/L; FeCl₃: 0.0025 g/L at 35⁰C without pH control. Three flasks were prepared with culture medium for each strain with different carbon source (glucose, fructose and sucrose). Glucose, fructose and sucrose were added to concentrations of 50 g/L. The pH and cell density

were measured after 48 h of incubation and the strains were classified on basis of their byproduct formation and gas production, cell growth, flocculation, pH and temperature tolerance and ability to ferment sucrose, an abundant component of the sugarcane molasses.

The three best strains selected were used in a fractional experimental design 2^{4-1} developed to determined the optimum conditions. The pH, cell density and lactic acid concentration were measured after 24 h, 48 h and 72 h. The yield and lactic acid end concentration were the dependent variables of the experimental design. After developing the experimental design, some experiments were repeated and pure sucrose was replaced by sugarcane molasses. The best strain and the optimum condition were used in fermentative process for lactic acid production.

Microorganism – 1 mL of the selected culture was plated in MRS agar for activation and incubated for 48 h at 35⁰C. A loop of this pre-culture was transferred under anaerobic conditions to test tube containing 10 mL of MRS medium and inoculated at 35⁰C for 48h. This culture suspension was inoculated into five test tube with 10 mL of MRS fresh each and incubated for 24 h. Finally, the five aliquots of culture suspension were transferred to Erlenmeyer flasks containing 450 mL of MRS fresh and cultivated at 34 ⁰C and 150 rpm for about 17 h. After incubation 350 mL of this inoculum was used in the fermentation.

Fermentation – Fermentation was carried out in a 3 L New Brunswick Scientific BioFlo III bioreactor with 2.5 L working volume. Sugarcane molasses (54 % sucrose w/w) without pre-treatment was diluted with distilled water to obtained sucrose initial concentration of 12 g/L approximately. The fermentation medium was enriched with 5 g/L of yeast extract.

The temperature was maintained at 34 ⁰C, the agitation speed at 200 rpm and pH at 5.0 by adding 4 M NaOH. The fermentation was performed under anaerobic conditions. The LabVIEW® software was used for monitoring and controlling process parameters during fermentation.

After the sucrose be completely consumed it was carried out a pulse of molasses diluted (12 g/L of sucrose) in the process and in approximately 32 hours a synthetic molasses pulse was added in order of avoid the inhibition of the cell growth by high sucrose concentration as well as increase the lactic acid end concentration. The total time of fermentation was approximately 50 h and the time of the batch was about 9 h. The experimental data obtained from batch fermentation with sucrose initial concentration of 12 g/L were used for the determination of kinetic parameters.

Analytic methods – samples were aseptically withdrawn from bioreactor at approximately 2 h intervals during fermentation and utilized for appraise the cell growth, lactic acid production, sucrose consumption and byproduct formations. The samples were centrifuged at 2000 rpm for 20 min. The biomass was washed twice with distilled water and again centrifuged and dried at 75⁰C for 48 h. The supernatants were used for determining the lactic acid, sucrose and by-products (acetic acid and ethanol) concentration in HPLC (High Performance Liquid Chromatography) equipped with refractive index and UV-visible detectors connected in series and a Bio-Rad Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm) at 37⁰C and 4mM H₂SO₄ was used as mobile phase (pH 2.8) at a flow rate of 0.6 mL/min and sample injection volume of 25 µl. Lactic acid concentrations were also estimated from the sodium hydroxide consumption to maintain the fermentation pH constant.

Mathematical Model

In this work was develop an unstructured kinetic model to represent the batch lactic acid fermentative production from sugarcane molasses using a LAB isolated of the industrial ethanol fermentation. The model has three kinetic equations that represent the biomass, lactic acid and sucrose concentration and was based on the Luedeking-Piret model for growth associated and

non-growth associated lactic acid production (7) and modified to include terms of product inhibition, substrate inhibition and substrate limiting, as shows the equations (1-3).

Biomass concentration

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \left(\frac{S^2}{K_i}\right)} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) X \quad (1)$$

Sucrose concentration

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} - mX \quad (2)$$

Lactic acid concentration

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3)$$

Results and Discussion

A screening was performed using 60 strains of bacteria to select the best for be used in the lactic acid production. Initially, the isolated strains were classified on basis of their morphological characteristics, byproduct formation and gas production, ability to ferment sucrose, pH and temperature tolerance and flocculation. Among the sixty strains studied, only three (strain 7, 25 and 27) showed satisfactory results, i.e., good cell growth, negligible CO₂ production, sucrose consumption and lactic acid production (pH decrease). Table 1 shows the decrease pH value after 48 h of incubation at 35⁰C of the three strains and, the cell viability is shown in the Table 2.

Table 1. pH value after 48 h of incubation at 35⁰C

Strain	pH value	
	t = 0 h	t = 48 h
7	6.37	3.76
25	6.30	3.50
27	6.30	4.10

Table 2. Cell viability in dilution rate of 10⁻⁸

Strain	Cell viability (CFU/mL)
7	1.7 X 10 ⁹
25	3.9 X 10 ⁹
27	4.1 X 10 ⁹

The three selected strains were used in a fractional experimental design 2^{4-1} to determine the fermentation optimum conditions as well as to select the best strain to lactic acid production. The experimental design was carried out in shake flasks stirred at 150 rpm and the strains were cultivated in a synthetic medium using sucrose as carbohydrate source without pH control. The decrease in pH value can be considered as a factor to lactic acid production. Table 3 shows the parameters used in the experimental design 2^{4-1} .

Table 3. Parameters used in the fractional experimental design 2^{4-1}

Parameter	Level		
	-1	0	+1
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	30	35	40
Sucrose concentration (g/L)	15	30	45
Yeast extract concentration (g/L)	2.5	5.0	7.5
Potassium phosphate (K_2HPO_4) (g/L)	0.35	0.55	0.75

The experimental design was realized using two central points and, the maximum sucrose concentration used was of 45 g/L whereas in the experiments initially carried out to evaluate the sixty strains was possible perceive a low sucrose consumption when a concentration of 50 g/L was used. Table 4 shows the fractional experimental design used and the lactic acid yield obtained in each run to three strains. The best experimental results were obtained in the run 5: temperature (30°C); sucrose concentration (15 g/L); yeast extract (7.5 g/L); K_2HPO_4 (0.75 g/L) to the three strains. The highest yield were obtained with strains 25 and 27, but using the strain 27 the acetic acid yield was of 13.5% and 9.7% with the strain 25. The Pareto Chart (Fig. 1a-c) was used to indentify the effects of the parameters on the lactic acid yield after 48 h.

Table 4. Fractional experimental design 2^{4-1} and lactic acid yield

Run	Temperature	Sucrose	Yeast extract	K ₂ HPO ₄	Lactic Acid Yield (%)		
					Strain 7	Strain 25	Strain 27
1	-1	-1	-1	-1	22.3	22.9	22.0
2	1	-1	-1	1	3.3	16.1	18.5
3	-1	1	-1	1	10.5	11.5	10.6
4	1	1	-1	-1	1.6	6.7	7.6
5	-1	-1	1	1	28.3	31.6	31.4
6	1	-1	1	-1	7.2	17.0	20.2
7	-1	1	1	-1	10.2	11.0	11.8
8	1	1	1	1	3.6	7.4	8.8
9	0	0	0	0	9.4	13.3	14.2
10	0	0	0	0	8.1	13.7	14.3

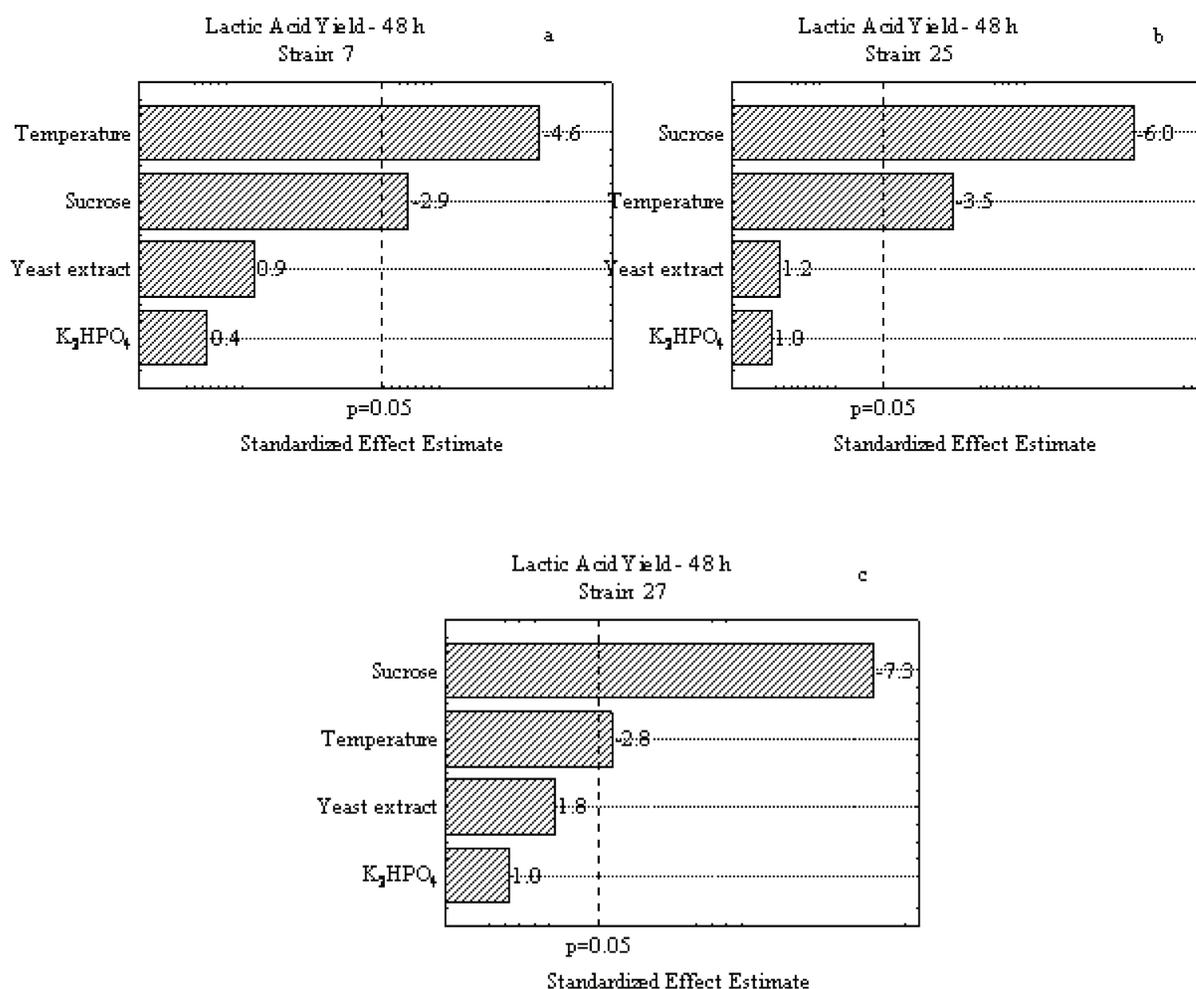


Fig. 1. Pareto chart of effects for lactic acid yield from fractional experimental design 2^{4-1}
 ((a) strain: 7; (b) strain: 25; (c) strain: 27)

The Pareto Chart (Fig. 1a-c) depicts that of the four parameters analyzed only the sucrose concentration and temperature were statistically significant for lactic acid yield at 5% significance level for three strains and both parameters, temperature and sucrose concentration, negatively influence the lactic acid yield. Then, in order to maximize the lactic acid yield the optimal conditions correspond to run 5, i.e. lower sucrose concentration and temperature. As K₂HPO₄ and yeast extract showed no significant influences on lactic acid yield they can be used as central values. Due to lower acetic acid production by strain 25, this was selected to lactic acid production on higher scale. The sucrose concentration ($p = 0.002$) was the parameter that most

influenced in the lactic acid yield when strain 25 (Figure 1b) was used. From the results obtained in the experimental design were realized new experiments using sugarcane molasses instead of pure sucrose. The best result was obtained when 24.6 g/L of sugarcane molasses (~ 12 g/L sucrose) and 5 g/L of yeast extract were used. This medium composition was used for the batch lactic acid production conducted in 3 L bioreactor. The K_2HPO_4 has no influence on the lactic acid yield when sugarcane molasses was used as carbon source, so that it was no used in such case. The Figure 2 shows microscope photography of the selected strain.

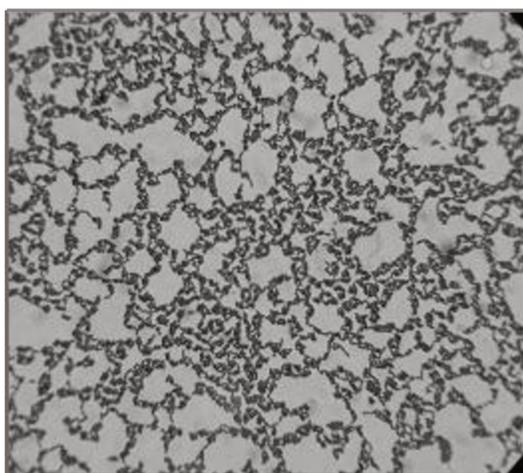


Fig. 2. Microscope photography of the strain 25 (100X)

The fermentation was performed with sucrose initial concentration of 12 g/L (diluted molasses) and throughout the process was carried out pulses of molasses in order of avoid the inhibition of the cell growth by high sucrose concentration as well as increase the lactic acid end concentration. The pulse was added in the fermentation temperature and the volume was kept constant through periodic withdrawn during the process. The Figure 3 shows the changes in concentration of sucrose, lactic acid and biomass which occur during fermentation at pH and constant temperature under anaerobic conditions.

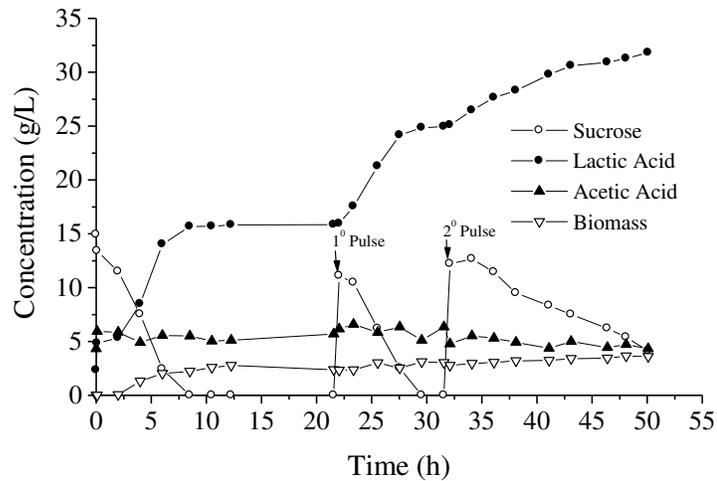


Fig. 3. Fermentative process concentrations

In the fermentation with a sucrose concentration of about 36 g/L (initial concentration, pulse 1 and pulse 2), as shown Fig.3 about 90.0% of sucrose was consumed to produce lactic acid and cells. The yield was calculated by determining the total amount of formed lactic acid per amount of consumed sucrose, as equation (4). The lactic acid yield obtained with sugar cane molasses diluted was very similar with obtained by synthetic molasses (83%).

$$yield = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \times 100 \quad (4)$$

The experimental data obtained from the initial 9 hours of batch fermentation with a starting sucrose concentration of 12 g/L were used to approximate the kinetic parameters and the evaluation of experimental data was carried out by approximating sigmoidal function. Figure 4 shows the experimental data of batch fermentation.

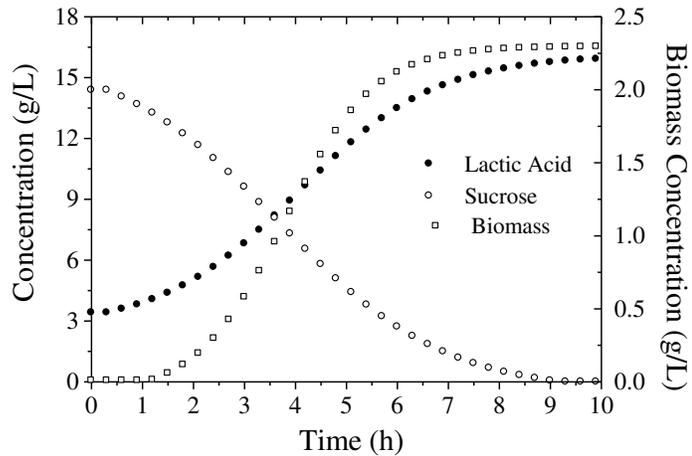


Fig. 4. Concentrations batch process (● lactic acid, □ biomass, o sucrose)

Fermentation time of 9 hours approximately was required to complete sucrose consumption (batch process) with yield of 81%. Figure 5 shows that the quantity of base added is directly correlated with the production of lactic acid.

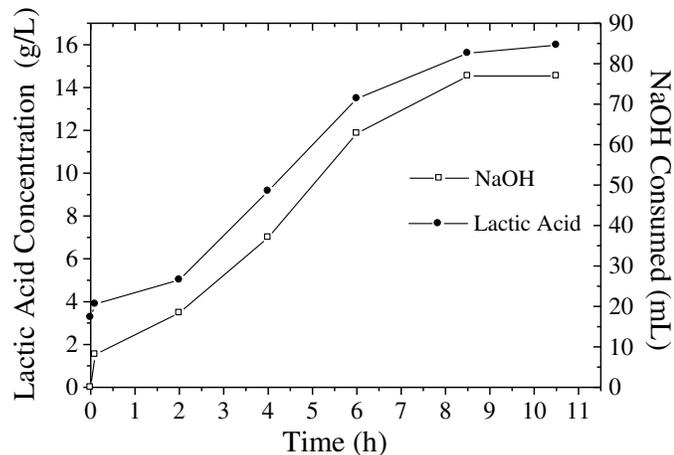


Fig. 5. Lactic acid produced and NaOH consumed in the batch process

The kinetics of lactic acid production is associated with growth, as shown in Figure 6a and 6b. The maximum lactic acid productivity obtained was of 2.49 g/L.h, as shows Figure 6b. Figures 6c and 6d show the relationship of growth rate to cell biomass concentration and to lactic acid concentration, respectively. The maximum growth rate (1.13 g/L.h) was obtained when the

lactic acid concentration was 8.5 g/L. For higher concentrations, a linear decay of the growth rate was observed (Fig. 6d). This evidences a product inhibition at high concentrations.

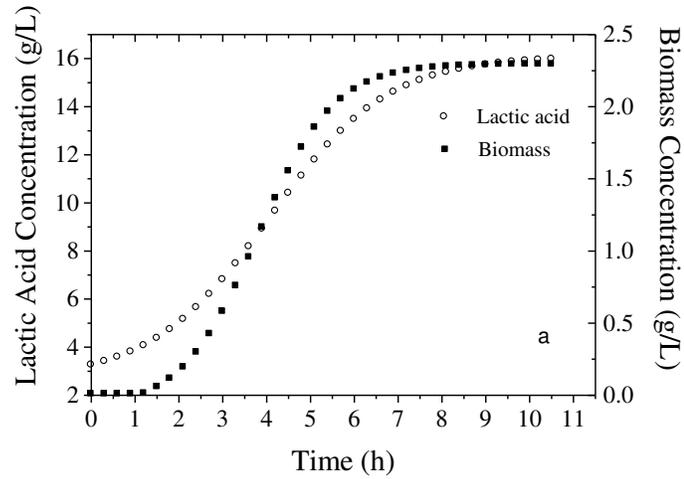


Fig. 6a. Lactic acid and biomass concentration

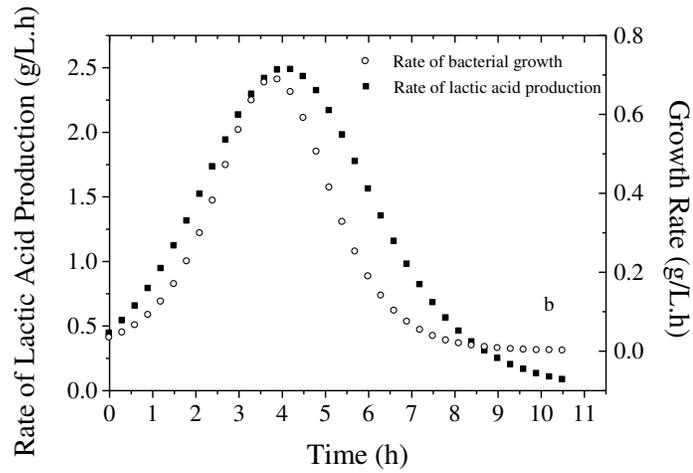


Fig. 6b. Lactic acid production rate and cell growth rate

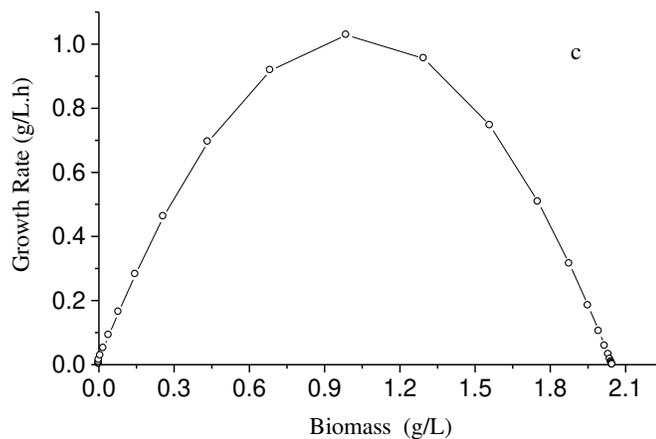


Fig. 6c. Cell growth rate as function of the biomass cell

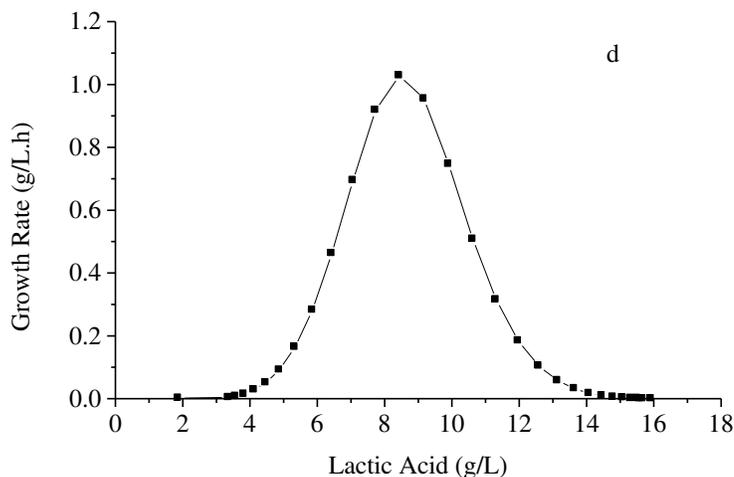


Fig. 6d. Cell growth rate as function of the lactic acid concentration

A kinetic model has been developed to represent in batch fermentation to produce lactic acid by strains isolated from industrial ethanol fermentation. The data obtained from the fermentation were used for determining the kinetic parameters of the model. Table 5 shows the parameters obtained in the batch fermentation to lactic acid production. The developed model allows good predictions for lactic acid production, growth cell and sugar consumption compared to experimental data, as shows Figure 7. Some discrepancy has been observed between model and

the experimental data, which can be minimized by a model fitting procedure to experimental data.

Table 5. Results obtained in batch fermentation to production of lactic acid

Lactic acid yield (%)	83.0
Productivity (g/L.h)	2.49
Specific growth rate (h^{-1})	1.13
α	3.01
β	0.51

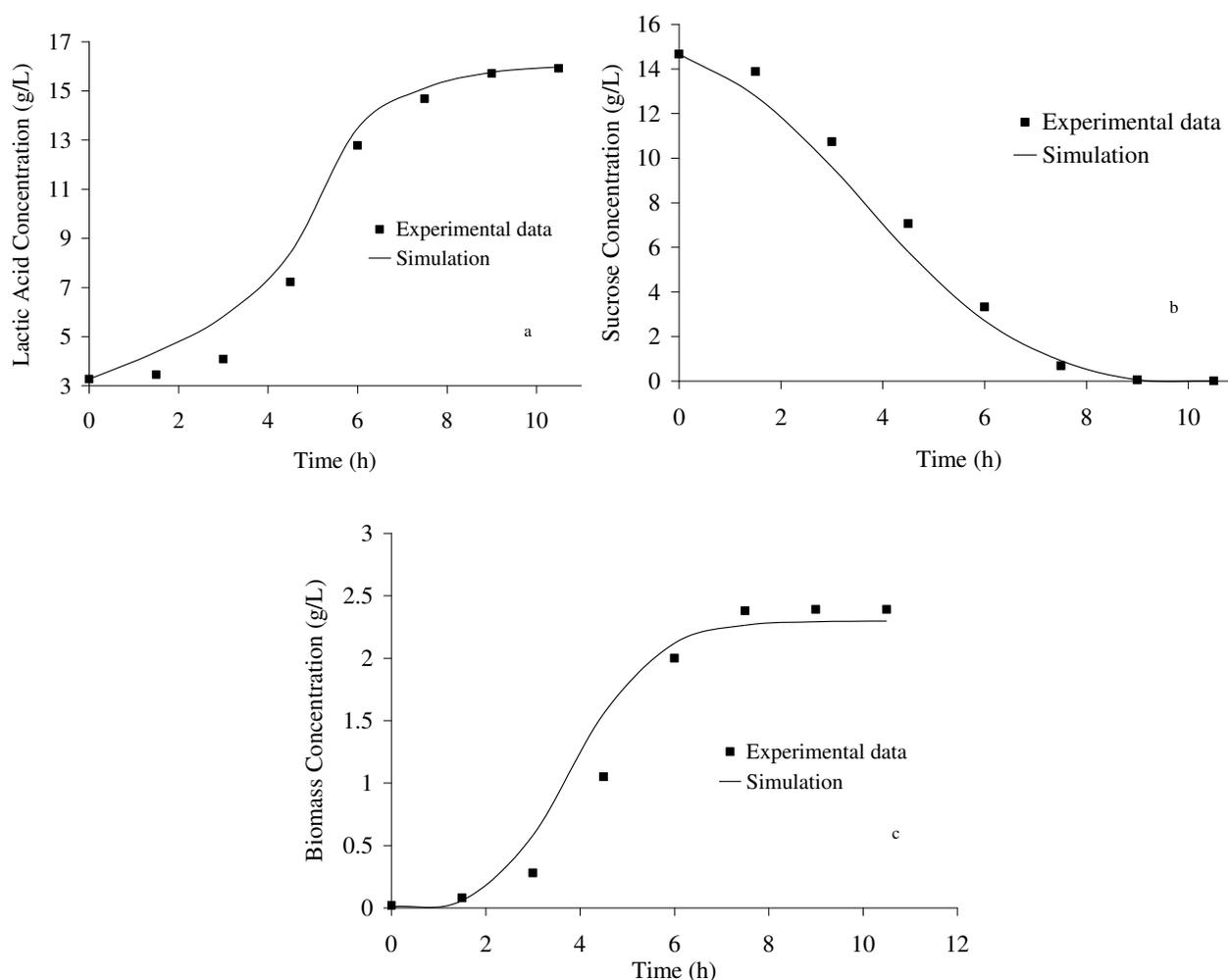


Fig. 7. Simulation of batch fermentation to lactic acid production
(a) lactic acid; (b) sucrose; (c) biomass)

Conclusions

In this work were selected and evaluated the capacity of sixty strains isolated from industrial ethanol fermentation to lactic acid production. Among the strains was selected one that produces lactic acid from sugarcane molasses without pretreatment. After screened the best strains an experimental design was carried out to determine the optimum conditions fermentation. From the results of experimental design was possible to perceive that the yield of lactic acid is favored

when using lower temperature and lower sucrose concentration to prevent the inhibition of the cell growth. Lactic acid was obtained by fermentation of sugarcane molasses, an economical substrate, using bacteria isolated from sugar and alcohol mill, adapted to the industrial environment, considering the Biorefinery concept in order to develop a biotechnological process economically competitive. Batch fermentations were conducted at 34⁰C, pH 5.0, 200 rpm and sucrose initial concentration of 12 g/L obtained from diluted sugarcane molasses. Throughout the process was carried out pulses of molasses to avoid the inhibition of the cell growth by high sucrose concentration as well as to increase the lactic acid end concentration. The yield of lactic acid obtained from diluted sugarcane molasses fermentation was of 0.83 g/g. The maximum growth rate was obtained in a lactic acid concentration of 8.5 g/L. For lactic acid concentrations above this value was observed a linear decrease in growth rate. The ratio of α/β equals 6.0 justifies a growth-associated lactic acid formation. The model developed has been found to provide an adequate description of the fermentation kinetics.

Nomenclature

K_i	inhibition constant (L/g)
K_s	Monod constant (h^{-1})
P	lactic acid concentration (g/L)
P_0	lactic acid initial concentration (g/L)
S	sucrose concentration (g/L)
S_0	sucrose initial concentration (g/L)
X	biomass concentration (g/L)
α	growth-associated constant for the Luedeking-Piret (g lactic acid/g biomass)

β non growth-associated constant for the Luedeking-Piret (g/h)

μ specific cell growth rate (h^{-1})

Acknowledgements

The authors are thankful to the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (FAPESP), Process number 06/07175-7 for the financial support. The authors want to thank also the Sugarcane Technology Center (CTC) and the Laboratory of Bioprocess of the School Foods Engineering of the State University of Campinas.

References

1. Datta, R. and Henry, M. (2006) Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 1119-1129.
2. Stetter and Kandler, (1973) apud Burgos-Rubio, C. N.; Okos, M. R.; Wankat, P. C. (2000) Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Prog.* 16, 305-314.
3. Narayanan, N.; Roychoudhury, P. K.; Srivastava, A. (2004) L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *J. Biotechnol.* 7(2), 167-179.
4. John, R. P. and Nampoorthiri, K. M. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 524-534.
5. Wee, Y. J.; Kim, J. N.; Ryu, H. W. (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2), 163-172.

6. Pandey, A.; Soccol, C. R.; Rodriguez-Leon, J. A.; Nigam, P. (2001) Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. *Asiatech Publishers*, New Delhi.
7. Luedeking, P. and Piret, E. L. (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1, 393-412.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATALA, D. I. P. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol. Tese (Doutorado). FEA/UNICAMP, Campinas, SP, 2004.
- BOONMEE, M.; LEKSAWASDI, N.; BRIDGE, W.; ROGERS, P. L. Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ 133: experimental data and model development. *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, p. 127-135, 2003.
- BURGOS-RUBIO, C. N.; OKOS, M. R.; WANKAT, P. C. Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, v. 16, p. 305-314, 2000.
- CSONKA, L. N.; HANSON, A. D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology*, v. 45, p. 569-606, 1991.
- FACCIOTTI, M. C. Fermentação contínua. IN: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. Editora Edgar Blücher Ltda, São Paulo, SP, 2001, v. 2, Cap.12, p. 223 – 246.
- LIN, J. Q.; LEE, S. M.; KOO, Y. M. Modeling and simulation of lactic acid fermentation with inhibition effects of lactic acid and glucose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 9, p. 52-58, 2004.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. Transient and steady states in continuous fermentation theory and experiment. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1(4), p. 431-459, 1959.
- MONTEAGUDO, J. M.; RODRIGUEZ, L.; RINCÓN, J.; FUERTES, J. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 68, p. 271-286, 1997.

QIN, S. J.; BADGWELL, T. A. An overview of industrial model predictive control technology.

In: KANTOR, J. C.; GARCIA, C. E.; CARNAHAN, B. (eds). *Chemical Process Control*, v. 93, AICHE Symposium Series, p. 232-256, 1997.

VENUS, J.; RICHTER, K. Production of lactic acid from barley: strain selection, phenotypic and medium optimization. *Engineering in Life Sciences*, v. 6(5), p. 492-500, 2006.

CAPÍTULO V

Produção de Lactato de Etila, Avaliação de Rotas para Desidratação de Lactato de Etila e Simulação de um Processo Integrado

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no processo desenvolvido para produção de lactato de etila a partir da esterificação do ácido láctico com etanol usando um sistema de destilação reativa. Também serão descritos estudos realizados para avaliar a desidratação do lactato de etila para síntese de acrilato de etila. Para concluir este capítulo será proposto um processo integrado de produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila. O processo foi simulado com auxílio do simulador ASPEN PLUS[®] e os resultados da simulação serão apresentados no final deste capítulo.

5.1 Montagem do Sistema de Destilação Reativa

Inicialmente foi montado um sistema de destilação reativa (escala de bancada), conforme mostra a Figura 5.1.1. O sistema era composto por um biorreator modelo Bioflo, marca News Brunswick com volume útil de 500 mL, usado para aquecer a solução de ácido láctico antes de ser alimentada na coluna reativa. A coluna de destilação reativa consiste em uma coluna de vidro com 50 mm de diâmetro interno e 40 cm de altura, encamisada. A temperatura da camisa da coluna reativa foi controlada com o auxílio de um banho termostaticado marca Tecnal, modelo TE – 184. Na parte inferior da coluna foi acoplado um balão de vidro com três saídas (refervedor). O balão foi colocado sobre uma manta de aquecimento, marca Quimis, modelo 321– A25. No topo da coluna foi colocada uma conexão para adaptar um termopar e um condensador de peras. Na saída do condensador foi conectado um balão volumétrico (500 mL) para armazenamento do destilado (água + álcool). Para alimentar a solução na coluna reativa foi usada uma bomba peristáltica, marca Masterflex.



Figura 5.1.1 - Sistema de destilação reativo

A coluna foi dividida em três seções, sendo duas seções não reativas, uma próxima ao topo e outra próxima ao fundo e uma seção reativa (~ 30 cm). A coluna foi recheada com anéis de vidro e no meio da seção reativa foi colocada uma camada de catalisador Amberlyst 15 (Figura 5.1.2). A Tabela 5.1.1 apresenta as propriedades do catalisador Amberlyst usado no processo.

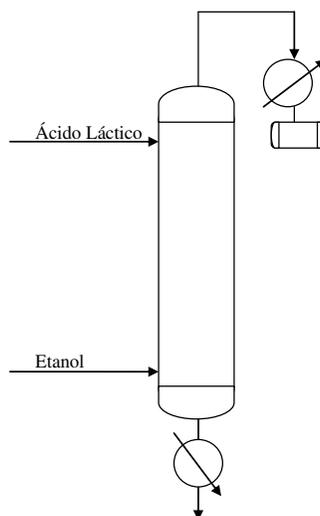


Figura 5.1.2 - Configuração da coluna de destilação reativa

Tabela 5.1.1 - Propriedades físicas da resina de troca catiônica Amberlyst 15

Propriedades	
Forma	esferas
Tamanho (mm)	0,5
Área da superfície interna (m ² /g)	50
Capacidade de troca (mEq/g)	4,7
Temperatura de estabilidade (°C)	120
Fabricante	Rohm and Hass Co., USA

5.1.1 Desenvolvimento Experimental

Foram desenvolvidos alguns testes preliminares com a finalidade de avaliar o comportamento da reação, temperatura de alimentação dos reagentes, alimentação de ácido láctico no topo da coluna e álcool no fundo, camada de catalisador no meio da coluna reativa. Após a realização destes testes foi realizado um planejamento fatorial completo 2³ com dois pontos centrais, a fim de avaliar a influência de três parâmetros no processo de produção de lactato de etila a partir da esterificação do ácido láctico com etanol.

O planejamento foi desenvolvido usando ácido láctico sintético (85%) e etanol (99,3%). O sistema encamisado para controle da temperatura de reação não foi usado neste planejamento, pois se pretendia avaliar o comportamento da reação sem controle de temperatura na zona reacional. A resina de troca iônica foi usada sem pré-tratamento, numa proporção de 5% de resina em relação à massa (g) da solução de ácido láctico usada na reação. A Tabela 5.1.2 apresenta os parâmetros avaliados no planejamento.

Tabela 5.1.2 - Parâmetros avaliados no planejamento fatorial completo 2^3

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (1)
Concentração de ácido láctico (g/L)	35,0	60,0	85,0
Razão molar etanol:ácido láctico	1,5	3,0	4,5
Temperatura do refervedor	85	95	105

O ácido láctico (85%) foi diluído em água destilada para obtenção das concentrações de 35 g/L e 60 g/L. O volume da solução de ácido láctico usado em cada ensaio foi de 250 mL e a temperatura de alimentação do ácido na coluna de 30°C.

As amostras foram coletadas no final de cada ensaio e analisadas em cromatografia gasosa para determinação da concentração de lactato de etila formado. O destilado foi descartado.

Ao término do planejamento fatorial completo 2^3 usando ácido láctico sintético, foi desenvolvido um novo planejamento fatorial 2^3 com dois pontos centrais usando a solução de ácido láctico obtida no processo fermentativo.

Durante a realização do primeiro planejamento se teve grande dificuldade em controlar a temperatura da reação, assim, durante a realização deste novo planejamento foi usado o sistema de destilação reativa encamisado. A temperatura da coluna (zona reacional) foi controlada em 85 °C. Outro problema percebido durante a realização dos primeiros ensaios, foi o arraste das partículas do catalisador e também, a dificuldade de remoção do catalisador da coluna para regeneração. Considerando que o catalisador heterogêneo Amberlyst 15 seria usado para acidificar o vinho fermentado, ou seja, faria a troca de H^+ pelo cátion Na^+ presente no sal de lactato (formado durante o processo fermentativo devido ao controle de pH, através da adição de hidróxido de sódio), decidiu-se adaptar uma coluna de catalisador (resina catiônica) na parte externa da coluna reativa. Com esta nova configuração (Figura 5.1.3) o vinho era aquecido no biorreator e alimentado no fundo da coluna de catalisador, onde ocorria a troca catiônica. O vinho final acidificado era alimentado no topo da coluna reativa, reagindo com vapor de etanol em fluxo contracorrente.



Figura 5.1.3 - Sistema de destilação reativa

No segundo planejamento realizado, foram avaliadas a temperatura de alimentação do vinho, razão molar etanol:ácido láctico e o tipo de catalisador (catalisador homogêneo – ácido sulfúrico (H₂SO₄); catalisador heterogêneo – resina de troca catiônica Amberlyst 15). A Tabela 5.1.3 apresenta os parâmetros avaliados no planejamento fatorial e a Tabela 5.1.4 apresenta a matriz codificada dos parâmetros.

Tabela 5.1.3 - Parâmetros avaliados no planejamento fatorial completo 2³

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (1)
Temperatura de alimentação do vinho (°C)	15,0	35,0	45,0
Razão molar etanol:ácido láctico	1,3	2,6	3,9
Tipo de catalisador	Amberlyst	-	H ₂ SO ₄

Tabela 5.1.4 - Matriz codificada dos parâmetros

Ensaio	Temperatura de alimentação (°C)	Razão molar etanol:ácido láctico	Tipo de catalisador
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	H ₂ SO ₄
10	0	0	Amberlyst

5.1.2 Metodologia analítica

As concentrações de lactato de etila foram determinadas através de análise das amostras em um sistema de cromatografia gasosa marca Varian, modelo Saturn 3600 CX, equipado com um detector de ionização por chama (FID – do inglês - *Flame Ionization Detector*). O volume de injeção foi de 1 µL. As temperaturas de injeção e do detector foram de 240 °C e 250 °C, respectivamente. Uma coluna capilar (30 m X 0,25 mm X 1 µm, DB-1) foi usada. A temperatura da coluna foi programada para aumentar a partir de uma temperatura inicial de 100 °C até 125 °C aumentando 2,5 °C/min e então manter-se constante a 125 °C por 4 minutos. Gás hélio (99,9% de pureza) foi usado como gás de arraste. As concentrações foram determinadas através de curva de calibração, obtida a partir de solução padrão de lactato de etila (Figura 5.1.4).

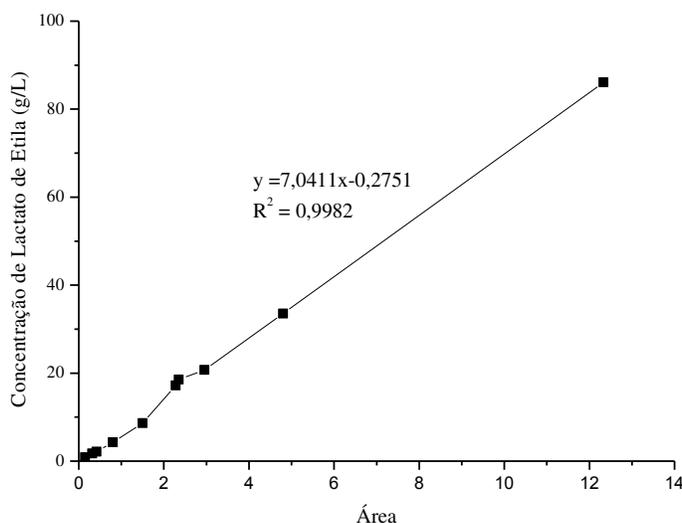


Figura 5.1.4 - Curva de calibração para determinação das concentrações de lactato de etila

5.1.4 Resultados do processo de esterificação de ácido láctico para produção de lactato de etila

Lactato de etila foi produzido a partir da reação reversível exotérmica (Eq. 5.1.1) de esterificação do ácido láctico com etanol, em fluxo contracorrente numa coluna de destilação reativa.



A quantidade de resina necessária para ajustar o pH do caldo foi calculada a partir de sua capacidade de troca (4,7 mEq/g de resina seca), ou seja, o número de íons por quantidade unitária de permutador que podem ser trocados, podendo ser representada pela reação abaixo.



Foi determinado que seria necessário 1 g de resina catiônica para cada 4 mL de solução, para ajustar o pH 5,0 para 2,8. A vazão de alimentação de lactato de sódio na coluna de resina foi de 12 mL/min com concentração de 40 g/L.

A resina saturada foi regenerada com ácido clorídrico (5%). Depois de regenerada foi lavada várias vezes com água destilada e novamente usada no processo de esterificação.

A Tabela 5.1.5 e a Figura 5.1.5 apresentam os resultados obtidos com a realização do primeiro planejamento fatorial 2^3 , onde foram avaliadas as influências da concentração do ácido

lático, razão molar etanol:ácido lático e temperatura do refeedor sobre o rendimento de lactato de etila.

O rendimento do lactato de etila ($Y_{EL/LA}$) foi definido como o número de moles de lactato formado pelo número total de moles de ácido lático alimentado na coluna (Eq. 5.1.3).

$$Y_{EL/LA} = \frac{n^{\circ} \text{ de moles de lactato de etila formado}}{n^{\circ} \text{ total de moles de ácido lático alimentado na coluna}} \quad (5.1.3)$$

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.1.5 os melhores rendimentos de lactato de etila foram obtidos no ensaio 5, quando usada uma menor concentração de ácido lático, menor razão molar etanol:ácido lático e maior temperatura no refeedor e também, no ensaio 7, onde foram usadas as mesmas condições de concentração de ácido lático e temperatura, que no ensaio 5, alterando apenas a razão molar etanol:ácido lático. Assim, foi percebido uma menor influência da razão molar etanol:ácido lático sobre o processo em estudo. Na Figura 5.1.5 é possível visualizar que a temperatura do refeedor e a interação entre a concentração de ácido lático e temperatura do refeedor exercem influência estatisticamente significativa sobre o rendimento de lactato de etila, para um intervalo de confiança de 90%.

Devido a sua natureza bifuncional, o ácido lático sofre esterificação intramolecular em soluções aquosas acima de 30% (m/v) formando dímero linear e oligômeros. A homoesterificação aumenta com o aumento da concentração de ácido lático, reduzindo o rendimento de lactato de etila devido a presença de componentes oligoméricos (Asthana *et al.*, 2005). Uma alternativa seria trabalhar com soluções bem diluídas, no entanto a água limita a reação de esterificação e, portanto, elevado excesso de álcool são necessário, bem como alto custo de energia (Asthana *et al.*, 2005).

A Tabela 5.1.6 e a Figura 5.1.6 apresentam os resultados do segundo planejamento, realizado para avaliar a influência da temperatura de alimentação do vinho, razão molar etanol:ácido lático e tipo de catalisador (H_2SO_4 e Amberlyst) sobre o rendimento de lactato de etila. Conforme dados da Tabela 5.1.6 os melhores rendimentos foram obtidos no ensaio 4 quando usada alta temperatura de alimentação de ácido lático (45°C), maior razão molar etanol:ácido lático (3,9) e catalisador heterogêneo (Amberlyst) e no ensaio 5 quando a temperatura de alimentação de ácido lático foi menor (25°C), menor razão molar de etanol:ácido

lático e ácido sulfúrico como catalisador. Portanto, as melhores condições do processo vão depender, principalmente, do tipo de catalisador usado, isso pode ser justificado pelos resultados dos efeitos das interações entre os parâmetros analisados sobre o rendimento de lactato de etila, conforme apresentado no gráfico de Pareto dos efeitos (Figura 5.1.6).

Tabela 5.1.5 - Número de moles e rendimento de lactato de etila

Ensaio	Nº de moles formado	Rendimento
1	1,1	22,83
2	4,2	36,46
3	1,8	37,64
4	4,2	36,77
5	3,4	72,49
6	2,4	20,62
7	3,4	72,86
8	4,4	38,19
9	3,5	43,41
10	4,5	40,86

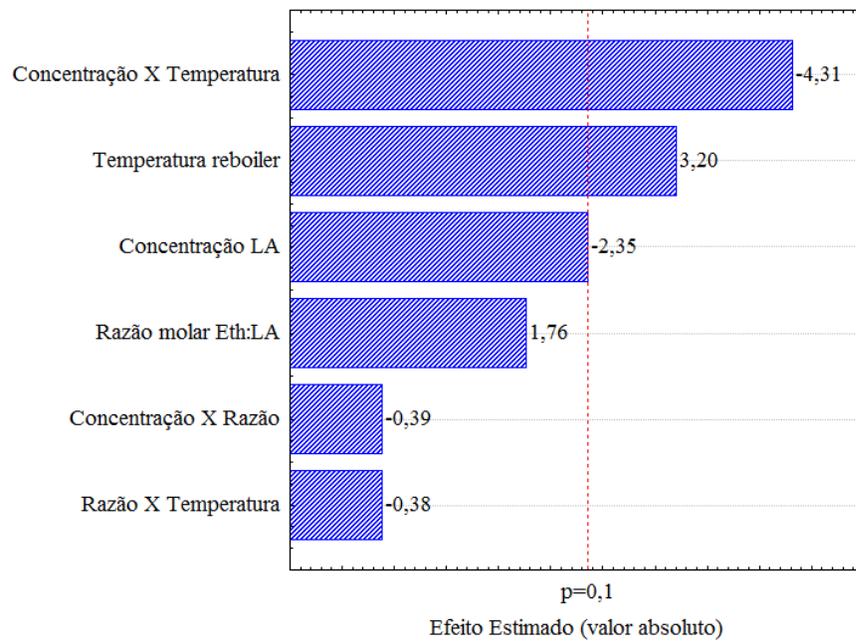


Figura 5.1.5 - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de lactato de etila

Tabela 5.1.6 - Número de moles e rendimento de lactato de etila

Ensaio	Nº de moles formado	Rendimento
1	1,1	23,31
2	0,8	16,67
3	0,8	16,26
4	1,7	35,16
5	2,1	42,82
6	1,0	19,97
7	0,8	17,40
8	1,1	22,38
9	1,1	21,68
10	1,5	20,12

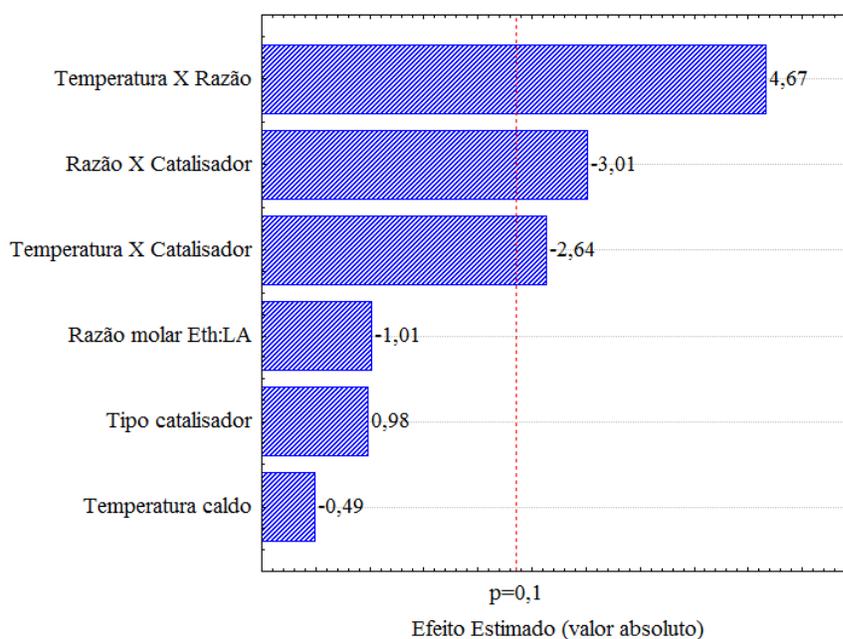


Figura 5.1.6 - Gráfico de Pareto dos efeitos sobre o rendimento de lactato de etila

Os ensaios 4 e 5 foram repetidos e, o produto final foi concentrado e usado para avaliar rotas de desidratação do lactato de etila para síntese de acrilato de etila.

5.2 Avaliação de Rotas Alternativas para Desidratação do Lactato de Etila para Síntese de Acrilato de Etila

Os primeiros ensaios realizados para avaliar a desidratação do lactato de etila foram realizados em um bloco digestor compacto, marca Hatch, modelo P/N 45600-00. Inicialmente foi usado ácido láctico sintético (85%) para fazer a esterificação de etanol para posterior desidratação. A reação de esterificação foi realizada em fase vapor a 150 °C durante 2h20min. Foi feita análise em Karl Fisher de uma amostra do lactato de etila para determinar a concentração de água (13,71%). Amostras do produto da esterificação de ácido láctico e etanol foram colocadas em tubos e adicionado 5% de NaH₂PO₄ (Fosfato de sódio monobásico) em cada tubo. Os tubos foram fechados, homogeneizados e colocados no bloco digestor e aquecidos a 80 °C durante 40 min. As amostras finais foram centrifugadas, filtradas e analisadas em cromatografia gasosa.

Em seguida, foram realizados ensaios usando lactato de etila produzido no sistema de destilação reativa, usando catalisador heterogêneo (Amberlyst) e catalisador homogêneo (ácido sulfúrico). Foram adicionados em cada amostras 2,5, 5 e 10% de NaH_2PO_4 , respectivamente. Os ensaios foram realizados no bloco digestor compacto a 80 °C durante 40 min. Ao final dos ensaios as amostras foram centrifugadas, filtradas e analisadas em cromatografia gasosa.

As concentrações de acrilato de etila foram determinadas através de análise das amostras em um sistema de cromatografia gasosa marca Varian, modelo Saturn 3600 CX, equipado com um detector de ionização por chama (FID). O volume de injeção foi de 1 μL . As temperaturas de injeção e do detector foram de 240 °C e 250 °C, respectivamente. Uma coluna capilar (30 m X 0,25 mm X 1 μm , DB-1) foi usada. A temperatura da coluna foi programada para aumentar a partir de uma temperatura inicial de 100 °C até 125 °C aumentando 2,5 °C/min e então manter-se constante a 125 °C por 4 minutos. Gás hélio (99,9% de pureza) foi usado como gás de arraste. As concentrações foram determinadas através de curva de calibração (Figura 5.2.1). Para a construção da curva padrão foi preparada uma solução padrão de acrilato de etila (99% - Sigma Aldrich). A solução foi dividida em sete aliquotas que foram diluídas na faixa de 1:2 a 1:40. Cada amostra padrão foi injetada duas vezes no CG (cromatógrafo gasoso) para determinação da área e do tempo de retenção.

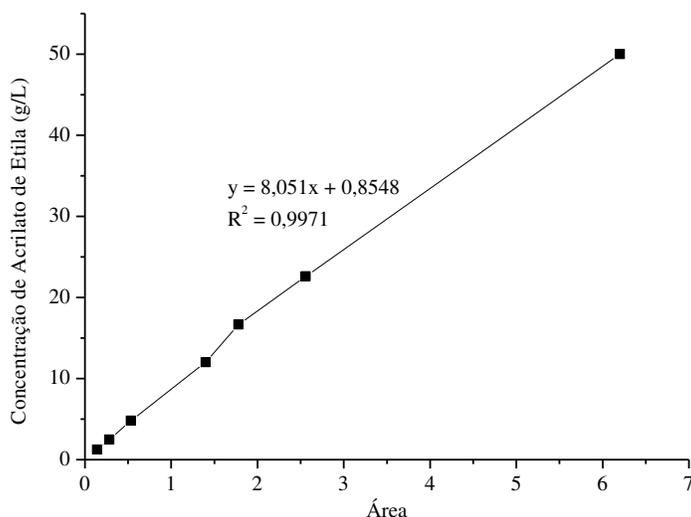


Figura 5.2.1 - Curva de calibração para determinação das concentrações de acrilato de etila

5.2.1 Resultados do processo

A reação de esterificação de ácido láctico (85%) com etanol, realizado no bloco digestor compacto, resultou em uma concentração de 45 g/L de lactato de etila. A adição de NaH_2PO_4 resultou na formação de um subproduto com tempo de retenção de 10,12 min. Porém, o tempo de retenção do acrilato de etila é de aproximadamente 3 minutos. A formação deste subproduto pode estar relacionada à alta temperatura usada 80 °C (vácuo) que pode ter ocasionado a quebra da dupla ligação de oxigênio na molécula de lactato de etila.

A reação de desidratação de ácido láctico e de seus ésteres é uma reação que exigem alto controle das condições operacionais, pois devido à alta reatividade do ácido láctico numa reação a elevada temperatura, a partir do ácido láctico pode ser produzido ácido acrílico (reação de desidratação), acetaldeído e CO_2 (reação de descarboxilação) e ácido propiônico (reação de redução), conforme Figura 5.2.2.

Quando usado lactato de etila produzido a partir do vinho fermentado, foi constatada a produção de acrilato através de análise em cromatografia gasosa, porém em concentrações muito baixas.

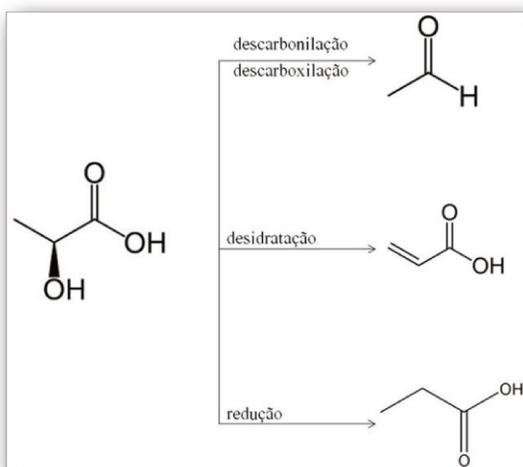
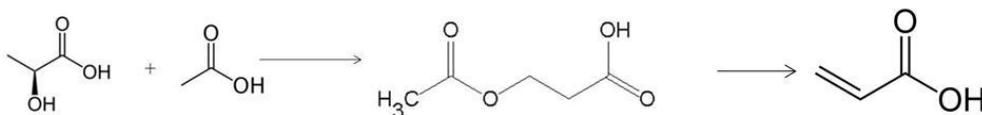


Figura 5.2.2 - Reações de ácido láctico a elevadas temperaturas

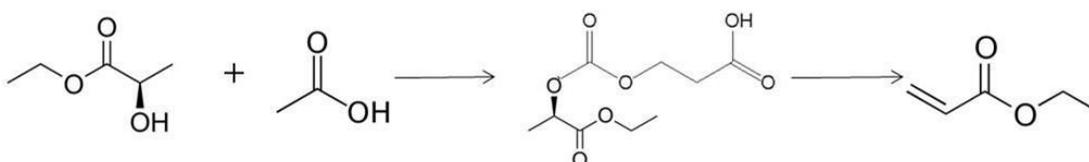
Novos experimentos foram realizados, a fim de obter acrilato de etila e/ou ácido acrílico a partir da desidratação de lactato de etila e/ou ácido láctico.

Inicialmente foi realizada uma reação de acetoxilação entre ácido láctico e ácido acético e entre lactato de etila e ácido acético, conforme reações a seguir.

Reação de ácido láctico com ácido acético



Reação de lactato de etila com ácido acético



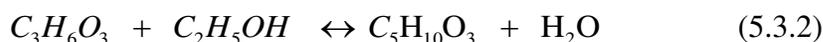
A reação de acetoxilação foi realizada em um shaker agitado a 150 rpm a 65 °C durante 5 horas. Após a reação de acetoxilação as amostras foram alimentadas num microrreator acoplado a um laser de CO₂, com temperatura de 500 °C, a fim de obter acrilato de etila e/ou ácido acrílico.

Foi usado um processo contínuo com tempo de residência de 2 segundos sob temperatura de 500 °C. Após o tempo de residência as amostras foram imediatamente resfriadas e posteriormente analisadas em cromatografia líquida e gasosa, mas não se conseguiu resultados satisfatórios.

A produção de acrilato de etila a partir da desidratação do lactato de etila tem despertado grande interesse. No entanto, com a realização dos testes desenvolvidos neste trabalho, a fim de sintetizar acrilato de etila como também, a partir dos dados referenciados na literatura, é muito difícil a desidratação de ácido láctico e seus ésteres em acrilato devido à reações paralelas, mostrando com isso, a necessidade de fazer um estudo detalhado do processo de desidratação do ácido láctico em trabalhos futuros, a fim de se conseguir altas concentrações de acrilato de etila e principalmente, determinar as limitações do processo.

5.3 Simulação de um Processo Integrado de Produção de Ácido Láctico, Lactato de Etila e Acrilato de Etila

Na sequência será apresentada a simulação do processo integrado, proposta para simular a produção de ácido láctico a partir da fermentação da sacarose, esterificação do ácido láctico com etanol em sistema de destilação reativa para produção de lactato de etila e desidratação do lactato de etila para síntese de acrilato de etila, conforme reações abaixo.



A simulação foi realizada com o auxílio do simulador ASPEN PLUS[®]. Biomassa foi adicionada ao banco de dados para realização da simulação do processo fermentativo de sacarose usando *Lactobacillus* para produção de ácido láctico e definida como CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}.

5.3.1 Caracterização termodinâmica do processo

Na modelagem e simulação de processos de separação é de extrema importância se ter conhecimento do equilíbrio de fases. O equilíbrio implica numa situação em que não ocorrem modificações macroscópicas em relação ao tempo (Smith e Van Ness, 1975).

A equação geral para o equilíbrio líquido vapor à pressão e temperatura constantes para uma determinada mistura é dado por:

$$\phi_i y_i P = \gamma_i x_i P_i^{sat} \phi_i^{sat} \quad (5.3.4)$$

Onde, ϕ_i é o coeficiente de fugacidade do componente i ; γ é o coeficiente de atividade do componente i ; x_i e y_i as composições do componente na fase líquida e vapor, respectivamente; T é a temperatura; P_i^{sat} a pressão de saturação.

Misturas com comportamento ideal, ou seja, misturas com equilíbrio de fase entre uma fase líquida que é uma solução ideal e uma fase vapor que é um gás ideal, a pressão parcial de um componente na fase vapor é igual ao produto da fração molar do componente na fase líquida pela

pressão de vapor do componente puro saturado seguem a lei de *Raoult* (Smith e Van Ness, 1975), onde

$$p_i = y_i P = x_i P_i^{sat} \quad (5.3.5)$$

O equilíbrio líquido-vapor é encontrado geralmente em sistemas constituídos por duas ou mais espécies químicas que são completamente miscíveis na fase líquida (Smith e Van Ness, 1975). A constante de equilíbrio termodinâmico (K_{eq}) é expressa em termos de energia livre de Gibbs (G^0), onde

$$K_{eq} = \exp\left(\frac{-\Delta G^o}{RT}\right) \quad (5.3.6)$$

O comportamento das fases no equilíbrio líquido-vapor (ELV) é facilmente visualizado em diagramas de fases. Neste trabalho, o modelo termodinâmico NRTL (do inglês - *Non-Randow-Two-Liquid*) foi usado para predição do comportamento das fases no ELV.

O sistema de destilação reativa é composto por quatro componentes a saber, ácido láctico, etanol, lactato de etila e água. Quando dados de ELV não estavam disponíveis para uma determinada mistura binária, os parâmetros foram estimados por UNIFAC (do inglês – *Universal Functional Activity Coefficients*) e estes, usados no modelo NRTL. As composições de ELV foram analisadas para os quatro componentes presentes no processo de destilação reativa. As Figuras 5.3.1 – 5.3.6 apresentam os diagramas binários y-x e T-xy de equilíbrio líquido-vapor das interações.

De acordo com as Figuras 5.3.3 – 5.3.5 é possível perceber a presença de dois azeótropos homogêneos formados pela interação binária etanol/água e água/lactato de etila. A composição dos azeótropos é apresentada na Tabela 5.3.1.

Tabela 5.3.1 - Temperatura de ebulição e composição dos azeótropos

Sistema	Tipo	Temperatura (°C) (NRTL)	Composição
Etanol/Água	homogêneo	78,15	0,8952/0,1048
Água/Lactato de etila	homogêneo	99,76	0,9617/0,0383

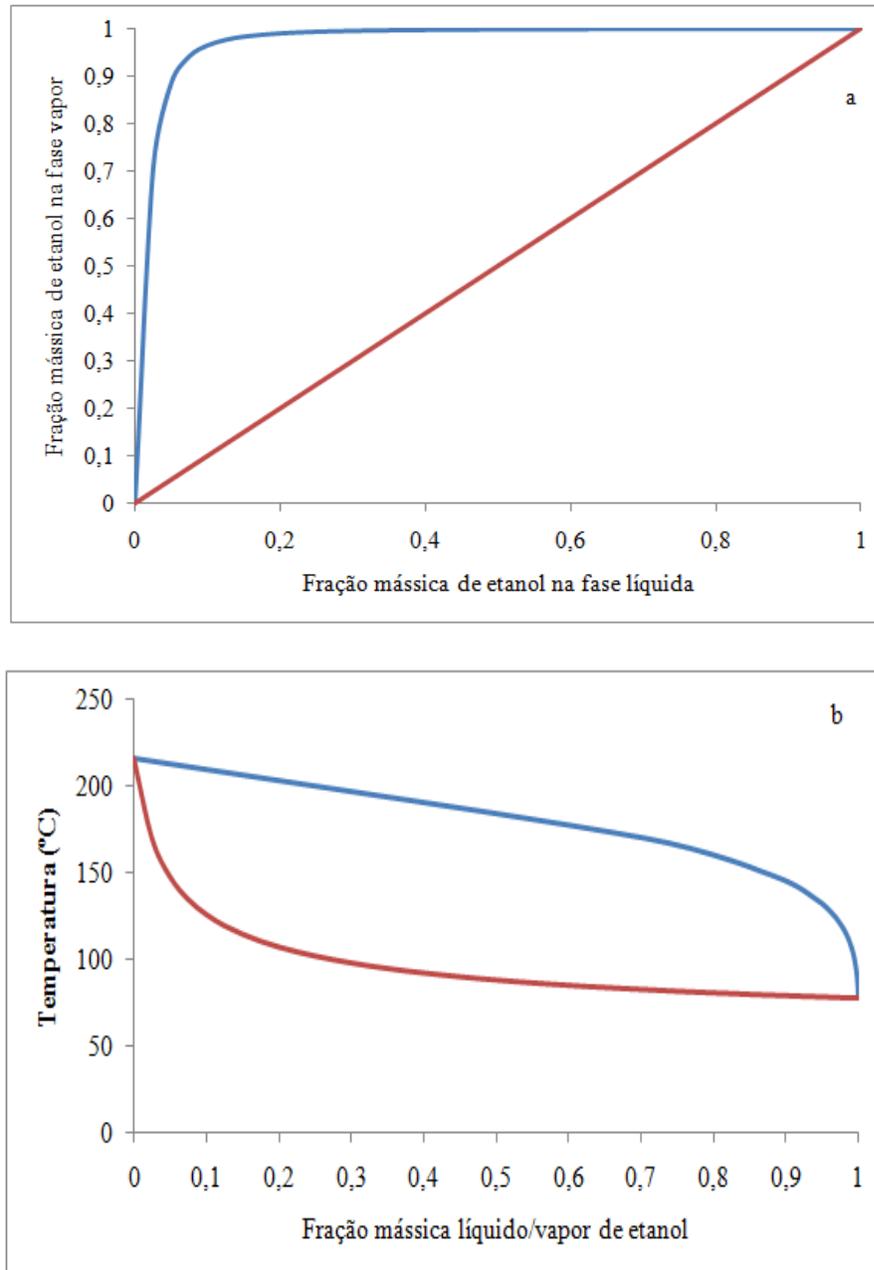


Figura 5.3.1 – Curva de equilíbrio líquido-vapor (xy e T-xy) para a mistura binária etanol/ácido láctico ($P = 1 \text{ atm}$)

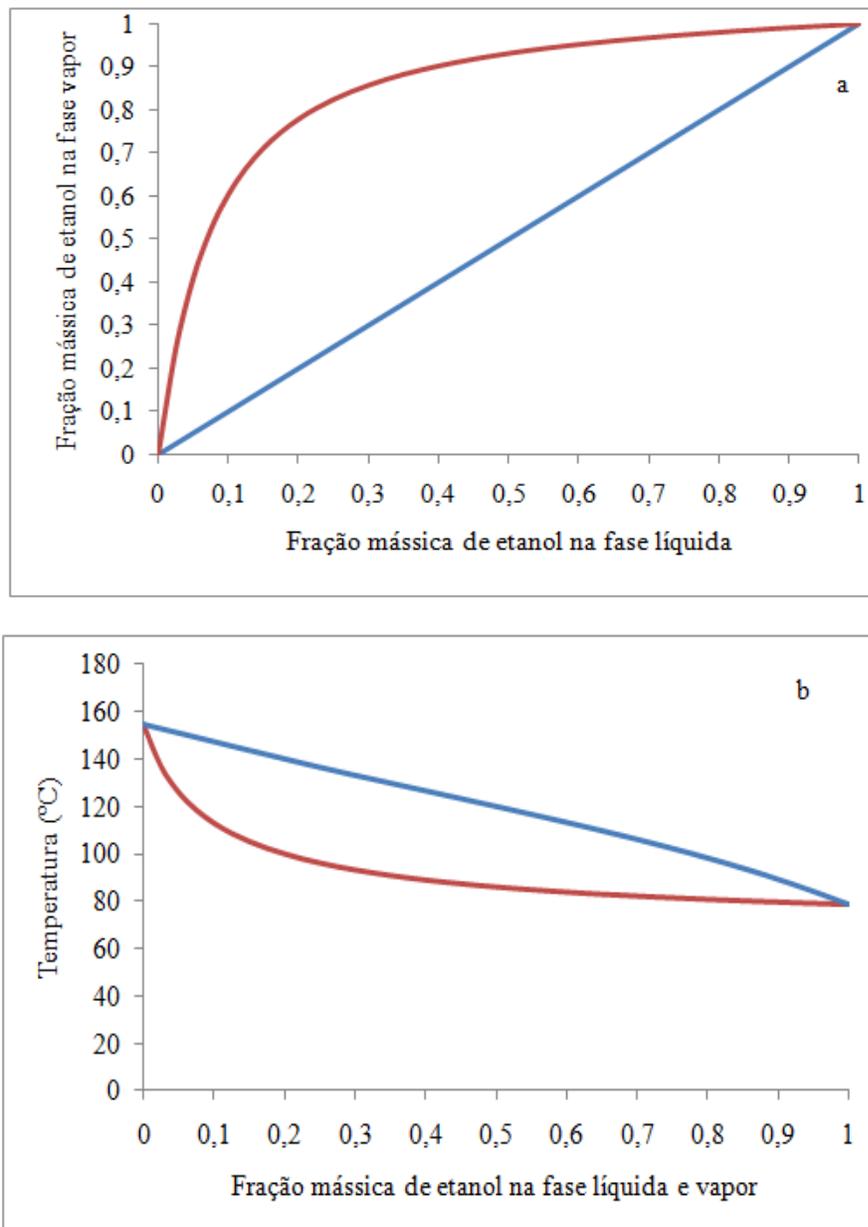


Figura 5.3.2 – Curva de equilíbrio líquido-vapor (xy e T-xy) para a mistura binária etanol/lactato de etila ($P = 1 \text{ atm}$)

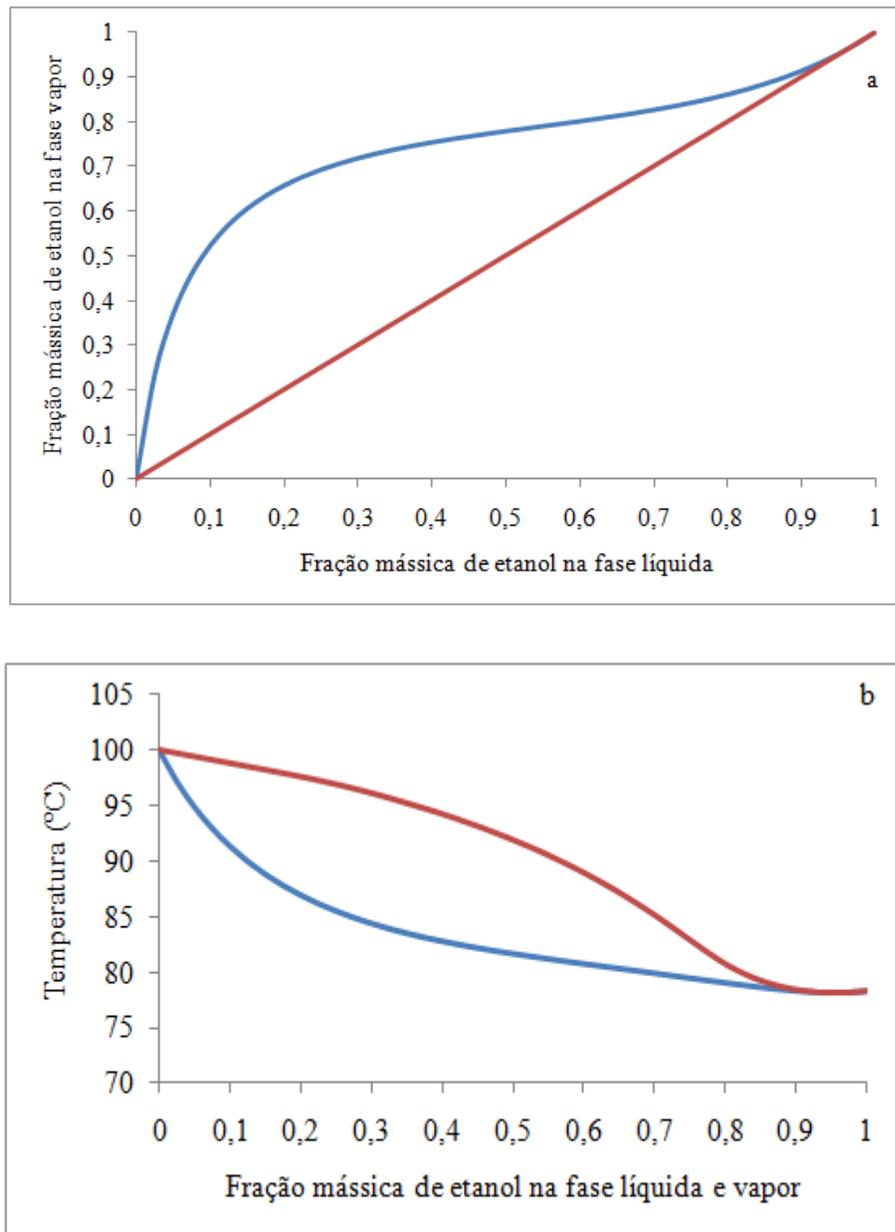


Figura 5.3.3 – Curva de equilíbrio líquido-vapor (xy e T-xy) para a mistura binária etanol/água ($P = 1 \text{ atm}$)

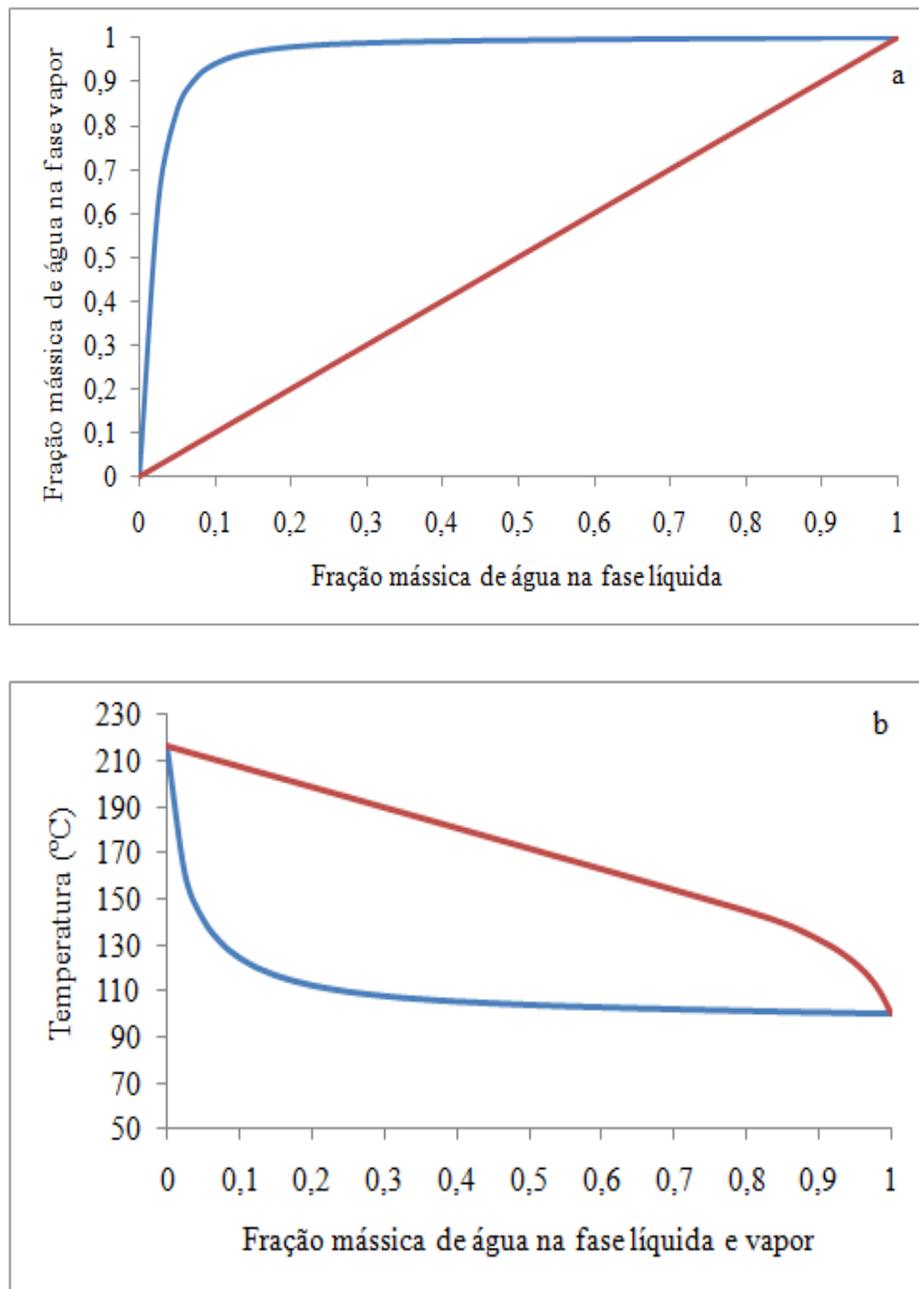


Figura 5.3.4 – Curva de equilíbrio líquido-vapor (xy e T-xy) para a mistura binária água/ácido láctico ($P = 1 \text{ atm}$)

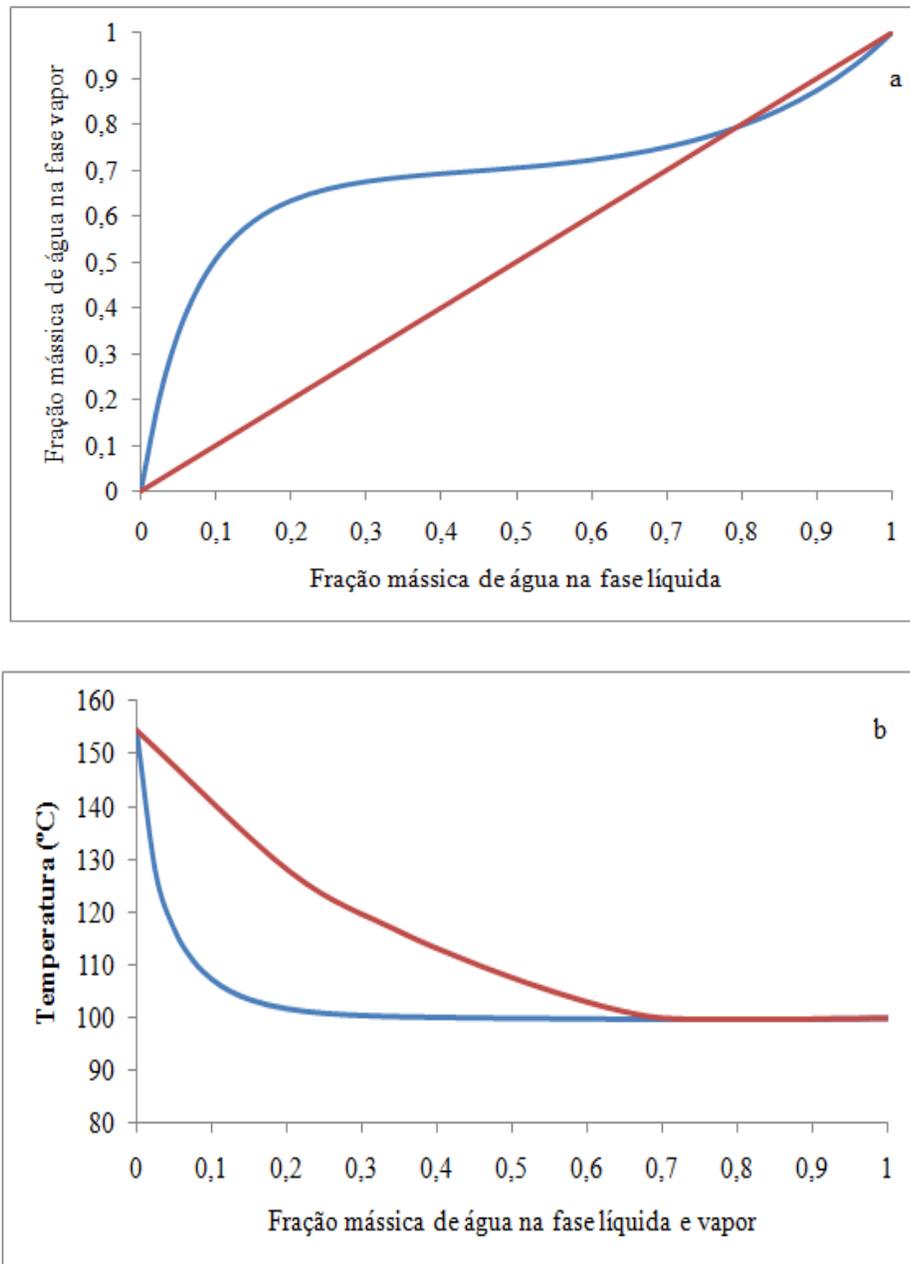


Figura 5.3.5 – Curva de equilíbrio líquido-vapor (xy e T-xy) para a mistura binária água/lactato de etila ($P = 1 \text{ atm}$)

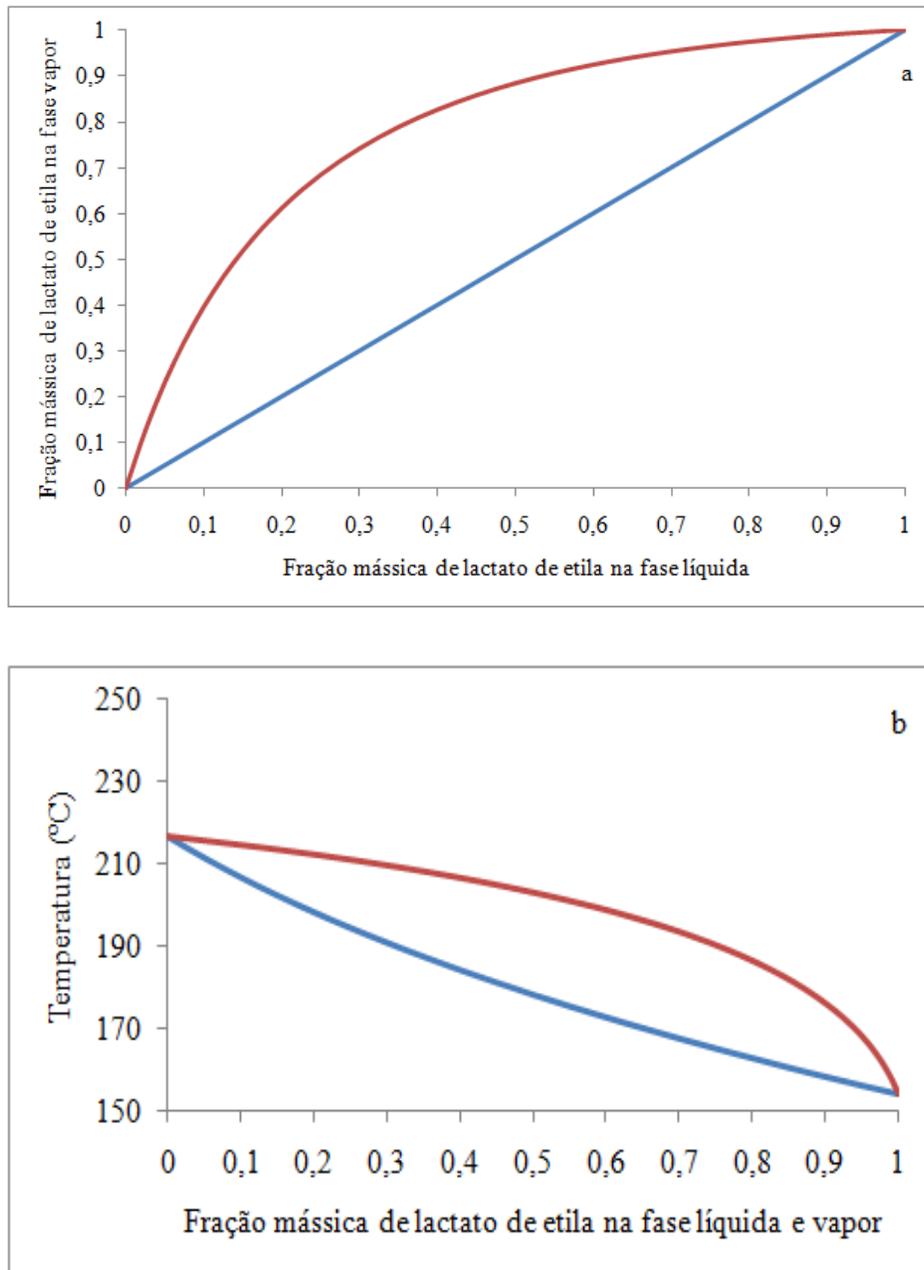


Figura 5.3.6– Curva de equilíbrio líquido-vapor (xy e T-xy) para a mistura binária lactato de etila/ácido láctico ($P = 1 \text{ atm}$)

5.3.2 Simulação do processo

Inicialmente, foi simulado o processo fermentativo para produção de ácido láctico, conforme Figura 5.3.7

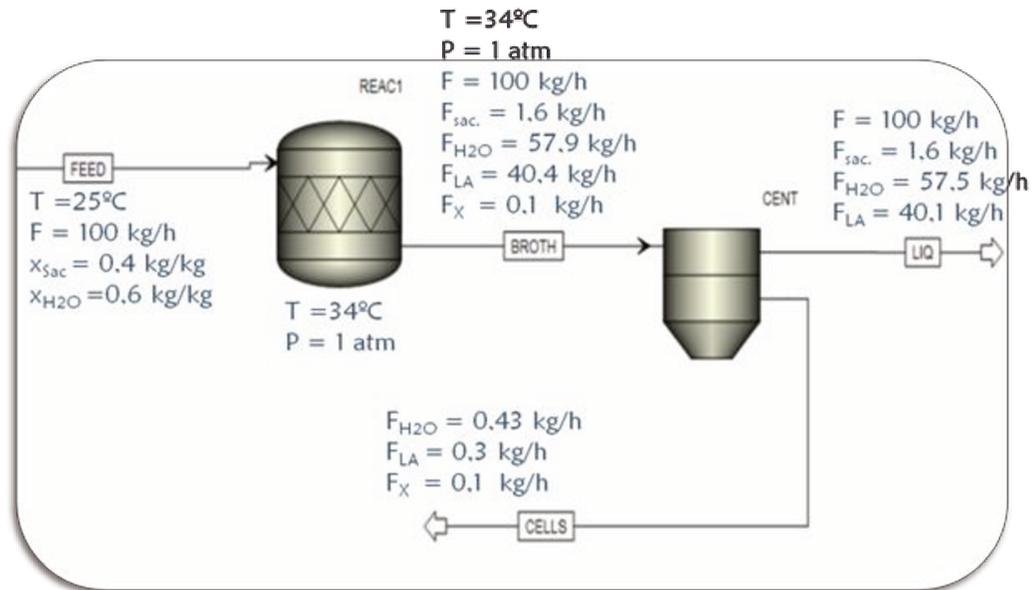


Figura 5.3.7 – Fluxograma da etapa do processo fermentativo

Foi usada uma vazão mássica de alimentação no fermentador de 100 kg/h e uma fração mássica de sacarose de 0,4. A vazão de biomassa foi 10% da corrente de substrato. Na simulação, a fermentação foi realizada a 34 °C e 1 atm, a corrente de vinho fermentado foi alimentado na centrífuga para separação das células.

Após a etapa de fermentação, foi simulado o processo de esterificação do ácido láctico para produção de lactato de etila usando um sistema de destilação reativa (Fig. 5.3.8). O vinho livre de células, resultante do processo fermentativo foi alimentado no topo da coluna de destilação reativa. Etanol foi alimentado do fundo da coluna reativa e a reação ocorreu a 85°C. O modelo de Power Law foi usado para adicionar as reações no simulador. Os valores da constante de equilíbrio (Eq. 5.3.7) foram obtidos a partir de Delgado *et al.* (2007).

$$k_e = k_e^0 \exp\left(\frac{-E_{A,e}}{RT}\right) \quad (5.3.7)$$

$$k_e = 8,83 \times 10^8 \left(\frac{\text{kmol}}{\text{kg} \cdot \text{min}} \right) \exp\left(-\frac{64.440 \left(\frac{\text{kJ}}{\text{kmol}} \right)}{RT} \right) \quad (5.3.8)$$

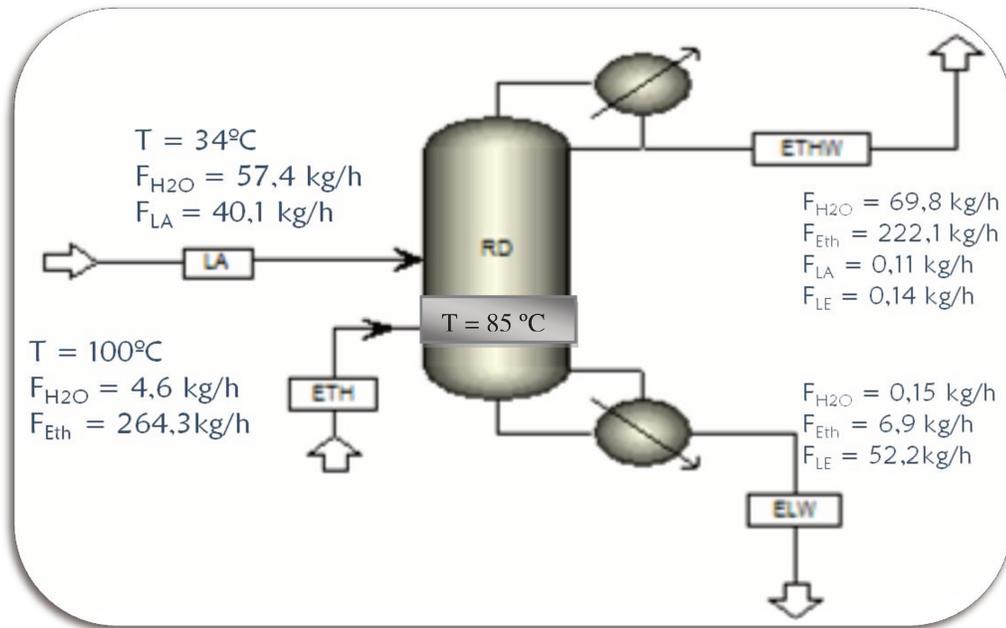


Figura 5.3.8 – Fluxograma da etapa de esterificação

O produto de topo da coluna de destilação reativa foi separado (fase orgânica e aquosa), conforme mostra a Figura 5.3.9. A corrente de água (AQ) foi recirculada para o processo fermentativo.

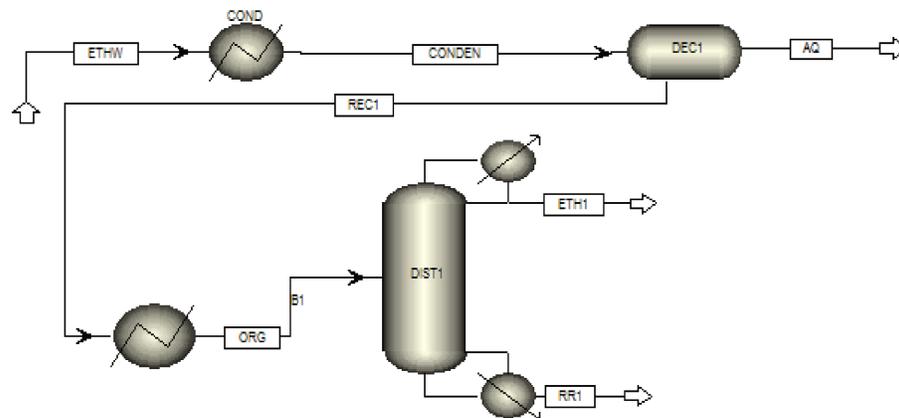


Figura 5.3.9 – Recuperação de etanol e água

A corrente de fundo da coluna de destilação reativa foi alimentada numa coluna de destilação para separação do lactato de etila dos demais componentes (Fig. 5.3.10). A corrente de

lactato de etila foi alimentada no reator de desidratação para síntese de acrilato de etila (Fig. 5.3.11).

A desidratação do lactato de etila foi realizada em um reator de conversão a 450 °C e 100 MPA. As condições para a reação de desidratação foram obtidas a partir de Aida *et al* (2009).

O fluxograma do processo integrado de produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila é apresentado na Figura 5.3.12. Nas Figuras 5.3.13 -5.17 são apresentadas as composições mássicas das correntes das colunas (RD, DIST1 e DIST2). As especificações das colunas (RD, DIST1 e DIST2) usadas no processo são apresentadas na Tabelas 5.3.2.

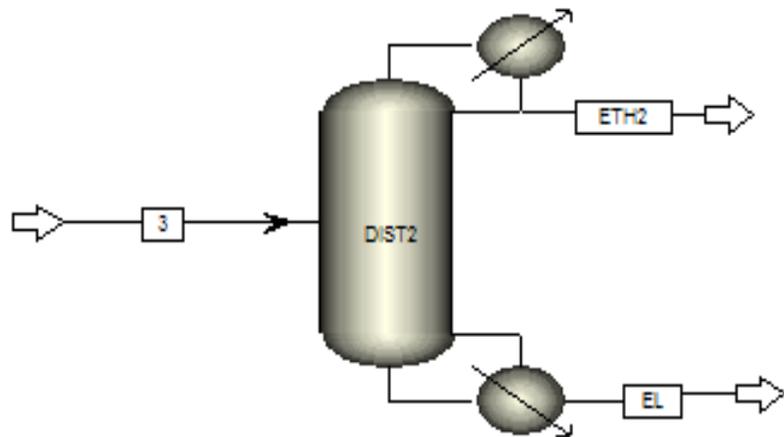


Figura 5.3.10 – Etapa de separação do lactato de etila

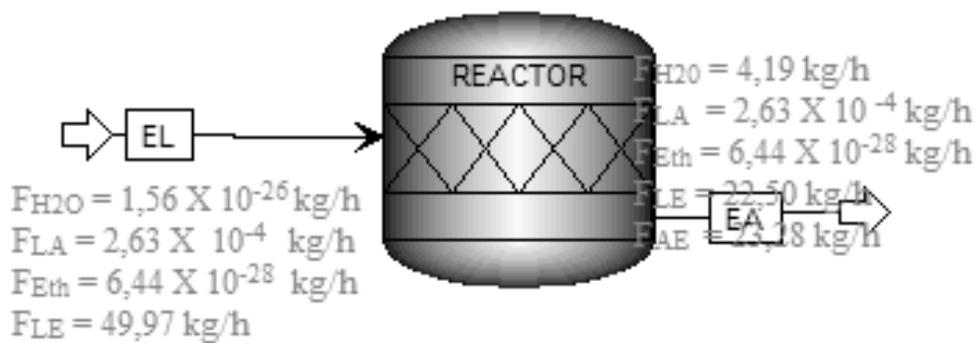


Figura 5.3.11 – Etapa de desidratação do lactato de etila

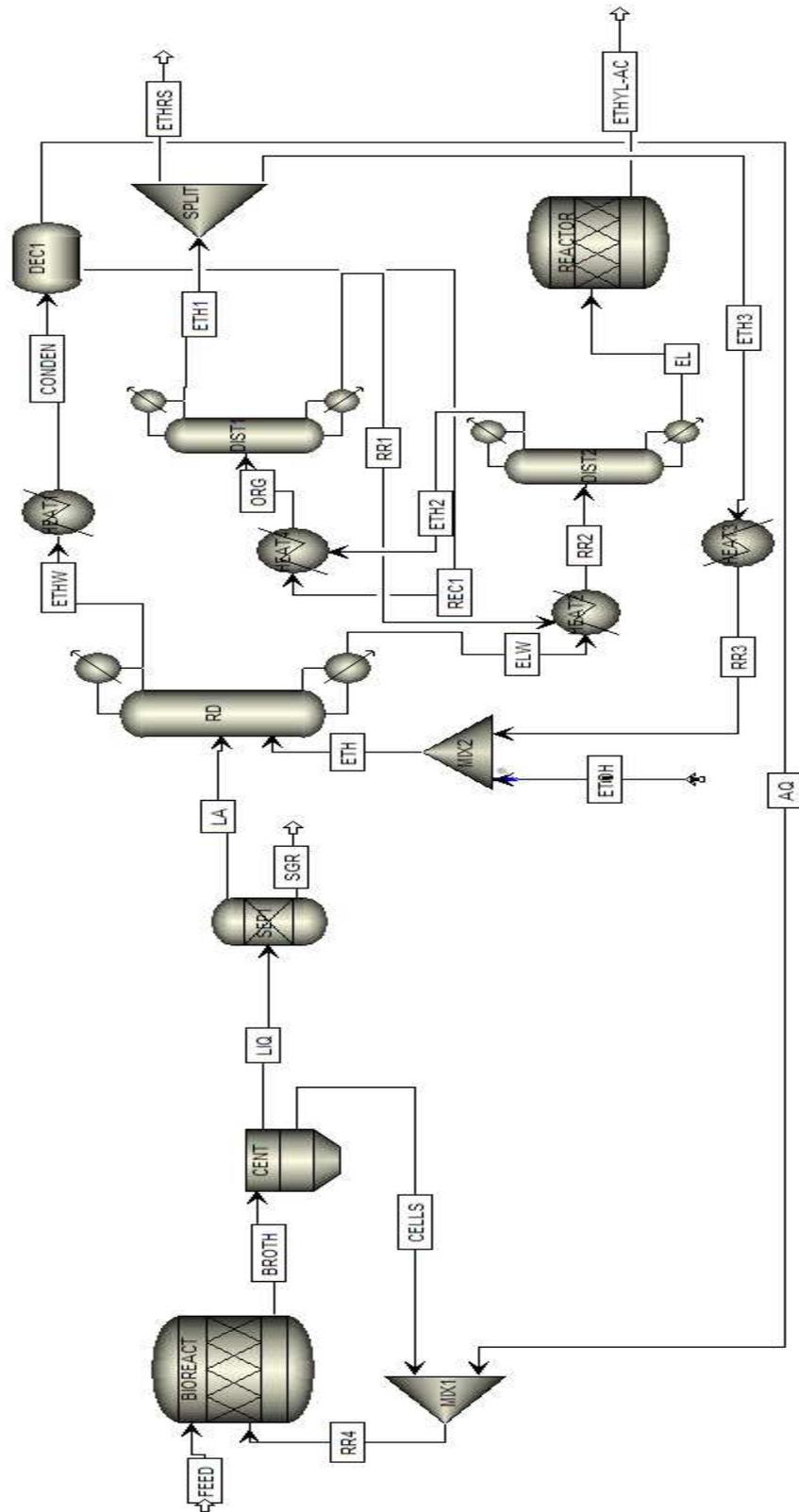


Figura 5.3.12 – Fluxograma da simulação do processo integrado para produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila

Tabela 5.3.2 - Especificações das colunas usadas na simulação do processo de produção de lactato de etila

Coluna	Tipo	Especificação	Valor
01	Coluna de destilação reativa (RD)	Número de estágios	29
		Número de estágios reativos	23
		Razão de refluxo (mol)	0,93
		Vazão de produto de fundo (kmol/h)	1,0
		Temperatura de alimentação de etanol (°C)	100
		Vazão de alimentação de etanol (kmol/h)	6
02	Coluna de destilação (DIST1)	Número de estágios	30
		Razão de refluxo (mol)	0,6
		Vazão de produto de fundo (kg/h)	30
03	Coluna de destilação (DIST2)	Número de estágios	40
		Razão de refluxo (mol)	0,99
		Vazão de produto de fundo (kg/h)	50

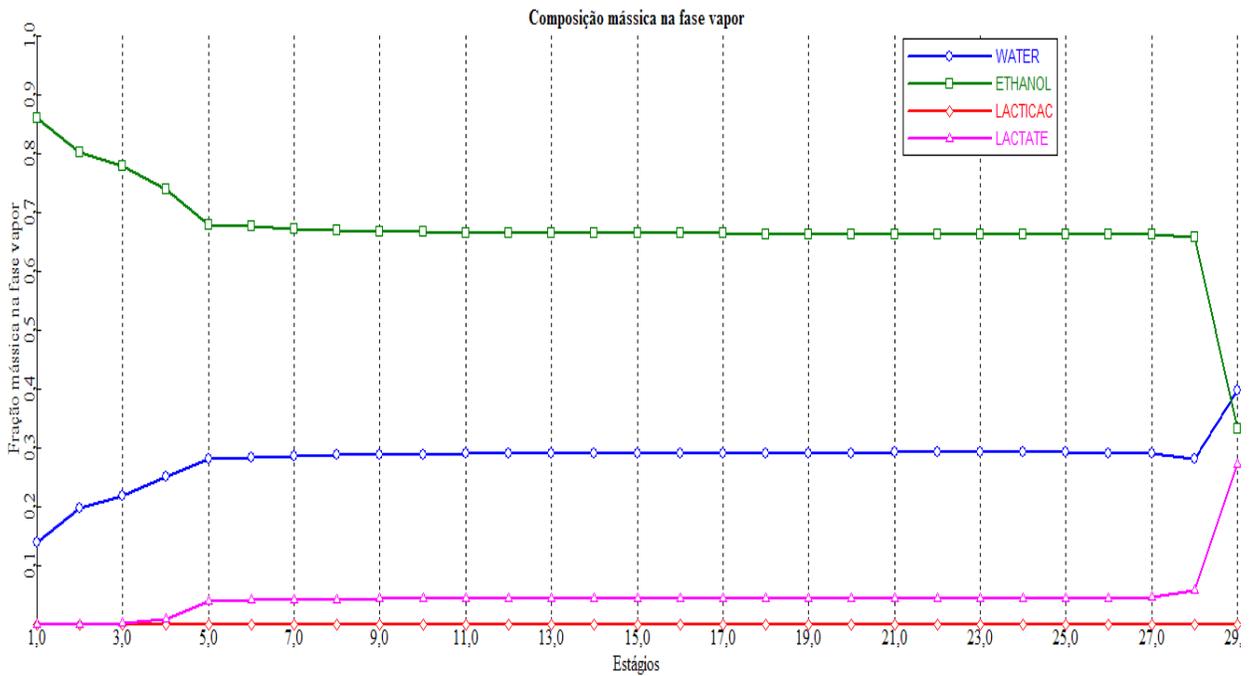


Figura 5.3.13 - Perfis das composições mássicas na fase vapor ao longo dos estágios da coluna de destilação reativa (RD) (P = 1 atm)

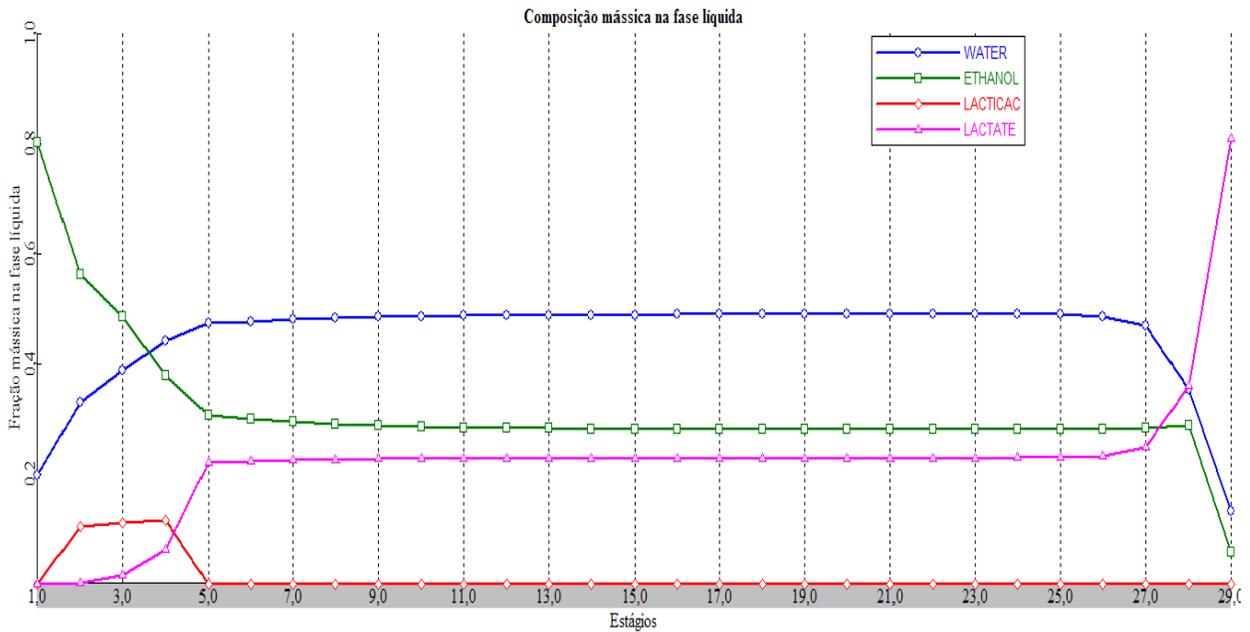


Figura 5.3.14 - Perfis das composições mássicas na fase líquida ao longo dos estágios da coluna de destilação reativa (RD) (P = 1 atm)

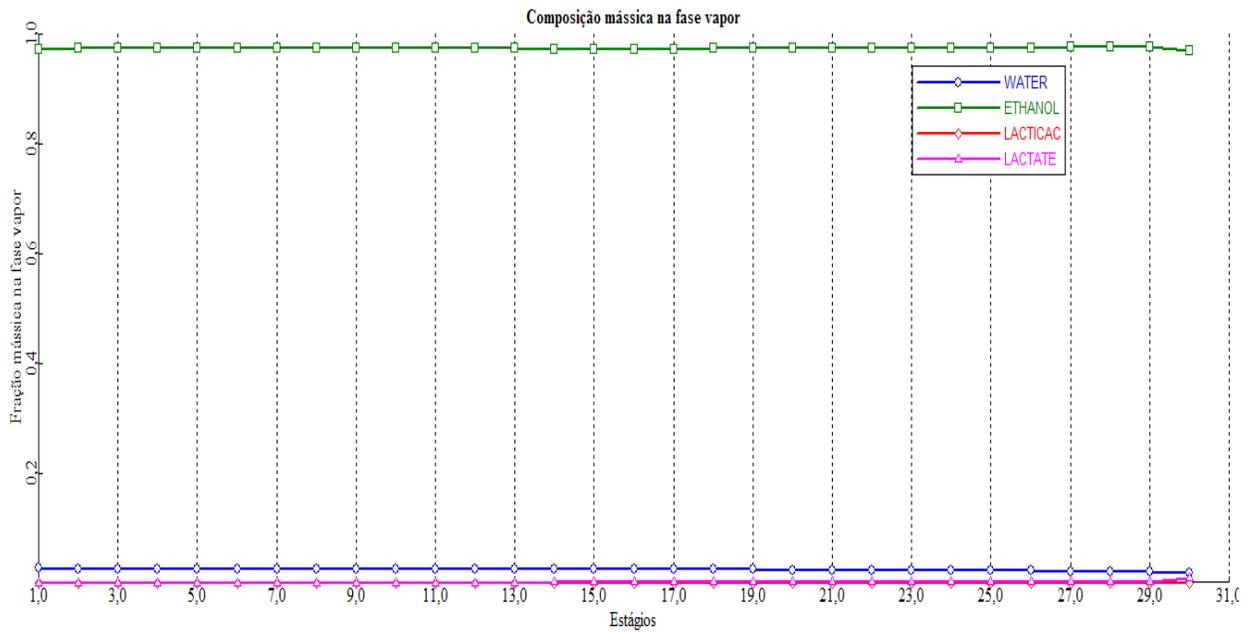


Figura 5.3.15 - Perfis das composições mássicas na fase vapor ao longo dos estágios da coluna de destilação (DIST1) (P = 1 atm)

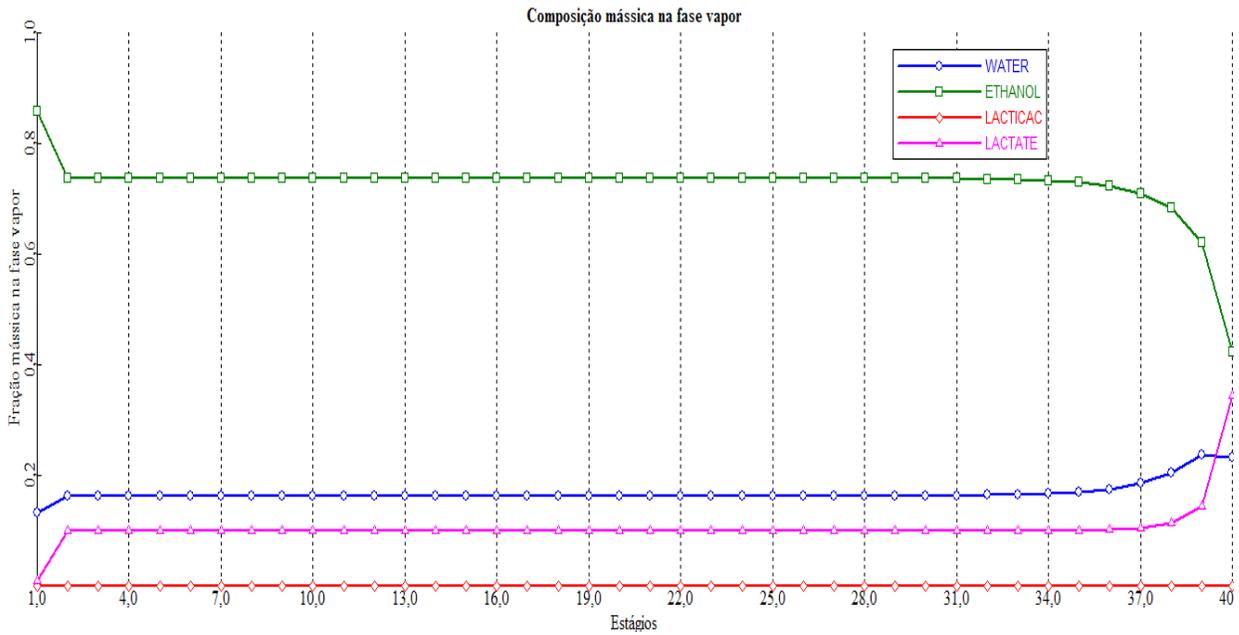


Figura 5.3.16 - Perfis das composições mássicas na fase vapor ao longo dos estágios da coluna de destilação (DIST2) (P = 1 atm)

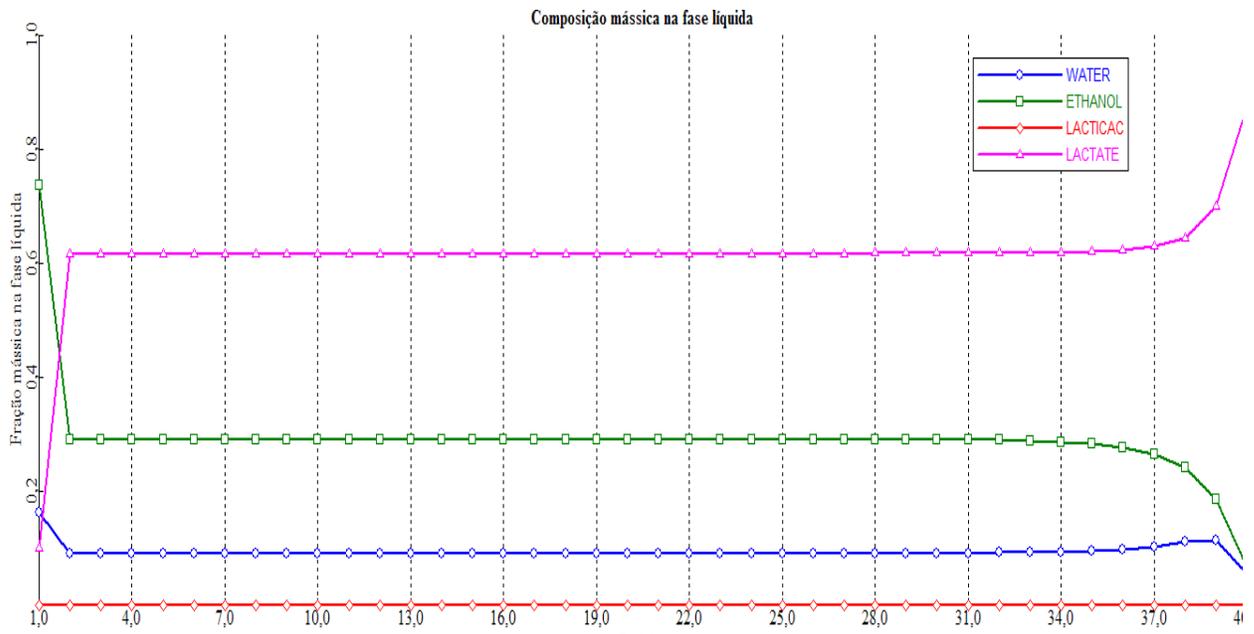


Figura 5.3.17 - Perfis das composições mássicas na fase líquida ao longo dos estágios da coluna de destilação (DIST2) (P = 1 atm)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA, T. M.; IKARASHI, A.; SAITO, Y.; WATANABE, M.; SMITH JR., R. L.; ARAI, K. Dehydration of lactic acid to acrylic acid in high temperature water at high pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 50, p. 257-264, 2009.
- ASTHANA, N.; KOLAH, A.; VU, D. T.; LIRA, C. T.; MILLER, D. J. A continuous reactive separation process for ethyl lactate formation. *Organic Process Research & Development*, v. 9, p. 599-607, 2005.
- DELGADO, P.; SANZ, M. T.; BELTRÁN, S. Kinetic study for esterification of lactic acid with ethanol and hydrolysis of ethyl lactate using a ion-exchange resin catalyst. *Chemical Engineering Journal*, v. 126, p. 111-118, 2007.
- SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C. Introdução à termodinâmica da engenharia química. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, RJ, 1975.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A busca pelo uso de matéria-prima renovável em substituição a fontes petroquímicas para produção de bicompostíveis e produtos químicos vem aumentando constantemente. O ácido láctico é um importante produto para a economia biorrenovável devido sua bifuncionalidade, podendo a partir dele produzir produtos de alto valor agregado. Neste trabalho foi proposta a produção de ácido láctico a partir da fermentação da sacarose usando um microrganismo isolado de um processo industrial, esterificação do ácido láctico para produção de lactato de etila e desidratação do lactato para síntese de acrilato de etila. Foi realizado um *screening* com sessenta bactérias, isoladas da fermentação alcoólica, selecionando ao final uma bactéria versátil, capaz de crescer em uma variedade de fontes de carboidratos, hábil para fermentar sacarose a partir do melão de cana, sem pré-tratamento, e produzir ácido láctico. Para finalizar o trabalho de *screening* foi feita a análise molecular da bactéria a fim de identificar sua espécie. A bactéria selecionada, estudada e identificada foi usada no processo fermentativo para produção de ácido láctico, obtendo-se altos rendimentos (~ 95%). Com o objetivo de evitar a inibição celular por altas concentrações de substrato, bem como, aumentar a concentração final de ácido láctico, o processo foi iniciado com baixa concentração de açúcar e ao longo do processo, foram realizados pulsos de sacarose. A partir dos dados experimentais foi determinada a cinética do processo e esta, usada na modelagem matemática. Depois de desenvolvido o modelo matemático, foi aplicada a técnica de estimação de parâmetros por algoritmo genético a fim de estimar parâmetros que reduzem a diferença entre os dados simulados e experimentais. Por fim, foi aplicado estratégia de controle *feedback* usando controlador por matriz dinâmica (DMC), a fim de fazer com que o fermentador operasse de forma eficiente e segura. O ácido láctico produzido nos processos fermentativos desenvolvidos, foi esterificado com etanol num sistema de destilação reativa para produção de lactato de etila. Foram realizados experimentos a fim de verificar a viabilidade da produção de lactato de etila a partir da esterificação do ácido láctico em uma coluna de destilação reativa, bem como, identificar a influência de alguns parâmetros sobre o

processo. A avaliação da influência dos parâmetros foi realizada através do desenvolvimento de planejamento fatorial e foi percebido que para aumentar o rendimento de lactato, quando catalisador heterogêneo (Amberlyst) é usado, é necessário usar uma razão molar etanol:ácido láctico maior e uma maior temperatura de alimentação do ácido na coluna. Porém, quando ácido sulfúrico é usado como catalisador, deve-se usar uma menor razão molar etanol:ácido láctico e uma menor temperatura de alimentação do ácido. O lactato de etila produzido foi usado para avaliar rotas de síntese de acrilato de etila a partir da desidratação do lactato. Foram desenvolvidos alguns ensaios, no entanto, se teve muita dificuldade em obter acrilato de etila. Devido ao grande interesse mundial na produção de acrilato de etila a partir de fontes renováveis novos estudos serão desenvolvidos, a fim de se obter uma rota eficiente e economicamente viável para a síntese de acrilato de etila.

Ao final do trabalho foi proposto e simulado um processo integrado de produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila. A simulação foi realizada com o auxílio do simulador Aspen Plus®. Foi obtida uma corrente com fração molar de lactato de etila de 0,99, que foi usado na reação de desidratação para síntese de acrilato de etila.

Algumas sugestões de trabalhos futuros são descritas abaixo.

- Avaliação e otimização do processo de recuperação e purificação do ácido láctico.
- Otimização do processo de produção de lactato de etila usando sistema de destilação reativa.
- Aplicação de estratégias de controle no sistema de destilação reativa para produção de lactato de etila.
- Avaliação e otimização das condições operacionais para síntese de acrilato de etila a partir da desidratação do lactato de etila.
- Desenvolvimento de um modelo matemático para representar a produção láctica, considerando reciclo de célula.
- Desenvolvimento de modelos estruturados, descrevendo também a modelagem da matriz intracelular para produção de ácido láctico via fermentação.

- Otimização da simulação do processo integrado de produção de ácido láctico, lactato de etila e acrilato de etila.
- Análise econômica e energética do processo integrado.
- Validação da sustentabilidade das etapas do processo.
- Simulação de um processo integrado de produção de etanol, ácido láctico e lactato de etila.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela A.1 – pH final após 48h de incubação

Ensaio	pH final	Ensaio	pH final	Ensaio	pH final	Ensaio	pH final
1 F	3,61	9 F	3,55	17 F	3,45	25 F	3,46
1 G	3,79	9 G	3,58	17 G	3,50	25 G	3,53
1 S	5,05	9 S	3,60	17 S	3,50	25 S	3,50
2 F	3,46	10 F	3,44	18 F	3,42	26 F	3,44
2 G	3,42	10 G	3,38	18 G	3,70	26 G	3,32
2 S	3,40	10 S	3,41	18 S	3,46	26 S	3,37
3 F	3,52	11 F	3,46	19 F	3,43	27 F	4,03
3 G	3,71	11 G	3,40	19 G	3,42	27 G	3,94
3 S	3,86	11 S	3,52	19 S	3,40	27 S	4,10
4 F	3,44	12 F	3,46	20 F	3,56	28 F	3,42
4 G	3,41	12 G	3,35	20 G	3,42	28 G	3,30
4 S	3,46	12 S	3,37	20 S	3,47	28 S	3,35
5 F	3,47	13 F	4,03	21 F	3,58	29 F	3,67
5 G	3,42	13 G	3,85	21 G	3,46	29 G	3,62
5 S	3,46	13 S	3,91	21 S	3,61	29 S	3,97
6 F	3,48	14 F	3,44	22 F	3,54	30 F	3,24
6 G	3,51	14 G	3,50	22 G	3,44	30 G	3,18
6 S	3,55	14 S	3,48	22 S	3,50	30 S	3,31
7 F	3,44	15 F	3,44	23 F	3,63		
7 G	3,38	15 G	3,41	23 G	3,78		
7 S	3,37	15 S	3,44	23 S	4,46		
8 F	3,42	16 F	3,55	24 F	3,34		
8 G	3,37	16 G	3,66	24 G	3,30		
8 S	3,39	16 S	3,67	24 S	3,34		

F – frutose; G – glicose; S – sacarose

Tabela A.1 – pH final após 48h de incubação

Ensaio	pH final						
31 F	3,23	39 F	3,47	47 F	3,37	55 F	3,24
31 G	3,22	39 G	3,55	47 G	3,40	55 G	3,23
31 S	3,20	39 S	3,61	47 S	3,76	55 S	3,27
32 F	3,33	40 F	3,37	48 F	3,44	56 F	3,46
32 G	3,38	40 G	3,43	48 G	3,45	56 G	3,65
32 S	3,38	40 S	3,70	48 S	3,86	56 S	4,17
33 F	3,21	41 F	3,52	49 F	3,53	57 F	3,47
33 G	3,16	41 G	3,49	49 G	3,54	57 G	3,45
33 S	3,19	41 S	3,76	49 S	3,43	57 S	4,18
34 F	3,45	42 F	3,44	50 F	3,42	58 F	3,27
34 G	3,41	42 G	3,47	50 G	3,39	58 G	3,26
34 S	3,40	42 S	4,32	50 S	3,71	58 S	3,21
35 F	3,45	43 F	3,50	51 F	3,47	59 F	3,65
35 G	3,46	43 G	3,52	51 G	3,60	59 G	3,62
35 S	3,42	43 S	3,51	51 S	3,61	59 S	3,66
36 F	3,55	44 F	3,47	52 F	3,22	60 F	3,26
36 G	3,64	44 G	3,43	52 G	3,24	60 G	3,21
36 S	3,45	44 S	4,31	52 S	3,24	60 S	3,28
37 F	3,53	45 F	3,61	53 F	3,22		
37 G	3,49	45 G	3,46	53 G	3,26		
37 S	3,76	45 S	3,47	53 S	3,35		
38 F	3,51	46 F	3,41	54 F	3,17		
38 G	3,75	46 G	3,63	54 G	3,18		
38 S	3,54	46 S	3,82	54 S	3,22		

F – frutose; G – glicose; S – sacarose

Tabela A.2 – Concentração de L(+)-ácido láctico

Ensaio	L(+) LA (mmol/L)						
1 F	8,9	9 F	3,0	17 F	5,1	25 F	15,5
1 G	17,1	9 G	14,2	17 G	13,1	25 G	15,3
1 S	4,5	9 S	11,7	17 S	13,4	25 S	14,8
2 F	8,2	10 F	4	18 F	5,4	26 F	14,2
2 G	11,1	10 G	9,9	18 G	14,3	26 G	12,7
2 S	9,2	10 S	6,6	18 S	9,8	26 S	11,8
3 F	8,6	11 F	4,7	19 F	6,2	27 F	20,2
3 G	16,7	11 G	11	19 G	13,1	27 G	19,2
3 S	14,5	11 S	10,3	19 S	8,1	27 S	19,7
4 F	5,3	12 F	5,6	20 F	9,2	28 F	11,7
4 G	11,5	12 G	12,1	20 G	12,9	28 G	11,8
4 S	9,2	12 S	7,1	20 S	11,3	28 S	9,8
5 F	4,8	13 F	9,9	21 F	10,7	29 F	19,2
5 G	5,0	13 G	13,7	21 G	12,2	29 G	18,5
5 S	4,8	13 S	15,2	21 S	11,1	29 S	20,4
6 F	8,8	14 F	7,0	22 F	17,6	30 F	10,2
6 G	9,3	14 G	14,9	22 G	14,9	30 G	9,2
6 S	12,3	14 S	11,8	22 S	16,5	30 S	10,5
7 F	3,4	15 F	5,0	23 F	13,8		
7 G	10,6	15 G	11,2	23 G	17,7		
7 S	4,3	15 S	9,1	23 S	9,2		
8 F	2,7	16 F	7,7	24 F	10,6		
8 G	7,1	16 G	16,1	24 G	10,8		
8 S	4,8	16 S	14,0	24 S	13,6		

F – frutose; G – glicose; S – sacarose

Tabela A.2 – Concentração de L(+)-ácido láctico

Ensaio	L(+) LA (mmol/L)	Ensaio	L(+) LA (mmol/L)	Ensaio	L(+) LA (mmol/L)	Ensaio	L(+) LA (mmol/L)
31 F	11,4	39 F	11,6	47 F	11,0	55 F	11,8
31 G	11,5	39 G	16,7	47 G	13,8	55 G	12,8
31 S	10,6	39 S	17,7	47 S	17,7	55 S	11,7
32 F	12	40 F	13,3	48 F	11,6	56 F	10,3
32 G	14,7	40 G	13,8	48 G	16,1	56 G	17,6
32 S	14,0	40 S	19,1	48 S	19,8	56 S	11,0
33 F	11,2	41 F	11,4	49 F	13,7	57 F	15,8
33 G	8,7	41 G	16,1	49 G	17,4	57 G	14,5
33 S	8,2	41 S	16,7	49 S	15,5	57 S	11,9
34 F	10,7	42 F	10,7	40 F	9,1	58 F	11,2
34 G	14,8	42 G	15,7	40 G	15,3	58 G	10,6
34 S	15,2	42 S	10,1	40 S	18,5	58 S	10,2
35 F	13,9	43 F	12,7	41 F	13,2	59 F	13,4
35 G	15,3	43 G	17	41 G	16,6	59 G	14,5
35 S	13,5	43 S	17,5	41 S	18,1	59 S	14,7
36 F	12,3	44 F	13,7	42 F	7,9	60 F	11,2
36 G	17,8	44 G	16,3	42 G	10,4	60 G	11,2
36 S	16,3	44 S	9	42 S	9,2	60 S	12,1
37 F	12,6	45 F	14,7	43 F	11,2		
37 G	17,1	45 G	15,6	43 G	12,7		
37 S	19,7	45 S	17,2	43 S	12,5		
38 F	11,9	46 F	8,6	44 F	6,9		
38 G	18,6	46 G	16	44 G	6,5		
38 S	14,0	46 S	15,7	44 S	11,3		

F – frutose; G – glicose; S - sacarose

Tabela A.3 – Concentração de ácido láctico usando cepa 7 (48 horas)

<i>Ensaio</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9(C)</i>	<i>10(C)</i>
Concentração	4,4	0,4	5,5	0,7	5,7	1,1	5,3	1,6	3,9	3,3
(g/L)	4,5	0,7	5,1	1,0	4,9	1,3	5,7	1,8	4,2	4,1

Tabela A.4 – Concentração de ácido acético usando cepa 7 (48 horas)

<i>Ensaio</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9(C)</i>	<i>10(C)</i>
Concentração	1,0	1,0	1,1	1,0	1,8	1,8	1,8	2,2	1,4	1,3
(g/L)	1,0	1,1	1,5	1,5	2,0	2,0	1,6	1,8	1,6	1,2

Tabela A.5 – Concentração de ácido láctico usando cepa 25 (48 horas)

<i>Ensaio</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9(C)</i>	<i>10(C)</i>
Concentração	5,5	3,8	7,5	4,1	7,1	4,0	7,2	4,6	5,3	4,9
(g/L)	5,5	4,2	7,0	4,0	7,5	4,2	7,5	4,4	5,4	5,0

Tabela A.6 – Concentração de ácido acético usando cepa 25 (48 horas)

<i>Ensaio</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9(C)</i>	<i>10(C)</i>
Concentração	1,3	1,5	0,9	0,9	2,1	1,7	1,8	1,6	1,5	1,6
(g/L)	1,2	1,3	0,9	0,9	2,0	1,9	1,5	1,7	1,6	1,6

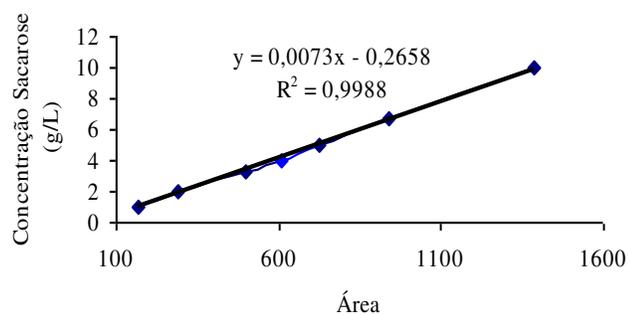
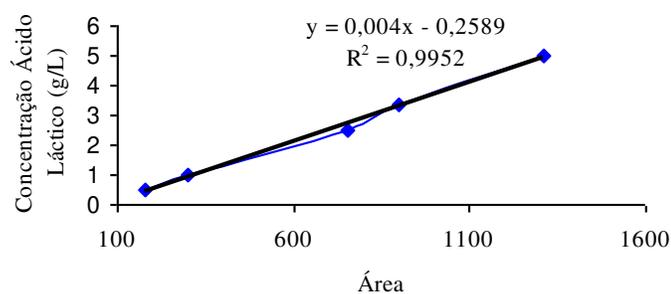
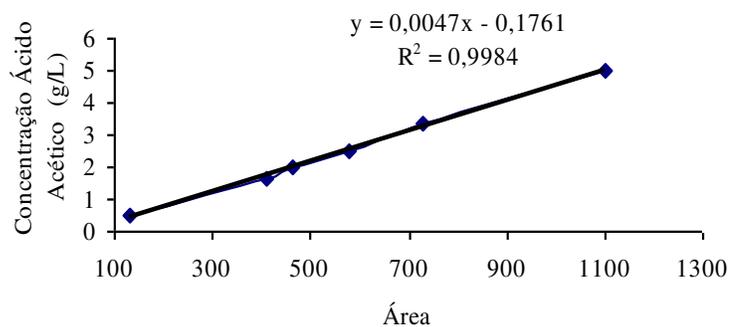
Tabela A.7 – Concentração de ácido láctico usando cepa 27 (48 horas)

<i>Ensaio</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9(C)</i>	<i>10(C)</i>
Concentração	4,8	4,2	6,7	4,7	7,1	3,1	7,5	5,6	5,1	5,2
(g/L)	6,3	4,6	6,4	5,4	6,9	3,6	6,8	5,5	6,2	5,4

Tabela A.8 – Concentração de ácido acético usando cepa 27 (48 horas)

<i>Ensaio</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9(C)</i>	<i>10(C)</i>
Concentração	0,9	1,2	1,1	1,0	2,9	1,9	2,0	1,9	1,4	1,5
(g/L)	0,7	1,1	1,6	1,1	2,3	1,0	2,3	1,7	1,4	1,7

APÊNDICE B

**Figura B.1** - Curva de calibração para determinação da concentração de sacarose**Figura B.2** - Curva de calibração para determinação da concentração de ácido láctico**Figura B.3** - Curva de calibração para determinação da concentração de ácido acético

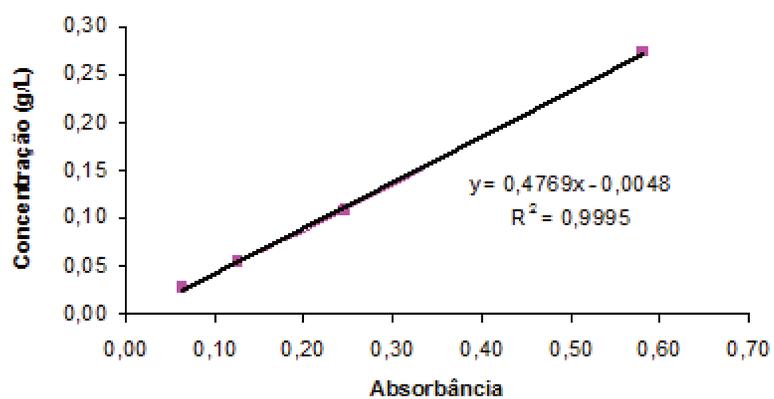


Figura B.4 - Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa