



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS



*Laboratory of Optimization, Design and Advanced Control*

**MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SÍNTESE DO ÁCIDO  
PROPANÓICO VIA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL**

**Autora:** Dayana de Gusmão Coêlho  
**Orientador:** Rubens Maciel Filho

**Dissertação de mestrado apresentada à  
Faculdade de Engenharia Química da  
Universidade Estadual de Campinas, como  
parte dos requisitos para a obtenção do título  
de Mestre em Engenharia Química.**

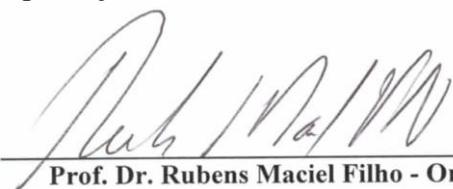
**Campinas**

**2011**

**Dayana de Gusmão Coêlho**

**MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SÍNTESE DO ÁCIDO  
PROPANÓICO VIA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Faculdade de Engenharia Química da  
Universidade Estadual de Campinas, como  
requisito para a obtenção do título de mestre em  
Desenvolvimento de Processos Químicos.  
Aprovação em 04/07/2011



**Prof. Dr. Rubens Maciel Filho - Orientador**

**Universidade Estadual de Campinas - FEQ**



**Prof. Dr.ª. Sandra Helena Vieira de Carvalho**

**Universidade Federal de Alagoas - CTEQ**



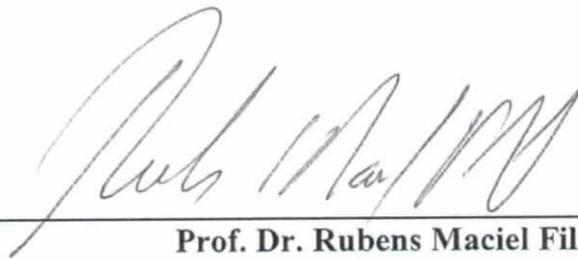
**Prof. Dr. Patrícia Fazzio Martins**

**Universidade Estadual de Campinas - FEQ**

**Campinas**

**2011**

Este exemplar corresponde à versão final de Dissertação de Mestrado em Engenharia  
Química.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rub Maciel Filho', is positioned above a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

**Prof. Dr. Rubens Maciel Filho**

**Orientador**

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

C65m Coêlho, Dayana de Gusmão  
Modelagem e otimização do processo de síntese do ácido propanóico via fermentação do glicerol / Dayana de Gusmão Coêlho. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Rubens Maciel Filho.  
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Glicerina. 2. Modelos matemáticos. 3. Biotecnologia. 4. Planejamento experimental. 5. Otimização. I. Maciel Filho, Rubens. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Modeling and optimization of process for synthesis of propionic acid through the glycerol fermentation

Palavras-chave em Inglês: Glycerin, Mathematical models, Biotechnology, Experimental design, Optimization

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Sandra Helena Vieira de Carvalho, Patrícia Fazzio Martins

Data da defesa: 04/07/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

*À minha família, em especial aos meus pais Vanilo  
Vieira Coelho e Danúzia de Gusmão Coelho, aos meus irmãos  
Vanessa de Gusmão Coêlho e Daniel de Gusmão Coêlho, e ao meu  
noivo, Aldenyr Pontes de Almeida; dedico este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, à DEUS, pela vida e por sua forte presença, no qual sem a confiança e fé não seria possível a execução deste trabalho.

Aos meus pais Vanilo Vieira Coêlho e Danúzia de Gusmão Coêlho, pela vida, e também juntamente com meus irmãos Vanessa de Gusmão Coêlho e Daniel de Gusmão Coêlho; com muito amor e paciência, por todo o apoio e compreensão durante a execução deste trabalho e por tudo que me ensinaram, que mesmo longe sempre estiveram presentes, mostrando que a distância traz consigo ainda mais a união de laços familiares.

À minha família por todo apoio, incentivo e compreensão em mais essa etapa.

Ao meu querido noivo Aldenyr Pontes de Almeida pelo companheirismo invejável, compreensão, paciência, pelo despertar da felicidade.

À minha segunda família, família Pontes, pela amizade e encorajamento durante a jornada.

Aos meus amigos e irmãos de coração, Danielle Brito Borges, Paulo Aliberto, Leandro Melo e Lívia Feitosa, Corina Sepeda, Luiza Helena, Camila Albuquerque e Bruno Guzzo sempre companheiros, e por toda manifestação de amizade.

Ao professor Dr. Rubens Maciel pela sua dedicada orientação, otimismo e entusiasmo para a realização deste trabalho; bem como a confiança, e amizade para sempre lembradas.

À professora Dr<sup>a</sup> Maria Regina pela colaboração no trabalho e pela amizade.

Ao prof Dr. Frede de Oliveira Carvalho, Sandra Helena Vieira de Carvalho e João Inácio Soletti, da Universidade Federal de Alagoas, pelas importantes discussões, amizade e apoio para a execução deste projeto.

À Eduardo Coselli Vasco de Toledo e Jonathan da Cunha Teixeira pela disponibilidade esclarecimento das dúvidas e discussões do desenvolvimento do projeto.

À todos os colegas do LOPCA, LEB e LEPFE, em especial (Sérgio Andres, Alexandre Miguel, Rafael Ramos, Gislaine Ghiselli, Daniele Farias, Cristiane Andrade, Alex Machado, Anderson Bonon, Betânia Lunelli,), pela amizade, convivência e pela contribuição ao trabalho desenvolvido.

À todos os professores do Departamento de Processos Químicos da Universidade Estadual de Campinas, em especial à prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Aline Carvalho da Costa, ao Dr. Francisco Maugeri Filho pela hospitalidade, agilidade e auxílio que permitiram a realização deste estudo; e ao prof. Dr. José Vicente pelo incentivo e ensinamentos durante o estágio docente que se fez de grande valia para a minha formação profissional.

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química e ao Departamento de Processos Químicos, por ter me dado à oportunidade para desenvolver o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão a bolsa de estudo.

À todos, meus sinceros MUITO OBRIGADA!

*“Podemos passar inúmeras dificuldades, e ter de batalhar muito para alcançar certos objetivos e, ainda assim, morrermos na praia*

*Podemos deixarmo-nos consumir pelo trabalho, e perder noites de sono ou deixar de passar finais de semana com a família apenas por que temos extrema necessidade de conseguir recursos para mantermos uma vida digna*

*Podemos assistir a injustiça bater à nossa porta e perceber, infelizmente, que em algumas ocasiões não há absolutamente nada a fazer.*

*Podemos chorar com o coração partido a perda da pessoa amada ou de um ente querido.*

*Podemos, por tanta coisa negativa que aconteça, julgarmos que tudo sempre dar errado conosco e maldizermos nossa sorte.*

*Mas a Vida é Superação!*

*Nós não nascemos andando, não nascemos falando - e o que não podemos em hipótese alguma é perdermos o ânimo, o espírito, e nossa capacidade de amar, de se superar e de viver!”(Augusto Branco modificado)*

## RESUMO

Atualmente, a grande parcela de produção do ácido propanóico ocorre a partir da síntese química, tendo como matéria-prima o petróleo. O conhecimento das limitações das fontes não-renováveis, sobretudo o esgotamento das matérias derivadas do petróleo, constitui o grande desafio na busca de fontes alternativas, competitivas e sustentáveis, em face do intento na preservação ambiental. O presente trabalho versa acerca do estudo de processo fermentativo, visando a minimizar a exploração desenfreada dos recursos naturais, comandada atualmente pelas fontes petroquímicas, bem como propiciar caminhos paralelos e alternativos por meio de fontes renováveis. Desta forma, este projeto tem como objetivo investigar a produção do ácido propanóico, por meio de processo biotecnológico, utilizando como matéria-prima o glicerol e o microrganismo *propionibacterium acidipropionici*. Neste âmbito, para a análise do sistema em batelada, será realizada a modelagem matemática do processo, por intermédio de modelos não estruturados, e a simulação do referido processo pelo método de Runge Kutta. Os parâmetros operacionais e cinéticos foram otimizados por intermédio da aplicação da técnica de planejamentos de experimentos por Metodologia de Superfície de Resposta e pelo Algoritmo Genético. Deste modo, por meio de desenvolvimento dos modelos, otimização dos parâmetros e das condições de operação podemos, determinar as condições, limitações e viabilidade do processo constituindo ferramentas fundamentais na investigação do comportamento do processo a fim de maximizar a produção do ácido propanóico possibilitando uma rota alternativa para este processo.

**Palavras-chave:** glicerol, fermentação, processos biotecnológicos, ácido propanóico, otimização, batelada.

## ABSTRACT

Currently, a large proportion of propionic acid production occurs from chemical synthesis, with the raw oil. Knowing the limitations of non-renewable sources, especially the depletion of petroleum derived feedstock, is the great challenge in finding alternative sources, competitive and sustainable in the face of intent on environmental preservation. The present paper is about the study of the fermentation process, in order to minimize the uncontrolled exploitation of natural resources, currently led by petrochemical sources, as well as provide alternative and parallel paths through renewable sources. Thus, this project aims to investigate the production of propionic acid by biotechnology process using as raw glycerol and microorganism *Propionibacterium acidipropionici*. In this context, to analyze the batch system will be the mathematical model of the process through unstructured models, and simulation of this process by the Runge Kutta. The operational parameters and kinetics were optimized through the application of the technique of planning of experiments by Response Surface Methodology and the Genetic Algorithm. Thus, through the development of models, optimization of parameters and operating conditions can determine the conditions, limitations and feasibility of the process constitutes the fundamental tools for investigating the behavior of the process in order to maximize production of propionic acid providing an alternative route for this process.

**Key-words:** biodiesel, glycerol, fermentation, biotechnology process, propionic acid, optimization, batch.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Objetivos .....	3
1.2 - Organização da dissertação .....	4
<b>CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
2.1 - Produção do ácido propanóico .....	6
2.1.1 - Ácido Propanóico .....	6
2.1.2 Síntese da produção do ácido propanóico .....	7
2.1.2.1 Síntese Química.....	8
2.1.2.2 Síntese biológica.....	8
2.1.3 - Metabolismo microbiológico.....	9
2.1.4 – Fontes de carbono e microrganismos utilizados na fermentação propiônica .	10
2.1.4.1 – Glicerol.....	13
2.1.5 – Efeito do meio de cultura na fermentação propiônica.....	16
2.1.6 – Efeito do pH na fermentação propiônica.....	16
2.1.7 – Efeito da temperatura na fermentação propiônica .....	17
2.1.8 – Aplicações e mercado do ácido propanóico .....	18
2.2 Modelagem matemática .....	21
2.2.1 Modelos cinéticos não estruturados .....	22
2.2.2 Tipos de processos .....	24
2.3 Métodos matemáticos.....	26
2.3.1 Modelo determinístico (solução pelo Método de Runge-Kutta) .....	26
2.4. Planejamento de experimentos .....	29
2.4.1 Metodologia de Superfície de Resposta .....	30
2.5 Rendimento e produtividade.....	30
2.5.1 Rendimento.....	30
2.5.2 Produtividade volumétrica.....	31
<b>CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>

3.1 Materiais .....	32
3.1.1 Fonte de carbono.....	32
3.1.2 Microrganismo .....	32
3.1.3 Fermentador .....	33
3.2 Métodos analíticos.....	33
3.2.1 Determinação da biomassa (Análise gravimétrica) .....	34
3.2.2 Determinação do pH .....	35
3.2.3 Quantificação da fonte de carbono e dos ácidos orgânicos .....	35
3.3 Metodologia usada na execução dos experimentos .....	36
3.3.1 Preparo do inóculo .....	36
3.3.2 Estudo do pH na fermentação para produção do ácido propanóico.....	38
3.3.3 Estudo da temperatura na produção do ácido propanóico.....	40
3.3.4 Estudo da biomassa e do substrato para um processo em batelada .....	40
3.4. Desenvolvimento do modelo matemático .....	41
3.4.1 Processo em batelada .....	42
3.4.2 Processo em batelada alimentada.....	46
3.4.3 Processo contínuo .....	50
3.5. Algoritmo de otimização .....	53
3.6. Desvio padrão residual .....	55
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>56</b>
4.1 Estudo do efeito do pH na fermentação para produção do ácido propanóico .....	56
4.2 Estudo do efeito da temperatura na fermentação para produção do ácido propanóico..	62
4.2.1. Otimização dos parâmetros cinéticos através do Algoritmo Genético .....	62
4.3. Otimização do substrato e da biomassa para um processo em batelada .....	72
4.3.1 Dados cinéticos da literatura.....	72
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>78</b>
5.1 Conclusões.....	78
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	79
<b>CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>88</b>

ANEXO A: Curvas de calibração .....	88
ANEXO B: Quantificação dos ácidos e do glicerol através da Cromatografia Líquida de Alta Performance .....	92

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>Figura 1.1</b> – Rota do ácido propanóico e produtos de fermentação (Modificado de Suwannakham, 2005).....	2
<b>CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2.1</b> – Fórmula estrutural do ácido propanóico (a-fórmula do ácido propanóico no plano; b-fórmula do ácido propanóico em 3D). .....	6
<b>Figura 2.2</b> – Rota dos produtos obtidos por processos microbiológicos .....	9
<b>Figura 2.3</b> - Fórmula estrutural do glicerol. ....	13
<b>Figura 2.4</b> – Reação de produção de glicerol. ....	14
<b>Figura 2.5</b> - Principais aplicações do glicerol. ....	15
<b>Figura 2.6</b> - Mercado de consumo do ácido propanóico em 2008. ....	18
<b>Figura 2.7</b> – Consumo de ácido propanóico no mundo. a – consumo em 2006, b-consumo em 2009 (Smit, 2007; Bizzari e Blagoev, 2007, 2010). ....	19
<b>Figura 2.8</b> – Dados históricos do ácido propanóico (E.U.A). ....	20
<b>Figura 2.9</b> - Esquema de um algoritmo genético, baseado em Linden (2006).....	28
<b>CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 3.1</b> - <i>Propionibacterium acidipropionici</i> . ....	32
<b>Figura 3.2</b> - Bioreatores para o estudo do pH e temperatura.....	33
<b>Figura 3.3</b> – Estufa de secagem especial Marconi, modelo MA-035/2.....	34
<b>Figura 3.4</b> – Espectrofotômetro FEMTO 600 S.....	34
<b>Figura 3.5</b> – pHmetro Digimed DM 22.....	35
<b>Figura 3.6</b> – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (a- detector índice de refração (RI) ; b- detector UV; c- bomba para distribuição de solventes; d- forno com a coluna HPX-87H; e- computador com o software Millennium para quantificação dos compostos; f-injetor automático tipo carrossel). ....	36
<b>Figura 3.7</b> – Câmera de fluxo.....	37
<b>Figura 3.8</b> – Etapas do inóculo processo fermentativo (a - Ágar inclinado; b - Inóculo de ativação; c - Inóculo do meio de cultura; d – Fermentação no bioreator).....	38
<b>Figura 3.9</b> – Diagrama das etapas do processo para o estudo do pH.....	39

<b>Figura 3.10</b> – Diagrama das etapas do processo para o estudo da temperatura. ....	40
<b>Figura 3.11</b> – Diagrama do processo para o planejamento da concentração de substrato e biomassa. ....	41
<b>Figura 3.12</b> – Diagrama para otimização dos parâmetros do processo em batelada. ....	54
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>56</b>
<b>Figura 4.1</b> – Perfis de concentração da fermentação propiônica para o pH = 7,0 para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).....	58
<b>Figura 4.2</b> Perfis de concentração da fermentação propiônica para o pH = 6,0 para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).....	58
<b>Figura 4.3</b> – Perfis de concentração da fermentação propiônica sem o controle do pH para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da ..	59
simulação (-).....	59
<b>Figura 4.4</b> – Rendimento em mmol do produto para cada 100 mmol de substrato consumido ( ); rendimento mássico de produto produzido por substrato consumido (□), e produtividade (◇) dos dados simulados da produção do ácido propanóico em função do pH para uma concentração inicial de substrato de 20 g/L e uma concentração inicial microbiana de 0,15 g/L.....	61
<b>Figura 4.5</b> – Esboço da influência do pH no tempo total da fermentação propiônica para as condições de $S_o = 20$ g/L e $X_o = 0,15$ g/L.....	61
<b>Figura 4.6</b> - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 30 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da ..	66
simulação (-).....	66
<b>Figura 4.7</b> - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 31 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da ..	67
simulação (-).....	67
<b>Figura 4.8</b> - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 32 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da ..	67
simulação (-).....	67

<b>Figura 4.9</b> - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 33 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da .. 68 simulação (-).....	68
<b>Figura 4.10</b> - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 34 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).....	68
<b>Figura 4.11</b> Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 35 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da .. 69 simulação (-).....	69
<b>Figura 4.12</b> – Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 36 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).....	69
<b>Figura 4.13</b> – Rendimento em mmol do produto para cada 100 mmol de substrato consumido ( ) ; rendimento mássico de produto produzido por substrato consumido (□), e produtividade (◇) dos dados simulados da produção do ácido propanóico em função da temperatura para uma concentração inicial de substrato de 20 g/L e uma concentração inicial microbiana de 0,15 g/L.	71
<b>Figura 4.14</b> – Esboço da influência da temperatura no tempo total da fermentação propiônica para as condições de $S_o = 20$ g/L e $X_o = 0,15$ g/L. ....	72
<b>Figura 4.15</b> – Perfis de concentração para o processo em batelada para os dados da simulação (—) e para os dados experimentais (o). ....	73
<b>Figura 4.16</b> - Diagrama de Pareto dos efeitos dos parâmetros operacionais sobre a produtividade do ácido propanóico. ....	76
<b>Figura 4.17</b> - Superfície de resposta da produtividade do ácido propanóico. ....	76
<b>ANEXOS</b> .....	<b>88</b>
<b>Figura A.1</b> – Curva de calibração do ácido succínico. ....	88
<b>Figura A.2</b> – Curva de calibração do ácido fórmico. ....	89
<b>Figura A.3</b> – Curva de calibração do ácido acético. ....	89
<b>Figura A.4</b> – Curva de calibração do ácido propanóico.....	90
<b>Figura A.5</b> – Curva de calibração do glicerol.....	90
<b>Figura A.6</b> – Curva de calibração do n-propanol. ....	91

<b>Figura B.1</b> – Curva cromatográfica o pH 7,0 na temperatura de 30 °C para 93,98 h de fermentação. ....	92
<b>Figura B.2</b> – Curva cromatográfica sem o controle do pH na temperatura de 30 °C para 115,3 h de fermentação.....	93
<b>Figura B.3</b> – Curva cromatográfica na temperatura de 30 °C e pH 6,0 para 109,12 h de fermentação. ....	93
<b>Figura B.4</b> – Curva cromatográfica na temperatura de 31 °C e pH 6,0 para 71,75 h de fermentação. ....	94
<b>Figura B.5</b> – Curva cromatográfica na temperatura de 32 °C e pH 6,0 para 64,90 h de fermentação. ....	94
<b>Figura B.6</b> – Curva cromatográfica na temperatura de 33 °C e pH 6,0 para 109,88 h de fermentação. ....	95
<b>Figura B.7</b> – Curva cromatográfica na temperatura de 34 °C e pH 6,0 para 97,63 h de fermentação. ....	95
<b>Figura B.8</b> – Curva cromatográfica na temperatura de 35 °C e pH 6,0 para 82 h de fermentação. ....	96
<b>Figura B.9</b> – Curva cromatográfica na temperatura de 36 °C e pH 6,0 para 67,10 h de fermentação. ....	96

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabela 2.1</b> – Propriedades físico-químicas do ácido propanóico. ....	7
<b>Tabela 2.2</b> - Descrição da produção do ácido propanóico da literatura. ....	12
<b>Tabela 2.3</b> – Propriedades físico-químicas do glicerol. ....	13
<b>Tabela 2.4</b> – Classificação das faixas de temperaturas dos microrganismos. ....	17
<b>Tabela 2.5</b> – Capacidade de produção do ácido propanóico. ....	20
<b>CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 3.1</b> - Composição do meio em Ágar inclinado. ....	36
<b>Tabela 3.2</b> - Composição do meio de ativação da cultura. ....	37
<b>Tabela 3.3</b> - Composição do meio de crescimento da cultura. ....	38
<b>Tabela 3.4</b> - Ensaio para o estudo do pH. ....	39
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 4.1</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=20,79 \text{ kgm}^{-3}$ . ....	56
<b>Tabela 4.2</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, pH = 7,0 e $S_o=20,04 \text{ kgm}^{-3}$ . ....	57
<b>Tabela 4.3</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, sem controle de pH e $S_o=20,00 \text{ kgm}^{-3}$ . ....	57
<b>Tabela 4.4</b> – Parâmetros cinéticos otimizados por algoritmo genético para o estudo do pH. ....	59
<b>Tabela 4.5</b> – Desvio padrão residual para o efeito do pH na fermentação propiônica. ....	60
<b>Tabela 4.6</b> – Estudo das variáveis de processo na fermentação propiônica através da variação no pH. ....	60
<b>Tabela 4.7</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=20,79 \text{ kgm}^{-3}$ . ....	63
<b>Tabela 4.8</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 31°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=16,90 \text{ kgm}^{-3}$ . ....	63
<b>Tabela 4.9</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 32°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=26,61 \text{ kgm}^{-3}$ . ....	64

<b>Tabela 4.10</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 33°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=20,51 \text{ kgm}^{-3}$ .....	64
<b>Tabela 4.11</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 34°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=19,86 \text{ kgm}^{-3}$ .....	65
<b>Tabela 4.12</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 35°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=21,02 \text{ kgm}^{-3}$ .....	65
<b>Tabela 4.13</b> - Dados experimentais da fermentação em batelada à 36°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e $S_o=20,61 \text{ kgm}^{-3}$ .....	66
<b>Tabela 4.14</b> – Parâmetros cinéticos otimizados por algoritmo genético para o estudo da temperatura. ....	70
<b>Tabela 4.15</b> – Desvio padrão residual. ....	70
<b>Tabela 4.16</b> – Estudo das variáveis de processo na fermentação propiônica através da variação da temperatura. ....	71
<b>Tabela 4.17</b> - Parâmetros cinéticos otimizados por GA à 30°C, 20g/L de glicerol e pH 6,8.....	73
<b>Tabela 4.18</b> - Parâmetros Operacionais analisados no planejamento composto central. ....	74
<b>Tabela 4.19</b> - Matriz de planejamento composto central da produção do ácido propanóico. ....	74
<b>Tabela 4.20</b> – Efeito da concentração microbiana e do substrato na produtividade do ácido propanóico nas variáveis de processo. ....	75
<b>Tabela 4.21</b> - ANOVA dos parâmetros operacionais sobre a produtividade de ácido propanóico. ....	75
<b>ANEXOS</b> .....	<b>88</b>
<b>Tabela A.1</b> – Tempos de retenção.....	91

## NOMENCLATURAS

ATCC = American Type Culture Collection.

CCT = Coleção de Culturas Tropical (Fundação André Tosello).

$C_t$  = Concentração do componente total produzido (X ou  $P_x$ )

$C_p$  = Concentração do componente produzido (X ou  $P_x$ )

D = Taxa de diluição ( $h^{-1}$ ).

$\frac{dM_p}{dt}$  = Taxa de manutenção dos produtos (kg/h).

$\frac{dM_{sc}}{dt}$  = Taxa de consumo de substrato (kg/h).

$\frac{dM_{sr}}{dt}$  = Taxa de substrato (kg/h) velocidade de variação de concentração do substrato no fermentador.

$\frac{dM_x}{dt}$  = Taxa de concentração celular (kg/s).

$F_{in}$  = vazão volumétrica de alimentação ( $m^3h^{-1}$ ).

$K_s$  = constante de saturação pelo substrato ( $h^{-1}$ ).

$K_{i1}$  = constante de inibição pelo ácido propanóico ( $m^3h^{-1}$ ).

$K_{i2}$  = constante de inibição pelo ácido acético ( $m^3h^{-1}$ ).

$m_1$  e  $m_p$  = coeficiente específico de manutenção na formação do ácido propanóico associada ao crescimento ( $kg_{substrato}kg^{-1}h^{-1}$ ).

$m_2$  = coeficiente específico de manutenção na formação do ácido succínico associada ao crescimento ( $kg_{substrato}kg^{-1}h^{-1}$ ).

$m_3$  = coeficiente específico de manutenção na formação do ácido acético associada ao crescimento ( $kg_{substrato}kg^{-1}h^{-1}$ ).

$m_s$  = consumo específico para manutenção ( $kg_{substrato}kg^{-1}h^{-1}$ ).

NRRL = Agricultural Research Service Culture Collection.

$P_1$  = concentração de ácido propanóico ( $kgm^{-3}$ ).

$P_1^f$  = concentração final de ácido propanóico ( $kgm^{-3}$ ).

$P_2$  = concentração de ácido succínico ( $kgm^{-3}$ ).

$P_3$  = concentração de ácido propanol ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$P_4$  = concentração de ácido acético ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$P_x$  = concentração de quaisquer produto ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$r_p$  = taxa cinética de formação do produto ( $\text{kgm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

$r_s$  = taxa cinética de consumo de substrato ( $\text{kgm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

$r_{smax}$  = taxa cinética máxima de consumo de substrato ( $\text{kgm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

$(r_s)_m$  = taxa cinética de consumo do substrato utilizado como manutenção ( $\text{kgm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

$(r_s)_c$  = taxa cinética de consumo de substrato destinado somente ao crescimento ou reprodução microbiana ( $\text{kgm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

$r_x$  = taxa cinética de crescimento microbiano ( $\text{kgm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

$S$  = concentração de substrato ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$S_o$  = concentração inicial de substrato ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$T$  = temperatura do meio de fermentação ( $^{\circ}\text{C}$ ).

$S_{in}$  = concentração de substrato na alimentação ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$S_{(L)}$  = concentração de substrato com índice linear ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$S_{(Q)}$  = concentração de substrato com índice quadrático ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$T$  = temperatura do meio de fermentação ( $^{\circ}\text{C}$ ).

$V$  = volume ( $\text{m}^3$ ).

$Y_{C/S}^T$  = Rendimento teórico do componente em relação ao substrato ( $\text{kgkg}^{-1}$ ).

$Y_{C/S}^A$  = Rendimento aparente do componente em relação ao substrato ( $\text{kgkg}^{-1}$ ).

$Y_{P/S}$  = coeficiente de rendimento do produto em relação ao consumo de substrato ( $\text{kgkg}^{-1}$ ).

$Y_{P2/S}$  = coeficiente de rendimento do ácido succínico em relação ao consumo de substrato ( $\text{kgkg}^{-1}$ ).

$Y_{P3/S}$  = coeficiente de rendimento do ácido acético em relação ao consumo de substrato ( $\text{kgkg}^{-1}$ ).

$Y_{P/X}$  = coeficiente de rendimento do produto em relação ao crescimento microbiano ( $\text{kgkg}^{-1}$ ).

$Y_{X/S}$  = coeficiente de rendimento microbiano em relação ao consumo de substrato ( $\text{kgkg}^{-1}$ ).

$S$  = concentração do substrato ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$X$  = concentração celular ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$X_0$  = concentração celular inicial ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$X^f$  = concentração celular final ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$X_{(L)}$  = concentração microbiana com índice linear ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

$X_{(Q)}$  = concentração microbiana com índice quadrático ( $\text{kgm}^{-3}$ ).

### **Letras Gregas**

$u_s$  = velocidade específica de consumo de substrato ( $\text{h}^{-1}$ ).

$u_x$  = velocidade específica do crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ ).

$u_p$  = velocidade específica de formação do produto ( $\text{h}^{-1}$ ).

$\mu_{sm}$  = velocidade máxima específica de consumo de substrato ( $\text{h}^{-1}$ ).

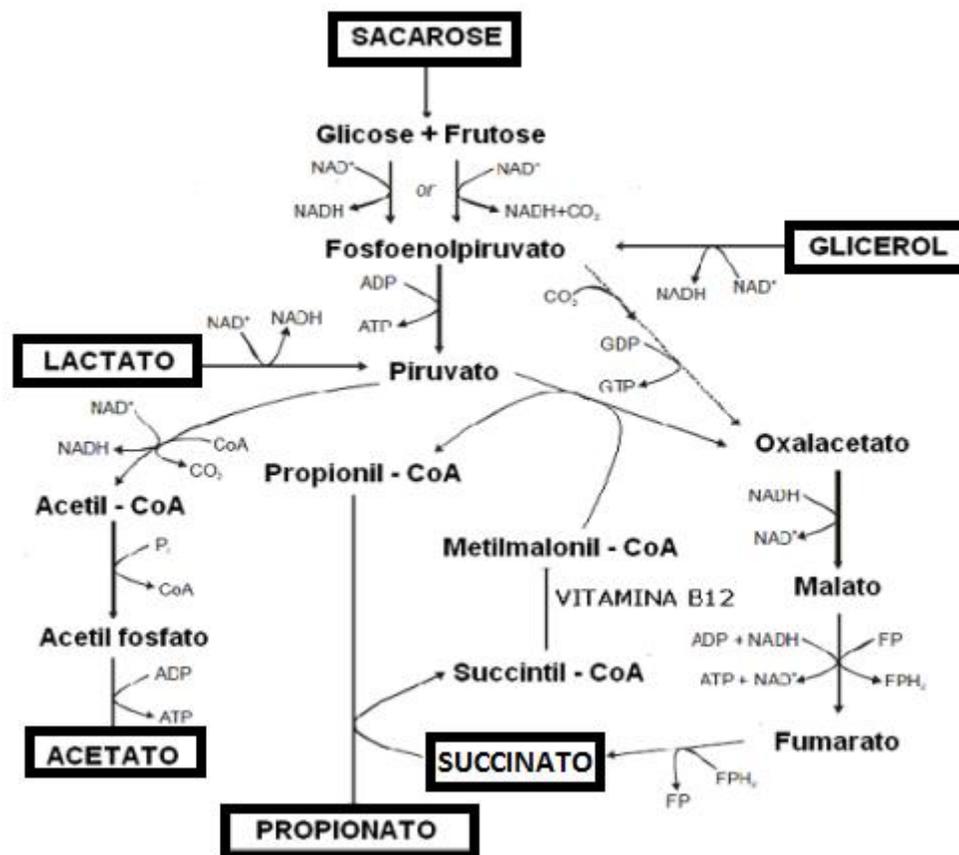
## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

O tema objeto da presente dissertação se insere dentro do desenvolvimento de processos biotecnológicos. Estes processos vêm crescendo, subitamente, em virtude do crescimento demográfico, bem como das necessidades humanas, aumentando a demanda por combustíveis e produtos químicos a partir de fontes renováveis, tendendo a serem sustentáveis. Neste âmbito, surgem opções para esta linha de pesquisa.

A utilização de processos biotecnológicos na substituição de processos petroquímicos tornou-se uma alternativa inovadora de projeto, e um dos grandes desafios é a descoberta de processos e rotas que possibilitem fazer uso de matérias-primas relativamente baratas em contraposição com o crescente custo do petróleo, para o desenvolvimento de processos viáveis.

Nessa seara, a busca de uma solução para a crescente demanda do glicerol, e na redução de problemas futuros, surge, como uma alternativa promissora, os processos fermentativos para a conversão do glicerol em produtos de alto valor agregado. Nessa vertente, está a produção do ácido propanóico obtido, atualmente, em grande parcela, a partir da síntese química, tendo como matéria-prima o petróleo.

Para a produção do ácido propanóico, por via fermentativa, diferentes substratos podem participar desse processo, tais como: glicose, sacarose, lactose e lactato, além do glicerol. A rota do processo dependerá da combinação substrato e do microrganismo que será utilizado. A rota fermentativa para produção do ácido propanóico proveniente das diversas fontes de carbono pode ser representada pela Figura 1.1.



**Figura 1.1** – Rota do ácido propanóico e produtos de fermentação (Modificado de Suwannakham, 2005).

O grande desafio para tornar o processo do ácido propanóico competitivo em potencial consiste em propor soluções que tratem da limitação da conversão provocada pela considerável inibição da reação pelo produto principal, resultando em uma baixa concentração final de ácido propanóico. O fato da concentração do produto desejado ser baixa leva a custos mais altos na etapa de purificação. Desta forma, a necessidade de compreender o processo e determinar as condições ótimas de operação, que possam contribuir para um aumento da conversão, é imprescindível para o desenvolvimento de um processo eficiente e competitivo.

A motivação desse trabalho se baseia na idéia de desenvolver um processo viável e alternativo utilizando como substrato uma fonte verde, o glicerol, na obtenção do ácido propanóico via processo fermentativo.

Muitos trabalhos nesta área vêm sendo apresentados, no entanto o grande desafio consiste em desenvolver processos auxiliado por intermédio de modelos matemáticos e cinéticos, bem como otimizá-los de forma a se tornarem economicamente viáveis e eficientemente competitivos comparado com os processos convencionais.

Desse modo, o presente trabalho tem como foco principal estudar o processos de batelada mediante a elaboração de modelos capazes de representar adequadamente o processo e, por intermédio do estudo das variáveis de processo, otimizar as condições de operação.

### **1.1 - Objetivos**

O objetivo principal desse trabalho reside no desenvolvimento de modelos matemáticos para o estudo do comportamento do processo de fermentação do glicerol com a finalidade de produzir ácido propanóico. Para tanto, serão investigados os efeitos da concentração de substrato, meio de cultura, pH e temperatura visando investigar o efeito destas variáveis e determinar as condições mais adequadas de processo para um aumento da conversão. Dados experimentais foram obtidos para o desenvolvimento do modelo e através de simulação do processo o comportamento do processo foi investigado.

Para atingir os objetivos gerais deste Projeto, as seguintes etapas, ou objetivos específicos foram realizados:

- Ensaios experimentais para determinar a influência das variáveis do processo para intervalos de pH e temperatura e avaliá-los mediante a simulação do processo obedecendo os seguintes critérios:
  - Estudar a influência do pH no rendimento do ácido propanóico através da utilização de experimentos para o processo em batelada com o glicerol, como substrato, utilizados no biorreator.
  - Estudar a influência da temperatura para o processo em batelada com o glicerol, como substrato, alterando-se a temperatura do biorreator através de variações de 1 °C no intervalo de 30 a 36 °C.

- Otimizar os parâmetros cinéticos do processo utilizando o Algoritmo Genético para ambos os estudos;
- Determinar a concentração de substrato e biomassa ótima através do planejamento de experimentos utilizando a simulação do processo. O modelo matemático do biorreator foi resolvido por Runge-Kutta, com os parâmetros otimizados por algoritmo genético:
  - Otimizar os parâmetros operacionais com os dados cinéticos experimentais da literatura;

## **1.2 - Organização da dissertação**

O capítulo I, “Introdução, objetivos e organização da dissertação” tem como composição os subitens: introdução, objetivos da dissertação e a organização do trabalho de dissertação. Na introdução foram retratadas as rotas de produção do ácido propanóico através das rotas existentes, matérias-primas utilizadas, destacadas a importância do estudo deste processo e as contribuições pretendidas; no subitem, objetivos, estão apresentados os objetivos gerais e específicos que conduziram o trabalho; e no subitem, organização da dissertação são apresentadas as divisões do trabalho.

O capítulo II, “Revisão da literatura”, apresenta os processos atuais de produção do ácido propanóico; as rotas e o metabolismo microbológico para as matérias-primas mais estudadas, dando ênfase ao substrato estudado, o glicerol; a influência do meio de cultura, pH e temperatura na produção do ácido propanóico; perspectiva de mercado, apresentando os países e os maiores produtores do ácido propanóico, bem como, projeção de futuro e necessidade de aumento da oferta; modelagem matemática da fermentação propiônica através dos balanços para processos em batelada, batelada alimentada e contínuo apresentando diversos modelos existentes; métodos matemáticos determinísticos e heurísticos; e a técnica de planejamentos de experimentos.

O capítulo 3, “Materiais e Métodos”, retrata a metodologia desenvolvida no trabalho, detalhando os materiais utilizados, os procedimentos para o desenvolvimento dos ensaios experimentais, e a metodologia matemática desenvolvida.

O capítulo 4, “Resultados e Discussões”, apresenta os resultados dos ensaios experimentais, no ajuste dos parâmetros cinéticos em função do pH e da temperatura; simulação dos ensaios através dos parâmetros otimizados; influência dos parâmetros cinéticos na produtividade, rendimento e tempo de fermentação; otimização dos parâmetros cinéticos por algoritmo genético, e otimização da biomassa e concentração do substrato por planejamento de experimentos na produtividade do ácido propanóico para dados cinéticos da literatura e com o ensaio da temperatura que obteve o maior rendimento.

O capítulo 5, “Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros”, apresenta uma compilação das conclusões do trabalho em questão, bem como são apresentadas as sugestões para trabalhos futuros com o objetivo de contribuir com o avanço deste segmento através de um trabalho mais detalhado nesta área.

O capítulo 6, “Referências Bibliográficas”, cita os trabalhos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa.

Algumas etapas de apoio, necessárias, para o desenvolvimento do trabalho são apresentadas na forma de Anexos.

## CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

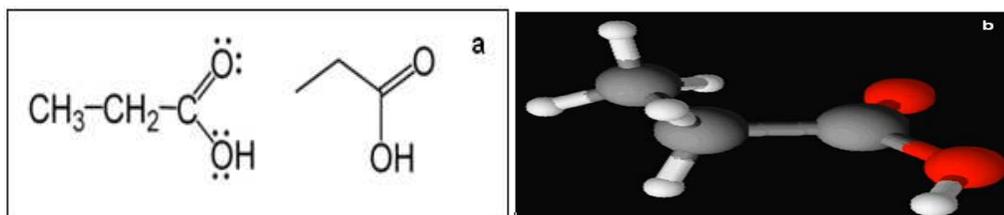
Neste capítulo será realizada uma apresentação da literatura com o intuito de retratar os temas, base do estudo, para o entendimento do presente trabalho, tais como a justificativa de utilização do substrato; as possíveis rotas do processo fermentativo; aplicação e custo do substrato e do ácido propanóico; modelagem matemática do processo. São ainda apresentados os métodos usados para simulação e otimização usados neste trabalho.

### 2.1 - Produção do ácido propanóico

#### 2.1.1 - Ácido Propanóico

O ácido propanóico foi descrito, primeiramente, em 1844, por Johann Gottlieb, que o encontrou entre os produtos da degradação do açúcar. Nos anos seguintes, outros químicos produziram o ácido propanóico obtidos de maneiras diferentes, porém nenhum deles percebeu que produziam a mesma substância. Em 1847, o químico Jean Baptiste Dumas estabeleceu que todos os ácidos até então produzidos eram o mesmo composto, e os denominou de ácido propanóico, no qual a partir das palavras gregas *pro* que significa primeiro e *pion* que significa graxo (gordura), exibiu as propriedades semelhantes aos demais ácidos graxos (Himmi, 2000; Goswani e Srisvastava, 2000; Quesada-Chanto, *et al.*, 1998).

O ácido propanóico consiste em um ácido carboxílico saturado de corrente aberta, de modo que em seu estado puro é um líquido incolor, corrosivo e possui um odor desagradável (Kumar e Babu, 2006; Playne, 1985; Coral, 2008). A Figura 2.1 mostra a fórmula estrutural do ácido propanóico em diferentes planos.



**Figura 2.1** – Fórmula estrutural do ácido propanóico (a-fórmula do ácido propanóico no plano; b-fórmula do ácido propanóico em 3D).

O ácido propanóico caracteriza-se por ser um líquido que traz consigo as propriedades físicas intermediárias entre aquelas dos ácidos carboxílicos de cadeias menores (como os ácidos fórmicos e acéticos) e os ácidos carboxílicos maiores. Outra característica consiste em ser miscível em água, todavia poderá ser removido dela com a adição de sal (Playne, 1985).

**Tabela 2.1** – Propriedades físico-químicas do ácido propanóico.

<b>Propriedades físicas e químicas</b>	
<b>Nome pela IUPAC</b>	Ácido propanóico
<b>Sinônimos</b>	Ácido propiônico e ácido etanocarboxílico
<b>Fórmula molecular</b>	$C_3H_6O_2$
<b>Peso molecular</b>	74,079 g/mol
<b>Registro CAS</b>	79-09-4
<b>Aparência</b>	Líquido incolor
<b>Solubilidade em água, Pa à 20 °C</b>	Miscível
<b>Viscosidade</b>	10 mPa.s
<b>Densidade relativa (água = 1)</b>	0,992 g/cm <sup>3</sup>
<b>Acidez (pKa)</b>	4,88
<b>Ka (constante ácida de dissociação)</b>	$1,34 \times 10^{-5}$
<b>Ponto de fusão</b>	-21 °C
<b>Ponto de ebulição</b>	141 °C
<b>Ponto de inflamação</b>	54 °C
<b>Temperatura de auto-ignição</b>	485 °C
<b>Densidade relativa (água = 1)</b>	0,992 g/cm <sup>3</sup>

**Fontes:** Fiorucci, 2002; International chemical safety cards: propionic acid, 1997.

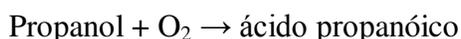
### *2.1.2 Síntese da produção do ácido propanóico*

O ácido propanóico é produzido atualmente pela oxidação da fase líquida do propano ou propionaldeído (Paik, 1994; Playne, 1985). A síntese biológica tem como objetivo possibilitar um processo economicamente competitivo quando comparada com a síntese química, inclusive fazendo uso de matérias prima renováveis e de preferência que sejam subprodutos, como é o caso do glicerol.

### 2.1.2.1 Síntese Química

O ácido propanóico pode ser obtido pelas seguintes rotas químicas (Coral, 2008).

- Oxidação de propanol: Na presença de cobalto ou manganês, esta reação ocorre rapidamente em temperaturas de 40 a 50 ° C (Bertlef *et al.*, 2003; Ozadali, 1996; Playne, 1985), com a seguinte reação:



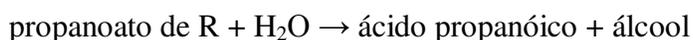
- Oxidação de propanal

A seguinte reação representa esta rota:



- Hidrólise de ésteres

A hidrólise dos ésteres pode ser representada da seguinte forma:



- Síntese ou processo oxo

O processo oxo faz uso do etileno e do gás de síntese, de acordo com as seguintes reações:



### 2.1.2.2 Síntese biológica

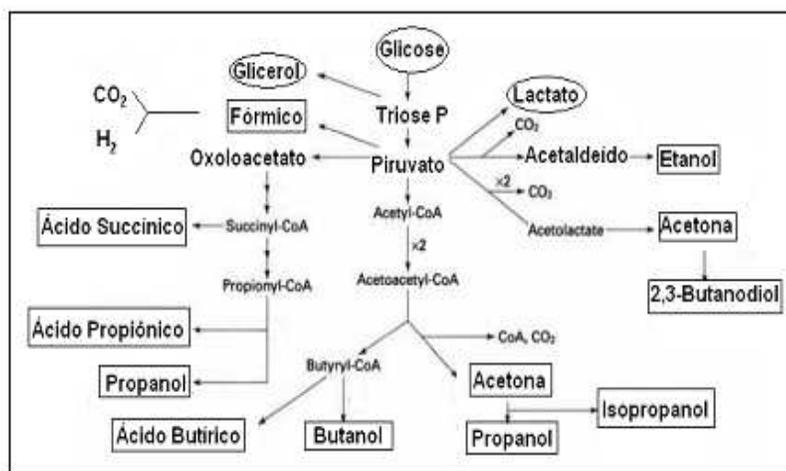
Na rota biológica são as bactérias anaeróbicas que produzem, como produto principal, o ácido propanóico (Boyaval, 1994 *apud* Coral, 2005; Seshadri, 1993 *apud* Coral, 2005; Playne, 1985).

A *propionibacterium acidipropionici* foi a espécie mais utilizada para a evolução da produção de ácido propanóico industrial (Martinez-Campos, 2002 *apud* Coral, 2005; Woskow, 1991 *apud* Coral, 2005). O propionato é produzido principalmente, por via do ácido dicarboxílico, mas algumas espécies produzem propionato de lactato a partir deste por meio do lactato pela via do ácido acrílico (Playne, 1985).

### 2.1.3 - Metabolismo microbiológico

A fermentação consiste em um termo geral que denota a degradação anaeróbica de nutrientes orgânicos para obter energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), produzindo diversos produtos provenientes do processo.

No processo fermentativo, o substrato, o microorganismo e as enzimas ativas do processo determinam o tipo de fermentação. Dessa forma, as diversas rotas para obtenção de ácido propanóico por processo fermentativo estão apresentadas na Figura 2.2.



Fonte: Ratledge e Kristiansen, 2001.

**Figura 2.2** – Rota dos produtos obtidos por processos microbiológicos

Durante um processo fermentativo, ocorre o processo de glicólise, onde estes nutrientes são degradados para a formação do piruvato. Vale ressaltar que o propionato nunca é o único produto da reação; sua síntese é seguida geralmente da formação do acetato e o dióxido de carbono, que ocorre pela relação estequiométrica (Playne, 1985).

A fermentação da glicose ou do lactato, como fontes de carbono, produz o dióxido de carbono, propionato e acetato. Tipicamente, 3 mols do lactato conduzem à produção de um 2:1:1, relação molar do ácido propanóico, do ácido acético, e do dióxido de carbono (Teo e Tan, 2003).

Na fermentação do ácido propanóico, as bactérias anaeróbicas o produzem como produto principal, e como subprodutos o acetato (principal subproduto), o ácido succínico, o ácido pirúvico e o dióxido de carbono (Lewis e Yang, 1992; Coral, 2008). A dependência das condições da fermentação, e a relação entre o propionato e acetato podem variar de 2,1 e de 14,7, quando a glicose é usada como a fonte de carbono (Suwannakham, 2005).

O metabolismo da glicose pela propionibacteria teoricamente são 2 mols de propionato, 1 mol de acetato e 1,5 de dióxido de carbono provindos de 1,5 mols de glicose (Woskow e Glatz, 1991 *apud* Coral, 2008).

Utilizando o glicerol como substrato, ocorre a produção do ácido propanóico, como produto principal, e seus subprodutos, quais sejam: o ácido acético, ácido succínico, ácido fórmico e propanol, tendo como principal subproduto, o ácido succínico.

Em comparação com a glicose e outros carboidratos, o glicerol possui um estado muito menor de redução favorecendo, dessa forma, a produção de metabólitos mais reduzidos, mas também pode provocar desequilíbrio no metabolismo e, portanto, a inibição do crescimento celular (Zhang e Yang, 2009).

#### 2.1.4 – Fontes de carbono e microrganismos utilizados na fermentação propiônica

Os grupos de bactérias utilizados na produção do ácido propanóico pertencem aos gêneros *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Cloristridium*, *fusobactéria*. (Playne, 1985). Segue abaixo os gêneros mais estudados:

- *Cloristridium propionici* (Johns, 1952; Leaver, *et al.* 1955);
- *Propionibacterium arabinosum* ATCC 4965 (coral, 2008; Leaver, *et al.* 1955); 34W (Wood *et al.*, 1936);

- *Propionibacterium jensenii* ATCC 4868 (Coral, 2008); DSM 20535, 20274, 20278, 20279 (Quesada-Chanto, 1994);
- *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 25562 (Coral, 2008; Himmi *et al.*, 2000); ATCC 4875 (Goswani e Srisvastava, 2000; Ramsay *et al.*, 1998); LPB 47 (Coral *et al.*, 2009); DSM 4900, DSM 20272, DSM 20273, NRRL B3569 (Quesada-Chanto, 1994); P9 (Woskow e Glatz, 1991);
- *Propionibacterium pentosaceum* ATCC 4875 (Coral, 2008); 49W (Wood, 1936; Wood e Werkman, 1938);
- *Propionibacterium thoenii* ATCC 4874 (Coral, 2008); P20 (Gu *et al.*, 1998), (DSM 20276, 20277) (Quesada-Chanto, 1994);
- *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* ATCC 9614 (Coral, 2008; Himmi, *et al.*, 2000);
- *Propionibacterium zeae* CCT 5329 (Coral, 2008);
- *Propionibacterium freudenreichii shermanii* ATCC13673 (Coral, 2008);

Os microrganismos mais estudados são as propionibactérias e em geral, caracterizam-se da seguinte forma: são gram-positivas; não há formação de esporos; em sua maior parte possui crescimento lento; e são capazes de utilizar uma ampla gama de fontes de carbono. (Gu, 1998; Lewis, 1992).

A propionibactéria sintetiza uma grande escala de fontes de carbono. Neste espaço, tem-se a utilização dos sistemas de imobilização (Huang *et al.*, 2002; Paik e Glatz, 1994), fontes de carbono, tais como: a glicose (Suwannakham, 2005; Himmi e outros, 2000), a lactose (Goswani e Srivastava, 2000; Hsu e Yang, 1991), a maltose (Babuchowski *et al.*, 1993), o melão de cana-de-açúcar (Coral, 2008), o glicerol (Zhang e Yang, 2009; Coral *et al.*, 2008; Rivaldi *et al.*, 2008), a hemicelulose (Ramsay *et al.*, 1998) e a farinha do milho (Huang *et al.*,

2002). As grandes pesquisas giram em torno de lactato do sódio, melão da cana-de-açúcar (fonte renovável) e o glicerol (subproduto da indústria do biodiesel).

A Tabela 2.2 apresenta uma revisão da literatura da produtividade do ácido propanóico para diversos substratos, microrganismos e condições de processo.

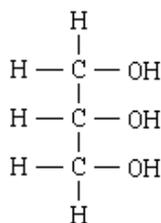
**Tabela 2.2** - Descrição da produção do ácido propanóico da literatura.

<b>Autores (ano)</b>	<b>Substrato (So)</b>	<b>Processo Fermentativo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Condições</b>	<b>Produtividade do ácido propanóico</b>
Goswani (2000)	Lactose (47,7 g/L)	Batelada	<i>P.acidipropionici</i> (ATCC 4875)	T=30°C;pH=6,5	0,23 g/(L.h)
	Lactose (47,7 g/L)	Batelada/ Batelada alimentada	<i>P.acidipropionici</i> (ATCC 4875)	T=30°C;pH=6,5	0,31 g/(L.h)
Barbirato (1997)	Glicerol (20 g/L)	Batelada	<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=6,8	0,36 g/(L.h)
	Ácido lático (20 g/L)	Batelada	<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=6,8	0,35 g/(L.h)
	Glicose (20 g/L)	Batelada	<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=6,8	0,28 g/(L.h)
Himmi et al. (2000)	Glicose (20 g/L)	Batelada	<i>P.acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=7,0	0,24 g/(L.h)
	Glicose (20 g/L)	Batelada	<i>P.freudenreichii</i> <i>ssp. Shermanii</i> (ATCC 9614)	T=30°C;pH=7,0	0,07 g/(L.h)
	Glicerol (20 g/L)	Batelada	<i>P.acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=7,0	0,42 g/(L.h)
	Glicerol (20 g/L)	Batelada	<i>P.freudenreichii</i> <i>ssp. Shermanii</i> (ATCC 9614)	T=30°C;pH=7,0	0,18 g/(L.h)

Analisando-se os resultados apresentados, nota-se que a utilização do glicerol como substrato leva a uma maior produtividade, em comparação com os substratos tradicionais, glicose e lactose, o que corrobora em os objetivos desta pesquisa.

#### 2.1.4.1 – Glicerol

O glicerol, ou glicerina, é um tri-álcool, e designado como propane-1,2,3-triol, conforme a nomenclatura IUPAC (*International Union for Pure and Applied Chemistry*). Segundo Mota *et al.* (2009), a expressão glicerol refere-se ao componente químico propane-1,2,3-triol e o termo glicerina aos produtos químicos purificados do qual possuem no mínimo 95% de glicerol em sua composição. Sua fórmula estrutural está apresentada na Figura 2.3.



**Figura 2.3** - Fórmula estrutural do glicerol.

Em sua forma pura e em condições normais de pressão e temperatura, suas propriedades organolépticas são: líquido viscoso, incolor, inodoro, não tóxico e higroscópico; com sabor doce; solúvel em água e álcool; e insolúvel em éter e em clorofórmio (Rivaldi, 2008; Routh *et al.*, 1971) As propriedades físico-químicas do glicerol estão listadas na Tabela 2.1 (Lide, 2006; Morrison, 1994; Perry, 1997)

**Tabela 2.3** – Propriedades físico-químicas do glicerol.

Propriedades do glicerol a 20 °C	
Fórmula química	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Massa molecular	92,09 g.mol <sup>-1</sup>
Densidade	1,261 g.cm <sup>-3</sup>
Viscosidade	1,5 Pa.s
Tensão superficial	63,4 mN/m
Condutividade térmica	0,28 W/(m.K)
Ponto de fulgor	160 °C
Ponto de fusão	17,9 °C
Ponto de ebulição (101,3 KPa)	290 °C

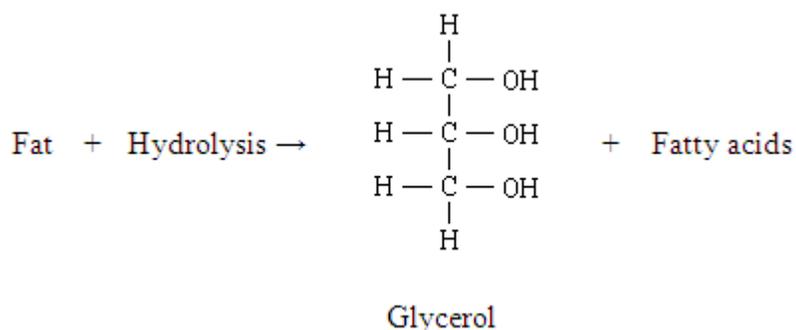
**Fonte:** Lide, 2006; Morrison, 1994 e Perry, 1997.

O glicerol foi descoberto por Carl W. Scheele, em 1779, durante o processo de saponificação do azeite de Oliva. Do mesmo modo, Pasteur, em 1858, também observou sua

formação como um subproduto da fermentação alcoólica (Tosetto *et al.*, 2003 *apud* Arruda, 2008).

Na lavagem com água, obtém-se uma solução adocicada, que dá, com a evaporação da água, um líquido pesado e viscoso; seu descobridor denominou-o: “o princípio doce das gorduras”. Em 1846, o químico italiano Ascanio Sobrero produziu pela primeira vez a nitroglicerina e, em 1867, Alfred Nobel absorveu-a em diatomita, tornando seguro o seu manuseio como dinamite.

Estas descobertas provocaram aumento na demanda da glicerina. A demanda era, em parte, satisfeita pelo desenvolvimento de um método, em 1870, de recuperação da glicerina e do sal das lixívia do sabão. Desde 1948, aproximadamente, o glicerol é produzido sinteticamente a partir de matérias-primas petroquímica. Segundo Routh *et al.* (1971), o glicerol pode ser obtido pela hidrólise da gordura, conforme mostrado na Figura 2.4.



**Figura 2.4** – Reação de produção de glicerol.

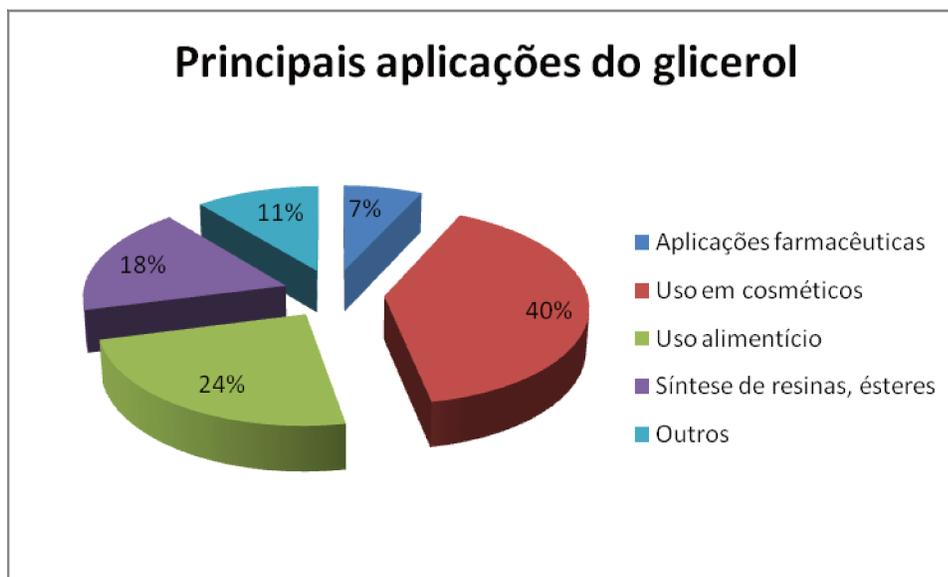
Na natureza, o glicerol existe em vegetais, em animais, em formas combinadas de glicerina e ácidos graxos, como subproduto da reação de produção de biodiesel, e também pode ser obtido por processo fermentativo mediante os métodos de sulfito ou o método de carbonato (Wang *et al.*, 2001 *apud* Arruda, 2008).

Pela fonte microbiana, segundo Mendham *et al.* (2002), no processo o glicerol é fosforilado por adenosina-5'-trifosfato (ATP) formando o L-glicerol-3-fosfato e a adenosina-5'-difosfato (ADP) por meio da ação catalítica da gliceroquinase. Desta, o ADP é convertido por

fosfoenolpiruvato (PEP) com a utilização da enzima piruvato-quinase (PK) obtendo como produtos o piruvato e o ATP.

Há uma vasta aplicabilidade para o glicerol, principalmente em razão de algumas propriedades físico-químicas, como a ausência de cor, odor e por não ser tóxico. Desta forma, este composto pode ser utilizado para fins de fármacos, alimentícios e cosméticos, por exemplo. Segundo NAE (2005), as percentagens de seus fins estão arroladas abaixo e sintetizados na Figura 2.5.

- Indústria farmacêutica: composição de cremes dentários e remédios (Arruda, 2007, Fairbanks, 2009; Rivaldi, 2008);
- Aplicações terapêuticas: agente da hidratação (Arruda, 2007);
- Indústria alimentícia: umectante, surfactante, emulsificante, estabilizante e substância anti-ferrugem, alimentação animal (Arruda, 2007, Fairbanks, 2009);
- Indústria química: papel, tintas, plástico, aditivo, detergente, adesivo, herbicida, tabaco e explosivos (Arruda, 2007, Barbirato, 1997);
- Aplicações em cosméticos (Fairbanks, 2009; Rivaldi, 2008).



**Figura 2.5** - Principais aplicações do glicerol.

### 2.1.5 – Efeito do meio de cultura na fermentação propiônica

O meio de cultura, ou seja, a composição do meio, segundo Shuler e Kargi, (1992), deve ser diferente o suficiente da composição de uma célula, pois é por intermédio do gasto de energia que serão mantidos longe do equilíbrio termodinâmico. Desta forma, a seletividade dos compostos desejáveis do ambiente extracelular para seu interior deve ser garantida, por meio da membrana semipermeável.

Levando isso em consideração, as condições ambientais tais como nutrientes, hormônios de crescimento, e os íons conduzem os resultados na formação da maioria dos produtos por organismos. Entretanto, os requisitos qualitativos e quantitativos nutricional de células precisam ser determinadas para otimizar o crescimento e formação do produto (Shuler e Kargi, 1992). Assim, esses nutrientes podem ser classificados em macronutrientes que são aqueles necessários em concentrações acima de  $10^{-4}$  M, carbono, nitrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo,  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$ ; e, em micronutrientes que são necessários em quantidades menores que  $10^{-4}$  M, os quais são traços de  $Mo^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ , vitaminas, hormônios de crescimento (Shuler e Kargi, 1992).

### 2.1.6 – Efeito do pH na fermentação propiônica

A taxa de crescimento é dependente do pH e a faixa de pH no crescimento microbiológico para muitas bactérias ocorre no pH de 6,0 à 7,0 (Blanch e Clark, 1007; Hsu, 1991; Ramsay *et al.*, 1998; Teo e Tan, 2003; Wang *et al.*, 2006; Quesada-Chanto, 1994; Goswami e Srivastava, 2000; Suwannakham, 2005; Molina, 2002; Zhang e Yang, 2009). Se o valor do pH está abaixo de 4,5, não há praticamente nenhum crescimento e possui uma baixa formação do ácido orgânico (Hsu, 1991; Playne, 1985).

Por outro lado, a fermentação do ácido propanóico é inibida pelo pH (potencial hidrogeniônico) do meio e, portanto, do produto de maior concentração na fermentação, o ácido propanóico. Assim, a conversão do ácido propanóico é próprio agente limitante, levando o processo a ter baixas taxa de produção e concentração. (Kun, 2003; Kumar e Babu, 2006).

Saliente-se que a fermentação extrativa é uma alternativa para evitar a inibição do produto (Solichien, 1995).

Um dos efeitos do pH na fermentação propiônica é a inibição de fungos, leveduras e algumas bactérias no processo. Este caso, deve-se ao fato do ácido propanóico perturbar o gradiente de pH, em virtude dos nutrientes que transporta, e metabolitos, por intermédio da membrana celular. Em razão do caráter hidrofóbico, o ácido não dissociado pode difundir por meio da membrana bacteriana no citoplasma e, em seguida dissociar-se em um ânion de prótons e propionato no interior da célula. Assim, o acúmulo interno de prótons é criado. Com o escopo de manter o gradiente de prótons mediante a membrana funcional, ATP extra deve ser consumido por H<sup>+</sup>-ATPase para propiciar a saída de prótons, diminuindo o ATP disponível para o metabolismo celular, causando dessa forma a inibição (Gu, 1998; Hettinga, 1972a).

#### 2.1.7 – Efeito da temperatura na fermentação propiônica

Segundo Blanch e Clark (1997), a taxa de crescimento específico, além de ser dependente do pH, também é dependente da temperatura, e o valor da temperatura de crescimento ótimo é utilizado para classificar os microrganismos. Ainda segundo o mesmo autor, a Tabela 2.4 apresenta a classificação típica para os microrganismos em relação a sua temperatura de crescimento.

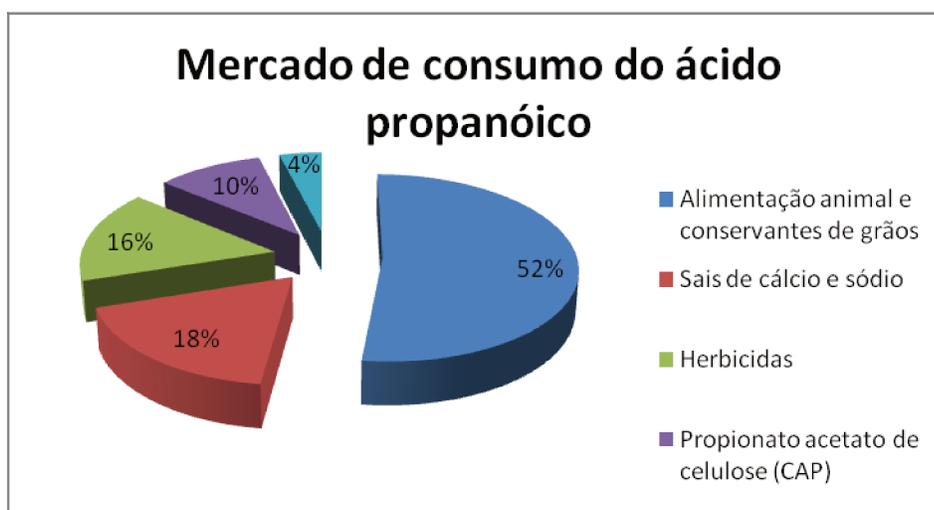
**Tabela 2.4** – Classificação das faixas de temperaturas dos microrganismos.

Classificação	Temperatura de crescimento (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Psicrófilo	-5 à 5	15 à 18	19 à 22
Mesófilo	10 à 15	30 à 45	35 à 45
Termófilo	25	45 à 75	60 à 80
Termófilo extremo	50	60 à 75	75 à 95
Hipertermófilo	-----	-----	≥100

A escala ótima de temperatura para a propionibacteria encontra-se no intervalo de 30 a 37°C (Ramsay et al., 1998; Quesada-Chanto, 1994; Goswani e Srivastava, 2000; Suwannakham, 2005; Molina, 2002; Zang e Yang, 2009).

#### 2.1.8 – Aplicações e mercado do ácido propanóico

Atualmente, o mercado de ácido propanóico é fornecido principalmente pela produção mediante as rotas petroquímicas. Segundo Bertleff et al (2003), Boyaval (2005), Kirschner (2009) e Kumar e Babu, (2006) o ácido propanóico e seus sais são usadas dentro de numerosos processos conforme apresentado a seguir e ilustrado na Figura 2.6.



**Figura 2.6** - Mercado de consumo do ácido propanóico em 2008.

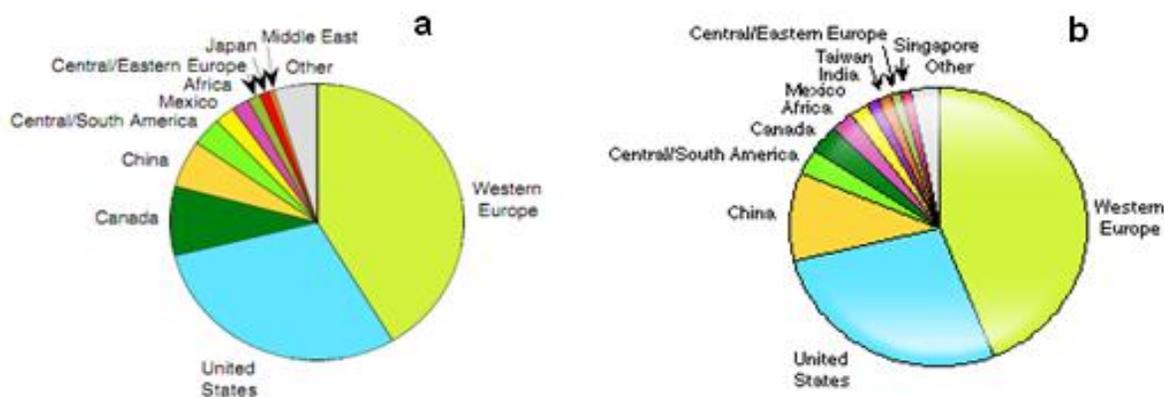
- Fabricação de herbicidas;
- Produção de plástico de celulose (usados nas substâncias têxteis, filtros, membranas de osmose reversa, vernizes e plásticos para moldagem);
- Indústria farmacêutica;
- Indústria alimentícia humana com os sais de sódio e cálcio, e animal com a ração animal;
- Conservantes com os pães, bolos, queijos, carnes, frutas, legumes.

A demanda de ácido propanóico é altamente direcionada e dependente da produção de ração animal e conservantes de grãos correspondendo mais de 50% do consumo total do ácido seguido por alimentos embalados e produtos de panificação.

Os subprodutos agrícolas, que correspondem cerca de 16% do mercado de consumo são capazes de produzir produtos de valor agregado e ajudá-los na redução da poluição ambiental (Mc Donald, 1991). A demanda de crescimento deste ácido extrai a atenção para a tecnologia eficiente de energia mais econômica (Kumar e Babu, 2006; Bertleff et al, 2003).

No setor mundial, os alimentos de animais e para preservação de grãos é responsável pela maior consumo na Europa, América do Norte, Austrália e Oriente Médio; propionatos cálcio e sódio representam maior consumo na África e na América Central e do Sul.

A Figura 2.7 mostra o panorama do mercado mundial de consumo do ácido propanóico no mundo



**Figura 2.7** – Consumo de ácido propanóico no mundo. a – consumo em 2006, b-consumo em 2009 (Smit, 2007; Bizzari e Blagoev, 2007, 2010).

Durante 2006 e 2009, a Europa representou em torno de 43% do consumo mundial de ácido propanóico, seguida pela América do Norte e Ásia, com 40% e 10%, respectivamente. No decorrer destes anos, houve uma queda no consumo do ácido propanóico no Canadá e um aumento de aproximadamente 50% na China.

Os maiores produtores de ácido propanóico do mundo são: BASF (Alemanha), BASF (China), Chemische Werke Huls (Alemanha) e nos Estados Unidos pelas empresas apresentadas na Tabela 2.5 (pesquisa realizada em 2008).

**Tabela 2.5**– Capacidade de produção do ácido propanóico.

<b>Companhia</b>	<b>Localização</b>	<b>Capacidade (ton/ano)</b>
Dow Chemical	Texas City, Texas	270000
Eastman Chemical	Kingsport, Tennessee	110000
Eastman Chemical	Longview, Texas	45000

**Fonte:** Kirschner, 2009.

A Figura 2.8 apresenta o comportamento do mercado durante os últimos 7 anos e uma projeção para 2012 da demanda do ácido propanóico nos Estados Unidos da América segundo Kirschner (2009).



**Fontes:** <http://www.icis.com/Articles/2006/02/28/2012636/chemical-profile-propionic-acid.html> e Kirschner, 2009.

**Figura 2.8** – Dados históricos do ácido propanóico (E.U.A).

Considerando os dados de 2008, a demanda destinada à alimentação animal e para conservantes corresponde a 56,608 milhões de toneladas, sendo, a fermentação pela propionibacteria uma rota em potencial para suprir a demanda do mercado.

Durante 1997 e 2002, o mercado cresceu em 1,2 por cento ao ano, e entre 2003 e 2008, que a projeção era estimada de 1,8 por cento ao ano, e o crescimento foi de 2,9 por cento ao ano.

## **2.2 Modelagem matemática**

Os modelos matemáticos de processos fermentativos possuem duas vertentes: de um lado, têm-se os modelos fenomenológicos, que são baseados nas relações matemáticas entre as variáveis, nos quais são utilizadas equações de balanço de massa balanço de energia, quantidade de movimento, equações de velocidade ou cinéticas (que são específicas para os processos fermentativos) e as equações termodinâmicas; por outro vértice, tem-se os modelos de entrada-saída onde relações empíricas são utilizadas para correlacionar o efeito e variações das variáveis manipuladas, entrada do processo, variáveis medidas, e saída do processo (Bonomi e Schmidell, 2001). A redes neurais, talvez sejam atualmente, os modelos do tipo entrada-saída mais populares pela sua relativa simplicidade de utilização e principalmente pela sua capacidade de tratar com ruídos e dados não lineares. Meleiro (2002) mostra as suas diversas formas e possíveis aplicações, inclusive em bioprocessos.

Segundo Shuler e Kargi (1992), deve-se escolher o modelo mais simples e que descreva o sistema, no caso, se a resposta das células é rápida comparada com as mudanças externas e se as modificações não forem muito grandes, o uso de modelos não-estruturados é adequado.

Desse modo, o estudo será baseado em modelos não estruturados e serão discutidos os principais fenômenos de inibição por substrato, por produto e por componentes tóxicos.

### 2.2.1 Modelos cinéticos não estruturados

Em geral, o crescimento inibitório dá-se em virtude da presença de altas concentrações de substâncias inibitórias, nos quais podem estar inseridos substrato e produto (Shuler e Kargi, 1992).

#### a) Modelos com crescimento por substrato limitante

Equação de Monod (Shuler e Kargi, 1992; Borzani, 2001).

É a cinética aplicada para o sistema celular e é descrita pela equação 2.1.

$$\mu_x = \frac{\mu_m \cdot S}{k_s + S}$$

(equação 2.1)

Neste caso,  $\mu_m$  é a taxa de crescimento máximo quando  $S \gg k_s$  e  $k_s$  é a constante de saturação e é igual a taxa de substrato limitante, quando a taxa específica de crescimento é igual a metade do seu máximo (Shuler e Kargi, 1992).

Equação de Tessier (Shuler e Kargi, 1992):

A equação de Tessier é representada por duas constantes,  $\mu_m$  e  $K$ , possuindo um termo exponencial.

$$\mu_x = \mu_m (1 - e^{-kS})$$

(equação 2.2)

Equação de Moser (Shuler e Kargi, 1992; Borzani, 2001).

A equação de Moser é equivalente a equação de Monod quando  $n=1$ , e pode ser representada pela equação 2.3.

$$\mu_X = \frac{\mu_m \cdot S^m}{k_S + S^m} = (1 + k_S \cdot S^{-n})^{-1} \quad (\text{equação 2.3})$$

Equação de Contois (Shuler e Kargi, 1992; Borzani, 2001):

A equação de Contois é bem similar a equação de Monod, porém com o termo X, um termo de correção, na qual descreve o crescimento de substrato limitante em altas densidades celulares e pode ser representada pela equação 2.4 (Shuler e Kargi, 1992).

$$\mu_X = \frac{\mu_m \cdot S}{k_{SX} \cdot X + S} \quad (\text{equação 2.4})$$

b) Modelos com crescimento inibitório (Shuler e Kargi, 1992; Borzani, 2001):

Se para um processo com uma única reação, a enzima-substrato é limitante no crescimento microbiano, a inibição da atividade da enzima resulta na inibição do crescimento microbiano (Shuler e Kargi, 1992).

#### Inibição por substrato

- Inibição sem competição de substrato:

Como exemplo deste tipo de inibição tem-se a equação 2.5.

$$\mu_X = \frac{\mu_m}{\left(1 + \frac{k_S}{S}\right) \left(1 + \frac{S}{k_I}\right)} \quad (\text{equação 2.5})$$

Se  $k_I \gg k_S$ , temos a equação 2.6:

$$\mu_X = \frac{\mu_m \cdot S}{k_S + S + \frac{S^2}{k_I}} \quad (\text{equação 2.6})$$

- Inibição por competição de substrato:

$$\mu_X = \frac{\mu_m \cdot S}{k_S \left(1 + \frac{S}{k_I}\right) + S}$$

(equação 2.7)

### Inibição por produto

- Inibição por competição de produto:

$$\mu_X = \mu^{max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(\frac{K_{I1}}{K_{I1} + P_1}\right) \cdot \left(\frac{K_{I2}}{K_{I2} + P_2}\right)$$

(equação 2.8)

- Inibição sem competição de produto (Aiba e Shoda, 1969 *apud* Borzani, 2001)

$$\mu_X = \frac{\mu_m}{\left(1 + \frac{k_S}{S}\right) \left(1 + \frac{P}{k_{I1}}\right)}$$

(equação 2.9)

### 2.2.2 Tipos de processos

#### a) Processo em batelada

Para um processo em batelada, o substrato é adicionado no reator em sua totalidade, neste caso, nenhum reagente pode ser adicionado no processo, exceto reagentes para o controle e segurança do processo, tais como os anti-espumantes e os controladores de pH. Após a finalização do tempo de fermentação, tem-se a saída de todo o volume contido no reator. Neste caso, pode-se esperar que este processo conduza a baixas conversões e / ou rendimento, por meio dos efeitos de inibição, e também devido à formação de produtos de reações paralelas que não são de interesse. A desvantagem deste processo é que este tipo de operação apresenta "tempo

morto ", correspondente ao tempo de carga, descarga, lavagem e esterilização. Por outro lado, a vantagem é que a operação apresenta menor risco de contaminação (por comparação com processos contínuos de fermentação) e uma grande flexibilidade de operação (Borzani *et al.*, 2001).

#### b) Processo em batelada alimentada

Em um processo de batelada alimentada, o substrato é adicionado no reator, neste caso, é considerada a variação do volume do reator ao longo do tempo, e os produtos são retirados apenas ao final da fermentação. A grande vantagem de um processo de batelada alimentada é que ela permite a manutenção de baixos níveis de substrato por longos períodos de tempo, que é favorável na estimativa de parâmetros cinéticos (Borzani, 2001).

O processo fermentativo em batelada alimentada também denominada de fermentação descontínua alimentada é uma técnica que consiste na adição de um ou mais nutrientes no fermentador, em alguns casos adição de precursores de produtos, por meio de uma vazão de alimentação constante ou com variação no tempo de forma contínua ou intermitente, e sua retirada só é executada no término da fermentação, onde a concentração de substrato é mantida constante no meio fermentativo pelo suprimento contínuo do nutriente (Carvalho e Sato, 2001).

As aplicações deste processo se contrapõem às demais fermentações em virtude das seguintes finalidades, segundo Carvalho e Sato, (2001):

- Minimização dos efeitos do controle do metabolismo celular;
- Prevenção da inibição por substrato ou precursores;
- Minimização da formação de produtos de metabolismo tóxicos;
- Superação de problemas de estabilidade em processo contínuo;
- Adequação do processo fermentativo a condições operacionais;

### c) Processo contínuo

O processo de fermentação contínuo é determinada pelo fluxo constante de meio de cultura e retirada do produto. Para que o sistema atinja o equilíbrio, uma condição na qual, as concentrações de células, de substrato e produto permaneçam constantes é necessário manter o volume do biorreator constante (Borzani, 2001).

## 2.3 Métodos matemáticos

Segundo Himmelblau *et al.* (2001), a natureza dos sistemas descritos se classificam como:

1. Modelos determinísticos: aqueles em que, para cada variável e parâmetro, pode-se associar um número ou uma série de números fixos, para qualquer conjunto de condições, *versus* modelos heurísticos, nas quais os parâmetros de entrada e saída não são conhecidos e, dessa forma, estando baseado na incerteza;
2. Modelos concentrados: são aqueles em que as variáveis apresentam-se homogêneas ao longo do sistema, *versus* modelos distribuídos; nesse sistema, ocorrem variações ponto a ponto das variáveis;
3. Modelos lineares, se o operador que multiplica a variável de entrada for linear apresentando condições de contorno e equações lineares, *versus* modelos não lineares quando o operador não for linear;
4. Modelos em estado estacionário, não há acúmulo, *versus* modelo em estado dinâmico, caracterizados por uma ou mais variáveis como dependentes do tempo.

### 2.3.1 Modelo determinístico (solução pelo Método de Runge-Kutta)

O método de Runge-Kutta é utilizado para a solução de sistemas concentrados, os quais são representados por um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDOs). Deve ser observado que o Método de Runge-Kutta não é adequado para sistemas rígidos.

A solução numérica é obtida com os valores da função para inúmeros valores da variável independente, que estão sujeitas as condições iniciais. A solução do PVI (problemas de valores iniciais) é uma função contínua e diferenciável que satisfaz:

$$\begin{cases} y' = f(x,y) \\ y(a) = n \\ a \leq x \leq b \text{ e } -\infty \leq x \leq \infty \end{cases}$$

A consistência de um método limita a magnitude do erro local cometido em cada passo e a estabilidade controla a propagação do erro durante os cálculos, dessa forma, o método é convergente se ele é consistente e estável (Filho, 2001).

O método de Runge-Kutta consiste em basicamente na execução de uma média ponderada de  $f(t,y)$  usados em diversos pontos do intervalo  $t_i \leq t \leq t_{i+1}$ .

$$k_{n1} = hf(t_i, y_i) \quad (\text{equação 2.19})$$

$$k_{n2} = hf(t_i + \frac{h}{2}, y_i + \frac{hk_{n1}}{2}) \quad (\text{equação 2.20})$$

$$k_{n3} = hf(t_i + \frac{h}{2}, y_i + \frac{hk_{n2}}{2}) \quad (\text{equação 2.21})$$

$$k_{n4} = hf(t_i + h, y_i + hk_{n3}) \quad (\text{equação 2.22})$$

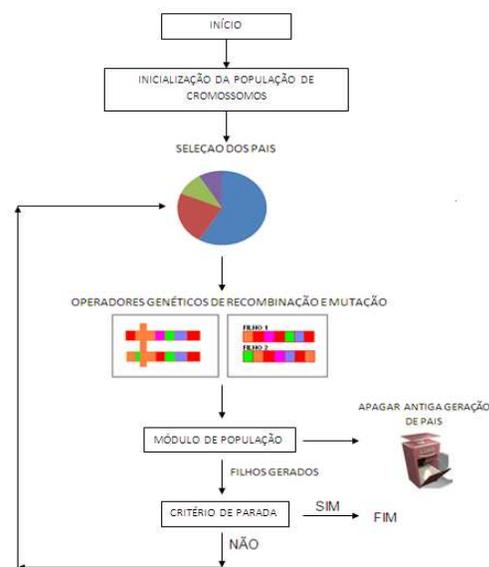
Um modo de verificar se o método produz valores dentro do intervalo é recalculando  $y_{i+1}$  no final de cada intervalo, utilizando o passo  $h$  dividido por 2 até que a exatidão desejada seja alcançada (Filho, 2001).

### 2.3.2 Método heurístico (Algoritmo Genético)

Os algoritmos evolucionários fazem uso do conceito de aproximação de modelos computacionais aos processos naturais como uma ferramenta para resolver os problemas, e seus operadores genéticos, ou seja, tenta aproximar os fenômenos ocorridos na natureza (Linden, 2006). Dentre os algoritmos evolucionários, que se enquadram entre os Métodos Heurísticos, em contra partida aos Métodos Determinísticos, estão os Algoritmos Genéticos

O Algoritmo Genético (G.A), como um dos Métodos Heurísticos, deve ser usado quando os algoritmos baseados nos Métodos Determinísticos tendem a falhar. No entanto, os GAs em geral são lentos, pois exploram extensas faixas operacionais, e como todos os métodos heurísticos em geral, não asseguram a obtenção do melhor resultado em todas as suas execuções. Sua grande vantagem é que esse método baseia-se na técnica de otimização global, diferentemente dos métodos determinísticos, como os de gradiente, que seguem a derivada de uma função, de forma a encontrar o seu máximo, encontrando normalmente máximos locais. Como na evolução natural, os algoritmos genéticos ao encontrar um máximo local, ou seja, o melhor de certo grupo, ele não estagna, mas sim continua na busca de melhores indivíduos (Linden, 2006).

A estrutura de um algoritmo genético está apresentada na Figura 2.9.



Fonte: Linden, 2006.

**Figura 2.9-** Esquema de um algoritmo genético, baseado em Linden (2006).

Resumindo de forma concisa, o algoritmo no qual o método se baseia, atribui aleatoriamente à população inicial os genes de cada cromossomo. A aptidão de um indivíduo da população é medida por uma função de erro, também chamada de função objetivo do problema de otimização, na qual se pode utilizar o método dos mínimos quadrados. Em seguida a função é normalizada, para permitir um melhor controle do processo de seleção. Como critérios de parada do algoritmo em geral são usados a aptidão do melhor indivíduo em conjunto com a limitação do número de gerações.

Segundo Linden (2006), para representar-se os números reais em números binários tem-se que conhecer a faixa de operação de cada uma das variáveis e a precisão desejada. Assim, estarão definidas quantos *bits* por variável vão ser usados. Se for utilizado  $k$  *bits* para uma variável  $x_i$ , que trabalha numa faixa  $[inf_i, sup_i]$  então está-se definindo a precisão máxima dessa variável que está apresentada na equação 2.23, e a conversão do número inteiro  $r_i$  correspondente ao número binário na equação 2.24.

$$\frac{sup_i - inf_i}{2^k - 1} \quad (2.23)$$

$$real = inf_i + \frac{sup_i - inf_i}{2^k - 1} * r_i \quad (2.24)$$

## 2.4. Planejamento de experimentos

O planejamento de experimentos é uma técnica que organiza a execução de experimentos para a determinação da influência das variáveis dependentes, seja ela quantitativa ou qualitativa, na variável resposta, variável independente (Bruns *et al.*, 2003).

Dessa forma, são realizadas variações máximas e mínimas em cada variável e observado os resultados da variável resposta. Assim, para um planejamento fatorial completo são estudados em apenas dois níveis nesse caso  $2^k$ , onde  $k$  é o número de variáveis de estudo, de modo que irá requerer  $2K$  ensaios diferentes; daí vem sua denominação de planejamento fatorial  $2K$ .

Nesse estudo é possível analisar a influência de todos os efeitos principais e efeitos de interação entre eles. Dessa forma, para um número grande de parâmetros a serem estudados o número de ensaios aumenta de forma significativa, tornando muitas vezes inviáveis este estudo. A alternativa para este tipo de problema é a execução do planejamento fatorial fracionário, ou planejamento de Plackett Burman no qual são analisadas primeiramente as variáveis significativas do processo realizando poucos experimentos (Bruns *et al.*, 2003).

#### 2.4.1 Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais. Essa metodologia pressupõe, por meio da determinação dos coeficientes dos modelos lineares ou quadráticos identificar a região de ótimo. Quando não atingida à região máxima deve-se deslocar os valores das variáveis máximas e mínimas para obtenção de novos modelos, a fim de serem obtidas novas regiões; essa etapa é realizada quantas vezes necessárias até a obtenção da região ótima do processo (Barros Neto *et al.* 1996).

### 2.5 Rendimento e produtividade

#### 2.5.1 Rendimento

O rendimento do processo do produto desejado em relação ao reagente consumido é definido de duas formas: o rendimento teórico e o rendimento aparente.

O rendimento teórico ou estequiométrico ( $Y_{C/S}^t$ ) é a razão entre a quantidade total, em massa ou moles, do componente produzido (S = substrato, ou P = produto) e a quantidade, em massa ou moles, de substrato consumido para o crescimento microbiano ou formação do produto. E é representado pela equação 2.25

$$Y_{C/S}^t = \frac{C}{S}$$

(equação 2.25)

O rendimento aparente ou observado ( $Y_{C/S}^A$ ) é a razão entre a quantidade, em massa ou moles, do componente produzido (S = substrato, ou P = produto) e a quantidade total consumida de substrato, em massa ou moles. E pode ser representado pela equação 2.26.

$$Y_{C/S}^A = \frac{C}{s_0 - s} \quad (\text{equação 2.26})$$

### 2.5.2 Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica para um reator em batelada é a concentração do componente formado C, no bioreator de volume V, num tempo  $t_r$ , onde a concentração microbiana ou do produto é constante, e pode ser representada pela equação 2.27.

$$Q_v = \frac{C}{t_r}$$

(equação 2.27)

## CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo tem como objetivo a descrição dos materiais, equipamentos e metodologia utilizados no estudo em questão.

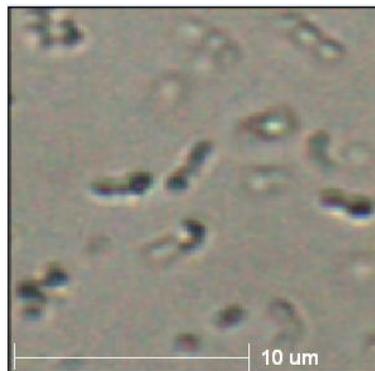
### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Fonte de carbono

Para o estudo das variáveis de processo foi utilizada a glicerina P.A CHEMCO para fazer um estudo comparativo de produtividade do processo, bem como sua viabilidade econômica.

#### 3.1.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado para as fermentações foi a *Propionibacterium acidipropionici* CCT-4843 (NRRL B-3569) obtido pela Coleção de Culturas da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia, e cultivado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. A Figura 3.1 apresenta a ampliação do microrganismo utilizado neste estudo.



**Figura 3.1-** *Propionibacterium acidipropionici*.

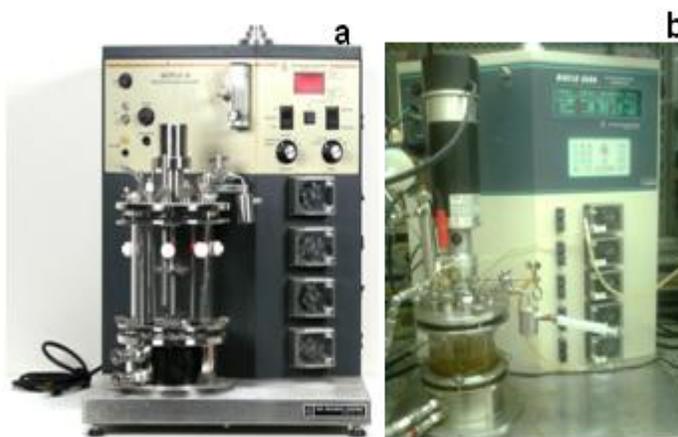
As fotografias dos microorganismos foram tiradas com um analisador de identificação e quantificação de partículas por imagem dinâmica digital FlowCAM VS.I (da Fluid

Imaging Technologies). Para as análises utilizou-se água deionizada como líquido de dispersão, com lentes amplificadoras de 20X e cela de leitura de 50 µm.

### 3.1.3 Fermentador

Para os estudos do efeito do pH) na fermentação utilizou-s um Fermentador Bioflo III - New Brunswick Scientific Co., Inc., apresentado na Figura 3.2a, e para o estudo da temperatura fez-se uso do Fermentador Bioflo 3000 - New Brunswick Scientific Co., Inc., apresentado na Figura 3.2b, ambos com volume de trabalho de 1 L. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) na Universidade Estadual de Campinas-FEA.

Ambos fermentadores eram compostos de um tanque agitado em batelada com controle de temperatura, pH e agitação, fixada em 100 rpm, com sistema do tipo turbina de pás planas. O biorreator possui controle de temperatura por recirculação de água na parte externa da cuba encamisada.



**Figura 3.2-** Bioreatores para o estudo do pH e temperatura..

## 3.2 Métodos analíticos

A medida de concentração dos microrganismos foi feita por gravimetria (peso seco), e as concentrações dos ácidos orgânicos e do glicerol foram determinadas por sistema de cromatografia líquida (HPLC)

### 3.2.1 Determinação da biomassa (Análise gravimétrica)

A biomassa foi determinada pela curva de absorbância *versus* a massa seca. A massa seca foi obtida pela filtração da alíquota da cultura utilizando um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  e secando o filtrado na estufa, apresentada na Figura 3.3, à 105 °C por 48 h ou até atingir massa constante.



**Figura 3.3** – Estufa de secagem especial Marconi, modelo MA-035/2

A densidade óptica (DO) da célula foi medida pelo espectrofotômetro apresentado na Figura 3.4, no comprimento de onda de 660 nm. As amostras foram diluídas com água destilada para que a DO ficasse no intervalo de 0,2 à 0,8.



**Figura 3.4** – Espectrofotômetro FEMTO 600 S.

### 3.2.2 Determinação do pH

O pH das amostras foram medidas fazendo uso do pHmetro apresentado na Figura 3.5, no qual foi calibrado com dois pontos de padrões (pH = 4,0 e 7,0), antes da realização das leituras.



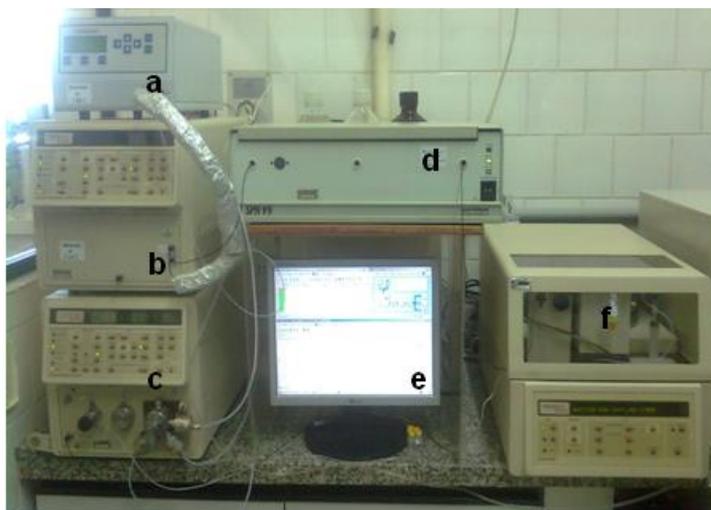
**Figura 3.5** – pHmetro Digimed DM 22.

### 3.2.3 Quantificação da fonte de carbono e dos ácidos orgânicos

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm em temperatura ambiente por meio de uma centrífuga Modelo NT 810 (Nova Técnica) por 15 minutos e filtradas com membrana em éster de celulose com 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade e 13 mm de diâmetro, e dispostas em “vials” para posterior injeção.

Após o preparo das amostras foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC-“high performance liquid chromatography”) modelo Varian 9010 para quantificar as concentrações de glicerol, ácido propanóico e os demais ácidos (ácido acético, ácido succínico, propanol). A fase móvel utilizada foi uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 M, preparada com água ultra-pura (Milli-Q) e filtrada com membrana em éster de celulose com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade, numa taxa de fluxo de 0,6 ml/min . A coluna utilizada para a separação dos ácidos orgânicos e glicerol foi a HPX-87H, mantida em um forno com circulação de ar e temperatura controlada à 35°C e comprimento de onda de . As áreas dos picos foram detectadas através dos detectores UV (ultravioleta) e RI (Índice de refração) montados em série e determinados quantitativamente através do ajuste de curvas dos padrões sigma dos componentes.

A Figura 3.6 apresenta o sistema para quantificação dos componentes do processo.



**Figura 3.6** – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (a- detector índice de refração (RI) ; b- detector UV; c- bomba para distribuição de solventes; d- forno com a coluna HPX-87H; e- computador com o software Millennium para quantificação dos compostos; f- injetor automático tipo carrossel).

### 3.3 Metodologia usada na execução dos experimentos

#### 3.3.1 Preparo do inóculo

Inicialmente foi transferida a colônia para uma cultura estoque de ágar inclinado, que possuía a composição apresentada na Tabela 3.1, baseado em Coral (2008).

**Tabela 3.1-** Composição do meio em Ágar inclinado.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Extrato de levedura	5
Extrato de malte	3
Ágar	20
Peptona	10
Glicerol	10

A colônia isolada em Ágar inclinado após 30 h à 30 °C foi transferida no interior da câmara de fluxo, apresentada na Figura 3.7 para o meio de ativação contendo 9 mL e incubada

nas mesmas condições. Dessa forma, após esse período o volume total de 10 mL da cultura foi transferida para 90 mL do meio de cultura, onde o meio de cultura constituía do meio de ativação sem agitação por um período de 24 à 36 numa temperatura de 30°C até o inoculo atingir  $A_{660} \approx 0,8$  e foi inoculado em 1% (v/v) no biorreator, perfazendo um volume total de 1L.



**Figura 3.7** – Câmara de fluxo.

O meio de ativação para o inóculo tem a composição mostrada na Tabela 3.2.

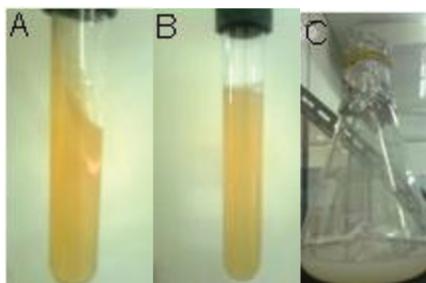
**Tabela 3.2-** Composição do meio de ativação da cultura.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
$KH_2PO_4$	1
$(NH_4)_2HPO_4$	2
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,010
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,0025
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,010
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,010
Extrato de levedura	10
Glicerol	10

**Tabela 3.3-** Composição do meio de crescimento da cultura.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,010
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0025
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,010
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,010
Extrato de levedura	10
Glicerol	20

As Figuras 3.8a, 3.8b e 3.8c apresentam as etapas de preparo do inóculo para o procedimento de fermentação e na Tabela 3.3 a composição do meio de crescimento.



**Figura 3.8** – Etapas do inóculo processo fermentativo (a - Ágar inclinado; b - Inóculo de ativação; c - Inóculo do meio de cultura; d – Fermentação no bioreator).

### 3.3.2 Estudo do pH na fermentação para produção do ácido propanóico

O estudo do pH em processos fermentativos é necessário, em virtude da concentração de íons hidrogênio afetar a atividade das enzimas e, portanto, a taxa de crescimento microbiano. Desta forma, para o estudo do pH foram executados ensaios em diferentes pHs para determinar o

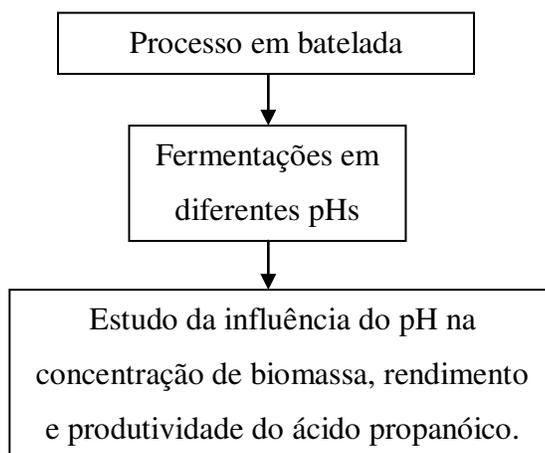
valor desta variável mais adequado para o processo, bem como para obter os dados para o modelo matemático, através da otimização dos parâmetros cinéticos para cada ensaio.

Os ensaios foram executados no Bioflo 3000 de 2 L num volume total de 1 L. Após a esterilização do reator com o meio de cultura por 30 minutos a 121 °C, o meio esfriado foi inoculado e controlada a temperatura em 30 °C numa agitação de 100 rpm. Em alguns ensaios o pH foi controlado pelo sistema PID em 6,0 e 7,0 pela adição de NaOH 10N, sendo também realizado ensaio sem controle do pH. Foi dado início da fermentação depois de realizada a inoculação e realizada a cinética.

A Tabela 3.4 apresenta os ensaios realizados para o estudo do pH, o qual foram realizados no bioreator. E o diagrama encontra-se apresentado na Figura 3.9

**Tabela 3.4** - Ensaio para o estudo do pH.

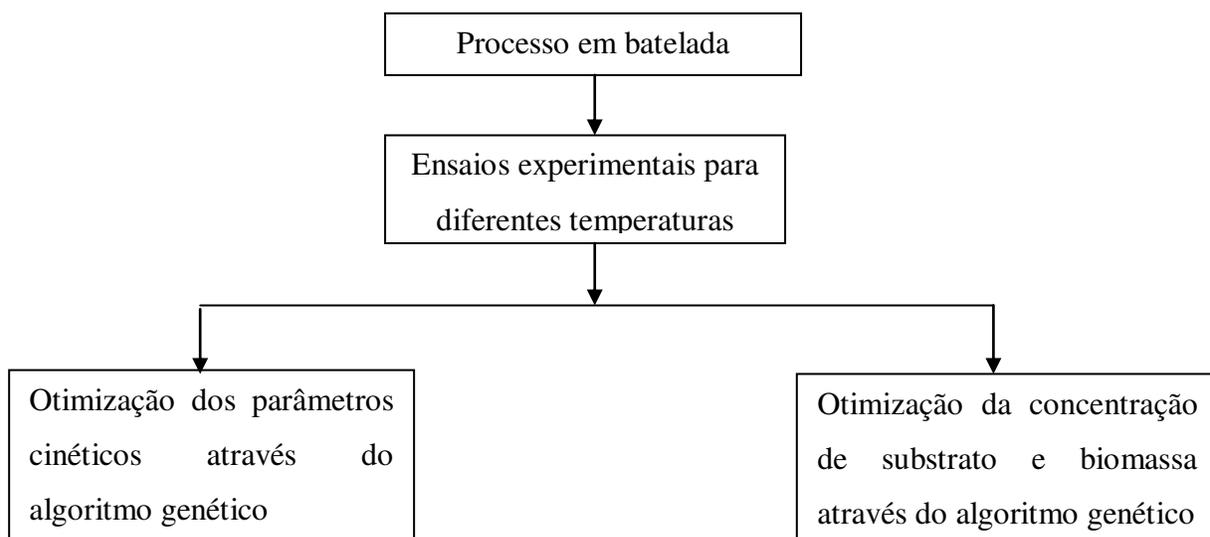
Ensaio	pH
1	<b>7,00</b>
2	<b>6,00</b>
3	<b>Sem controle</b>



**Figura 3.9** – Diagrama das etapas do processo para o estudo do pH

### 3.3.3 Estudo da temperatura na produção do ácido propanóico

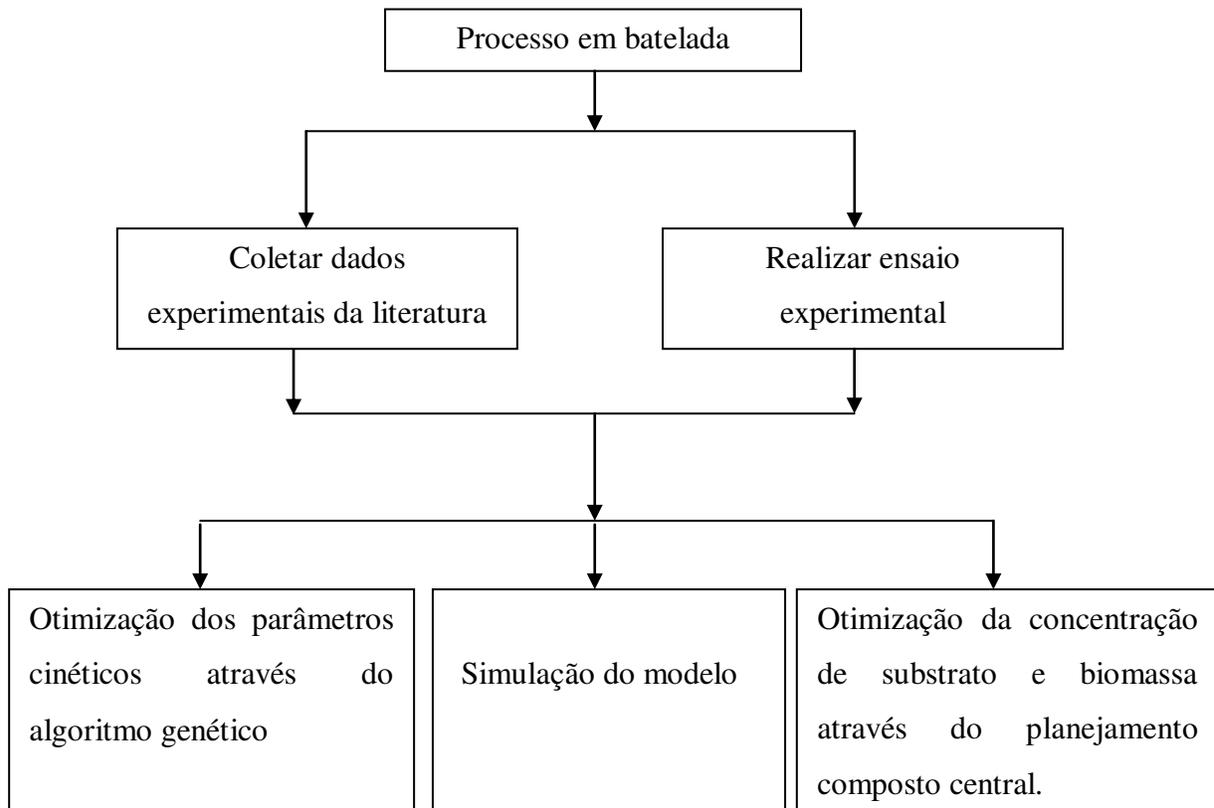
A fermentação foi realizada no biorreator, conforme citado no item 3.3. O reator foi esterilizado com o meio de cultura por 30 minutos a 121 °C, e após esfriado, foi inoculado e a temperatura controlada de 30 a 36 °C utilizando agitação e pH 6,0. Foi dado como início da fermentação após a realização da inoculação e realizada a cinética. O diagrama com as etapas do processo está apresentado na Figura 3.12



**Figura 3.10** – Diagrama das etapas do processo para o estudo da temperatura.

### 3.3.4 Estudo da biomassa e do substrato para um processo em batelada

O estudo teve como foco determinar a os parâmetros cinéticos do modelo, a significância das variáveis operacionais, seus efeitos e determinar o modelo quadrático para representar adequadamente o processo e maximizar a produtividade de ácido propanóico, obtidos nas simulações e otimizado com a Metodologia de Superfície de Resposta. As etapas do estudo estão apresentadas por meio do diagrama apresentado na Figura 3.11.



**Figura 3.11** – Diagrama do processo para o planejamento da concentração de substrato e biomassa.

### 3.4. Desenvolvimento do modelo matemático

O desenvolvimento do modelo de fermentação foi baseado em balanços dos componentes do processo de fermentação, e tem as seguintes restrições:

1. Processo fermentativo com apenas um substrato limitante;
2. Inibição celular por produtos metabólicos (ácido propanóico) (Aiba e Shoda, 1969);
3. O ácido propanóico é produzido pela conversão direta do substrato e não possuem produtos intermediários.

### 3.4.1 Processo em batelada

Para um processo em batelada, o substrato é adicionado no reator em sua totalidade, neste caso, nenhum reagente pode ser adicionado no processo, exceto reagentes para o controle e segurança do processo, tais como os anti-espumantes e os controladores de pH. Após a finalização do tempo de fermentação, tem-se a saída de todo o volume contido no reator. Neste caso, pode-se esperar que este processo conduza a baixas conversões e / ou rendimento, por meio dos efeitos de inibição, e também devido à formação de produtos de reações paralelas que não são de interesse. A desvantagem deste processo é que este tipo de operação apresenta "tempo morto", correspondente ao tempo de carga, descarga, lavagem e esterilização. Por outro lado, a vantagem é que a operação apresenta menor risco de contaminação (por comparação com processos contínuos de fermentação) e uma grande flexibilidade de operação (Borzani *et al.*, 2001).

As equações 2.10, 2.11 e 2.12 representam os modelos do substrato, biomassa e do produto, respectivamente para o processo em batelada.

Modelo do substrato do processo em batelada:

A velocidade de variação de concentração de substrato no fermentador corresponde à diferença entre a concentração de substrato adicionada por tempo e a utilizada para o crescimento celular. Desta forma, pelo balanço material, temos:

$$\left(\frac{dM_{sr}}{dt}\right) = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

$$\frac{dV \cdot S}{dt} + \frac{dS \cdot V}{dt} = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

Em virtude de não ocorrer variação de volume na dorna no tempo, tem-se:

$$S \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dS}{dt} = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

Em um processo em batelada, tem-se que  $F = \frac{dV}{dt} = 0$ , onde  $\frac{1}{V} \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right) = r_s$ :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \cdot S_o - \frac{1}{V} \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} S_o - \frac{1}{V} \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{V} \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

A taxa cinética de consumo de substrato,  $r_s$ , pode ser representado pela equação abaixo:

$$r_s = \frac{1}{V} \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

E, desta forma,

$$\frac{dS}{dt} = -r_s$$

Para um balanço material mais geral do processo, tem-se:

$$r_s = (r_s)_m + (r_s)_c$$

Nesta ultima equação,  $(r_s)_m$  é o consumo do substrato utilizado como manutenção, ou seja, substrato utilizado para realizar as funções básicas das células. Desta forma, o conceito do consumo específico ( $m_s$ ) citado por Pirt (1975) é:

$$m_s = \frac{(r_s)_m}{X}$$

E,  $(r_s)_c$  é o consumo de substrato destinado somente ao crescimento ou reprodução microbiana, definido para um novo fator de conversão como:

$$(r_s)_c = \frac{r_x}{Y_{X/S}}$$

Portanto, o modelo não-estruturado do substrato para um processo em batelada pode ser representado pela equação 2.10.

$$\frac{ds}{dt} = - \left( \frac{\mu_x}{Y_{X/S}} + m_s \right) \cdot X \quad (\text{equação 2.10})$$

Modelo para as células do processo em batelada:

A velocidade de variação de concentração de células no reator corresponde à concentração celular formada decorrente do crescimento microbiano, algebricamente:

$$\left( \frac{dM_x}{dt} \right) = \left( \frac{dM_x}{dt} \right)_c$$

$$\left( \frac{dM_x}{dt} \right) = \mu_x \cdot V \cdot X$$

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = \mu_x \cdot V \cdot X$$

$$X \cdot \frac{d(V)}{dt} + V \cdot \frac{d(X)}{dt} = \mu_x \cdot V \cdot X$$

Em virtude de não haver variação de volume no tempo, temos  $\frac{d(V)}{dt} = 0$  e  $\mu_x \cdot X = r_x$ , então:

$$V \cdot \frac{d(X)}{dt} = \mu_x \cdot V \cdot X$$

$$\frac{d(X)}{dt} = \mu_x \cdot X$$

(equação 2.11)

Modelo para os produtos do processo em batelada:

A velocidade de variação da concentração do produto no fermentador depende da concentração que é formada em razão do metabolismo microbiano (Borzani, 2001):

$$\left(\frac{dM_p}{dt}\right) = \left(\frac{dM_p}{dt}\right)_c$$

$$\left(\frac{dV \cdot P}{dt}\right) = \mu_p \cdot V \cdot X$$

$$P \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dP}{dt} = \mu_p \cdot V \cdot X$$

Em virtude de não ocorrer variação de volume na dorna no tempo, e considerando  $r_p = Y_{p/s}' \cdot r_s$ , tem-se:

$$V \cdot \frac{dP}{dt} = \mu_p \cdot V \cdot X$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p \cdot X$$

Relacionando a produção do ácido propanóico com o crescimento microbiano e biomassa existente, tem-se:

$$u_p = Y_{p/s} \cdot u_s$$

$$u_p = Y_{p/s} \cdot \left( \frac{\mu_x}{Y_{x/s}} + m_p \right)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu_x \cdot X + m_p \cdot X$$

Por conseguinte, o modelo não-estruturado do produto para um processo em batelada, considerando que  $Y_{P/X} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}$ , será o apresentado pela equação 2.12:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_x \cdot Y_{P/X} \cdot X + m_p \cdot X$$

(equação 2.12)

### 3.4.2 Processo em batelada alimentada

Em um processo de batelada alimentada, o substrato é adicionado no reator, neste caso, é considerada a variação do volume do reator ao longo do tempo, e os produtos são retirados apenas ao final da fermentação. A grande vantagem de um processo de batelada alimentada é que ela permite a manutenção de baixos níveis de substrato por longos períodos de tempo, que é favorável na estimativa de parâmetros cinéticos (Borzani, 2001).

O processo fermentativo em batelada alimentada também denominada de fermentação descontínua alimentada é uma técnica que consiste na adição de um ou mais nutrientes no fermentador, em alguns casos adição de precursores de produtos, por meio de uma vazão de alimentação constante ou com variação no tempo de forma contínua ou intermitente, e sua retirada só é executada no término da fermentação, onde a concentração de substrato é mantida constante no meio fermentativo pelo suprimento contínuo do nutriente (Carvalho e Sato, 2001).

As aplicações deste processo se contrapõem às demais fermentações em virtude das seguintes finalidades, segundo Carvalho e Sato, (2001):

- Minimização dos efeitos do controle do metabolismo celular;
- Prevenção da inibição por substrato ou precursores;

- Minimização da formação de produtos de metabolismo tóxicos;
- Superação de problemas de estabilidade em processo contínuo;
- Adequação do processo fermentativo a condições operacionais;

O processo batelada alimentada pode ser representado pelas equações 2.13, 2.14 e 2.15.

Modelo para o substrato do processo em batelada alimentada:

Pelo balanço global, tem-se que a velocidade de variação de concentração de substrato no fermentador corresponde à diferença entre a concentração de substrato adicionada por tempo e a utilizada para o crescimento celular. Desta forma, tem-se:

$$\left(\frac{dM_{sr}}{dt}\right) = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

$$\left(\frac{dV \cdot S}{dt}\right) = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

$$S \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dS}{dt} = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

Em virtude da variação do volume na dorna no tempo deve-se exclusivamente à alimentação e sendo  $r_s = \frac{1}{V} \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$ , e  $\frac{dV}{dt} = F$ , tem-se:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{F \cdot S}{V} - r_s$$

E, sendo:

$$r_s = (r_s)_m + (r_s)_c$$

$$r_s = m_s \cdot X + \frac{r_x}{y_{x/s}}$$

O modelo não-estruturado do substrato para um processo em batelada alimentada, na qual  $D = \frac{F}{V_i + F.t}$  é variável com o tempo, será representado pela equação 2.13:

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu_X}{Y_{X/S}} + m_S\right) \cdot X - D \cdot S$$

(equação 2.13)

Modelo para as células do processo em batelada alimentada:

A velocidade de variação de concentração de células no reator corresponde à concentração celular formada decorrente do crescimento microbiano.

$$\left(\frac{dM_X}{dt}\right) = \left(\frac{dM_X}{dt}\right)_c$$

$$\left(\frac{dM_X}{dt}\right) = \mu \cdot V \cdot X$$

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = \mu \cdot V \cdot X$$

$$X \cdot \frac{d(V)}{dt} + V \cdot \frac{d(X)}{dt} = \mu \cdot V \cdot X$$

$$X \cdot F + V \cdot \frac{d(X)}{dt} = \mu \cdot V \cdot X$$

$$X \cdot \frac{F}{V} + \frac{d(X)}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\frac{d(X)}{dt} = (u_x - D) \cdot X$$

E, portanto, a equação 2.14 apresenta o modelo não-estruturado da biomassa para um processo em batelada alimentada.

$$\frac{d(X)}{dt} = u_x \cdot X - D \cdot X$$

(equação 2.14)

Modelo para os produtos do processo em batelada alimentada:

A velocidade de variação da concentração do produto no fermentador depende da concentração que é formada devido ao metabolismo microbiano (Borzani, 2001) e considerando  $\mu_p \cdot X = r_p$  e  $r_p = Y_{p/S} \cdot r_s$ , temos:

$$\left(\frac{dM_p}{dt}\right) = \left(\frac{dM_p}{dt}\right)_c$$

$$\left(\frac{dV \cdot P}{dt}\right) = \mu_p \cdot V \cdot X$$

$$P \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dP}{dt} = \mu_p \cdot V \cdot X$$

$$P \cdot F + V \cdot \frac{dP}{dt} = \mu_p \cdot V \cdot X$$

$$\frac{dP}{dt} = u_p \cdot X - D \cdot P$$

Sendo,  $u_p = Y_{p/S} \cdot u_s + m_p$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/S} \cdot u_s \cdot X + m_p \cdot X - D \cdot P$$

O modelo não-estruturado do produto para um processo em batelada, considerando que  $Y_{P/X} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}$ , pode ser representado pela equação 2.15.

$$\frac{dP}{dt} = \mu_X \cdot Y_{P/X} \cdot X + m_P \cdot X - D \cdot P \quad (\text{equação 2.15})$$

### 3.4.3 Processo contínuo

O processo de fermentação contínuo é determinada pelo fluxo constante de meio de cultura e retirada do produto. Para que o sistema atinja o equilíbrio, uma condição na qual, as concentrações de células, de substrato e produto permaneçam constantes é necessário manter o volume do biorreator constante (Borzani, 2001). O equacionamento para o reator contínuo sem reciclo de células é representado pelas seguintes equações 2.16, 2.17 e 2.18.

Modelo para substrato do processo contínuo:

Pelo balanço global, tem-se que a velocidade de variação de concentração de substrato no fermentador corresponde à diferença entre a concentração de substrato adicionada por tempo e a utilizada para o crescimento celular. Desta forma, tem-se:

$$\left(\frac{dM_{sr}}{dt}\right) = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

$$\left(\frac{dV \cdot S}{dt}\right) = F \cdot S_o - \left(\frac{dM_{sc}}{dt}\right)$$

A velocidade de variação de concentração de substrato no fermentador corresponde à diferença entre a concentração inicial e final de substrato e a utilizada para o crescimento celular.

Contudo, tem-se:

$$S \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dS}{dt} = F \cdot S_0 - \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = F \cdot S_0 - F \cdot S - \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

Em virtude de D ser fixo, não há variação de volume no reator, dessa forma:

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = F \cdot S_0 - F \cdot S - \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \cdot S_0 - \frac{F}{V} S - \left( \frac{dM_{sc}}{dt} \right)$$

O modelo não-estruturado do substrato para um processo contínuo, na qual o valor de  $D = \frac{F}{V}$ , será:

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot S_0 - S \cdot D - r_s$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_0 - S) - \left( \frac{\mu_x}{Y_{x/s}} + m_x \right) \cdot X$$

(equação 2.16)

Modelo para as células do processo contínuo:

A velocidade de variação de concentração de células no reator corresponde à concentração celular formada decorrente do crescimento microbiano.

$$\left( \frac{dM_x}{dt} \right) = \left( \frac{dM_x}{dt} \right)_c$$

$$\frac{d(V.X)}{dt} = \left(\frac{dM_X}{dt}\right)_c$$

$$X \cdot \frac{d(V)}{dt} + V \cdot \frac{d(X)}{dt} = \left(\frac{dM_X}{dt}\right)_c$$

$$V \cdot \frac{dX}{dt} = F \cdot (X_0 - X) + V \cdot \left(\frac{dX}{dt}\right)_{crescimento}$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (X_0 - X) + \left(\frac{dX}{dt}\right)_{crescimento}$$

Em virtude de D ser fixo, não há variação de volume no reator, dessa forma:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{crescimento} = u_x \cdot X$$

Se a alimentação proceder-se esterilizada obtendo  $X_0 = 0$ , temos a equação 2.17:

$$\frac{dX}{dt} = u_x \cdot X - D \cdot (X - X_0)$$

(equação 2.17)

Se a alimentação proceder-se esterilizada obtendo  $X_0 = 0$ , segundo Borzani (2001), na situação de estado estacionário no reator,  $\frac{d(X)}{dt} = 0$  e, tem-se uma condição a qual é possível controlar a velocidade específica da célula, através do controle da vazão de alimentação, pois neste caso,  $u_x$  será igual a D.

Modelo para os produtos do processo contínuo:

A velocidade de variação da concentração do produto no fermentador depende da concentração que é formada devido ao metabolismo microbiano (Borzani, 2001), com isso tem-se:

$$V \cdot \left( \frac{dP}{dt} \right) = F \cdot P_0 - F \cdot P + \left( \frac{dM_P}{dt} \right)_c$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{F}{V} \cdot P_0 - \frac{F}{V} P + \left( \frac{dM_P}{dt} \right)_c$$

O modelo não-estruturado do produto para um processo contínuo, na qual o valor de  $D = \frac{F}{V}$ , será:

$$\frac{dP}{dt} = D \cdot (P_0 - P) + r_P$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/s} \cdot u_S \cdot X + D \cdot (P_0 - P)$$

$$\frac{dP}{dt} = D \cdot (P_0 - P) + Y_{p/s} \cdot \left( \frac{\mu_X}{Y_{x/s}} + m_p \right) X$$

Desse modo, sendo  $Y_{p/X} = \frac{\mu_P}{\mu_X}$  o modelo não-estruturado dos produtos para um processo contínuo é o apresentado pela equação 2.18:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/X} \cdot \mu_X \cdot X + m_p \cdot X + D \cdot (P_0 - P)$$

(equação 2.18)

### 3.5. Algoritmo de otimização

O trabalho computacional foi realizado em um processador Pentium Dual-Core com 3 Gigabits de memória RAM e HD de 160 Gigabytes.

Para o cálculo dos parâmetros foi utilizado o algoritmo genético, utilizando o software MATLAB 7.0.

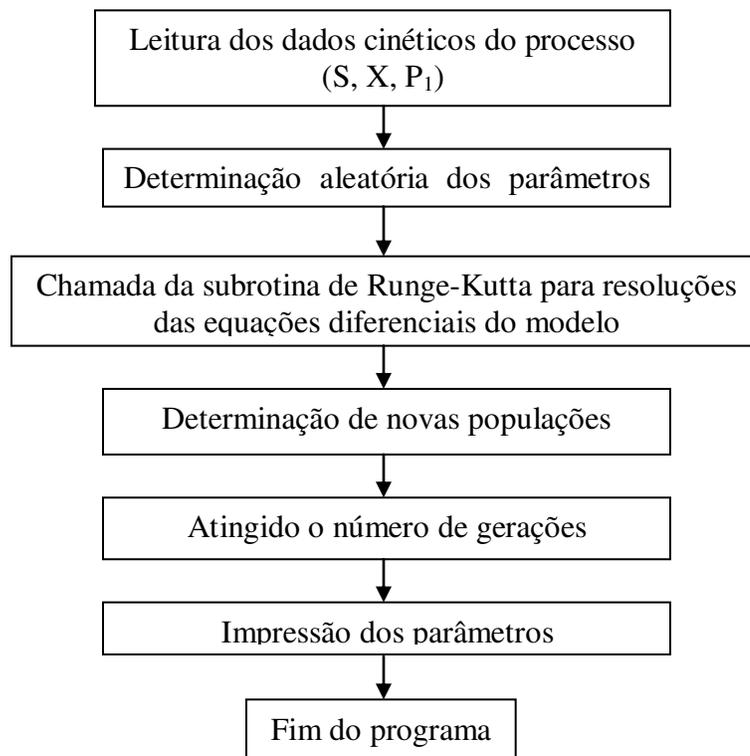
Fazendo uso de dados experimentais disponíveis na literatura foi possível otimizar os parâmetros cinéticos os quais estão mostrados nas etapas posteriores.

Para o ajuste dos parâmetros cinéticos foram utilizados os modelos matemáticos que consistiam no sistema de equações (2.10, 2.11 e 2.12). Esse ajuste foi realizado por intermédio da otimização por algoritmo genético (GA). Como os parâmetros obtidos foram realizadas simulações que permitiram a predição dos perfis de substrato, células e produtos quando os parâmetros escolhidos minimizam a função objetivo, representada pela equação 3.1)

$$\text{saida} = \text{saida} + \text{soma}(\text{soma}(\text{dados}\{j\} - y).^2) \quad (\text{equação 3.1})$$

Desta forma foram determinados os 7 parâmetros cinéticos do modelo com uma precisão de  $10^{-4}$  por algoritmo genético. Foram consideradas as amplitude de  $I = m-n$  onde  $m$  é o limite superior e  $n$  é o limite inferior, e o número de pontos é  $P = I \times 10^X$ .  $X$  é o número de casas decimais.

O fluxograma de resolução do problema de otimização para obtenção dos parâmetros cinéticos está apresentado na Figura 3.12.



**Figura 3.12** – Diagrama para otimização dos parâmetros do processo em batelada.

### 3.6. Desvio padrão residual

Com o objetivo de observar o desvio do modelo com os dados experimentais foram determinados o desvio padrão residual onde, segundo ATALA *et al.* (2001), representa a qualidade de predição do modelo e pode ser representado pela equação 3.1.

$$RSD(\%) = 100. \sqrt{\frac{\frac{1}{n} \sum_{n=1}^n (v_e - v_m)^2}{\bar{v}_e}}$$

(equação 3.1)

No qual, n é o número de pontos experimentais,  $v_e$  é o valor dos pontos cinéticos medidos experimentalmente,  $v_m$  é o valor predito pelo modelo no ponto experimental, e  $\bar{v}_e$  é a média dos pontos experimentais.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Estudo do efeito do pH na fermentação para produção do ácido propanóico

Serão apresentados, nesta seção, o estudo do pH frente ao crescimento celular, conversão e a produtividade do ácido propanóico. Com os ensaios experimentais foi possível identificar o pH mais adequado, assim como, mediante o uso do algoritmo genético, determinar os parâmetros cinéticos com o objetivo de obter um modelo que representasse os ensaios experimentais.

Nesta etapa, foram executados os ensaios com pH 6,0, 7,0 e sem o controle do pH para avaliar a influência do pH no rendimento do ácido propanóico, apresentados nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3. Onde, S é a concentração de substrato, P<sub>1</sub> é a concentração de ácido propanóico e X é concentração microbiana.

**Tabela 4.1** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e S<sub>0</sub>=20,79 kgm<sup>-3</sup>.

Tempo (h)	S (kgm <sup>-3</sup> )	P <sub>1</sub> (kgm <sup>-3</sup> )	X (kgm <sup>-3</sup> )
0,05	20,79	0,00	0,15
5,05	19,74	0,00	0,38
9,05	19,63	0,00	0,50
17,05	19,02	0,00	0,51
24,42	19,17	0,07	0,67
33,97	18,72	0,35	0,72
43,97	17,27	1,26	1,40
62,40	4,92	6,81	4,08
70,97	1,02	12,16	5,68
79,80	0	13,26	6,12
97,97	0	13,26	6,28
109,12	0	13,27	6,43

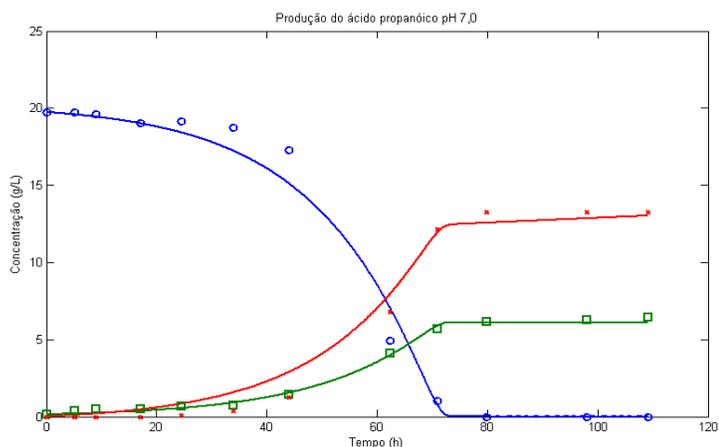
**Tabela 4.2** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, pH = 7,0 e  $S_0=20,04 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,00	20,04	0,00	0,07
2,83	19,82	0,00	0,13
13,77	19,82	0,00	0,24
19,00	19,82	0,00	0,47
25,00	19,70	0,12	0,47
38,87	19,41	0,65	0,60
49,30	16,74	2,39	1,00
55,00	10,32	3,65	1,93
65,17	9,41	7,39	3,47
71,83	5,95	8,75	4,43
85,95	2,29	11,05	5,67
93,98	0,36	11,92	5,77

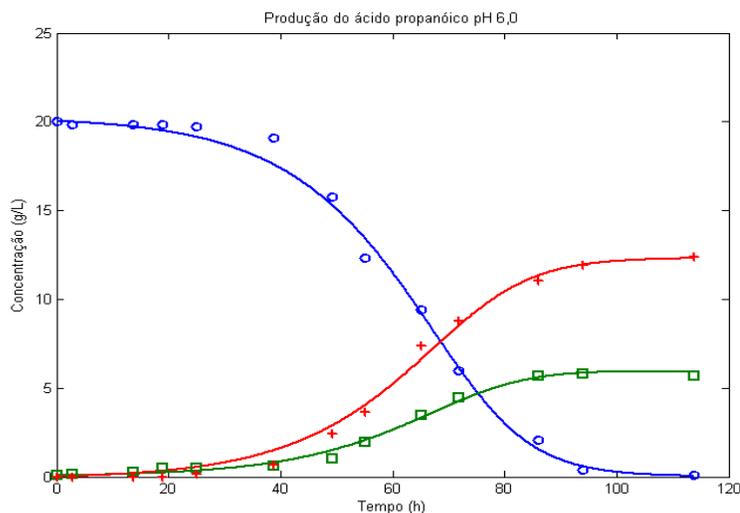
**Tabela 4.3** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, sem controle de pH e  $S_0=20,00 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0	20,00	0,00	0,02
14,38	18,78	0,00	0,07
24,22	17,14	0,00	0,20
38,78	16,88	0,64	0,57
47,38	15,73	0,73	0,77
62,75	14,16	2,44	0,87
68,67	12,58	3,30	1,03
73,47	11,5	3,48	1,22
86,55	10,59	3,99	1,38
98,47	10,12	5,37	1,48
115,30	9,99	5,99	1,49

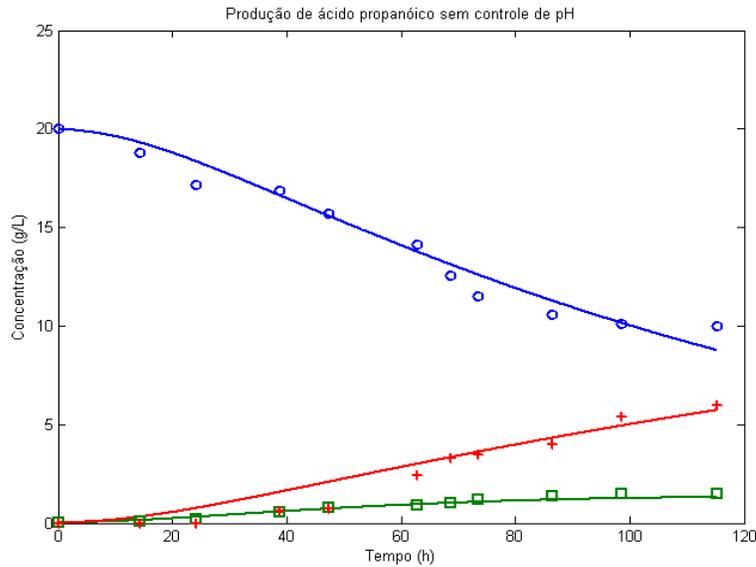
O modelo matemático para representar os dados cinéticos para diferentes pHs consiste no sistema de equações (2.9, 2.10, 2.11, e 2.12). O ajuste de parâmetros foi realizado através da otimização por algoritmo genético e posterior simulação, na qual permitiu obter perfis de concentração de glicerol, biomassa e ácido propanóico apresentado nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3. O ajuste dos parâmetros foi realizado fazendo uso do modelo matemático, dos dados experimentais e da minimização da função objetivo, dada pela equação 3.1.



**Figura 4.1** – Perfis de concentração da fermentação propiônica para o pH = 7,0 para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



**Figura 4.2** Perfis de concentração da fermentação propiônica para o pH = 6,0 para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



**Figura 4.3** – Perfis de concentração da fermentação propiônica sem o controle do pH para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).

Pode ser observado, através da avaliação dos modelos com os parâmetros otimizados, que o modelo para o processo em pH 7 é mais difícil de ser representado devido à acentuada fase exponencial. Isso pode também refletir alguma dificuldade operacional para manter o processo nas condições desejadas.

Os resultados dos parâmetros cinéticos para a representação dos ensaios experimentais realizados estão apresentados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** – Parâmetros cinéticos otimizados por algoritmo genético para o estudo do pH.

Parâmetros	pH 6,0	pH 7,0	Sem controle de pH
$y_{x/s}$	0,3067	0,3038	0,1941
$y_{p1/s}$	0,6113	0,6138	0,4445
$k_{II}$	2344,5299	621,2184	0,4789
$k_s$	18,0412	0,5526	4,2251
$u_{s_{max}}$	0,4112	0,1808	1,1333
$m_x$	0,0029	0,0007	0,0509
$m_p$	0,0003	0,0026	0,0082

Os desvios do modelo em relação aos dados experimentais do estudo do pH estão apresentados na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** – Desvio padrão residual para o efeito do pH na fermentação propiônica.

RSD (%)	pH 6,0	pH 7,0	Sem controle de pH
<b>X</b>	29,44	24,38	4,01
<b>S</b>	9,78	16,14	9,58
<b>P<sub>1</sub></b>	29,99	33,91	15,76

Através dos resultados apresentados na Tabela 4.5 é observada uma maior percentagem de desvio padrão relativo para a concentração do ácido propanóico, a qual foi inferior a 34%, quando comparada com o desvio para a concentração do substrato que foi inferior a 17%, e o desvio da concentração microbiana que foi inferior de 30%.

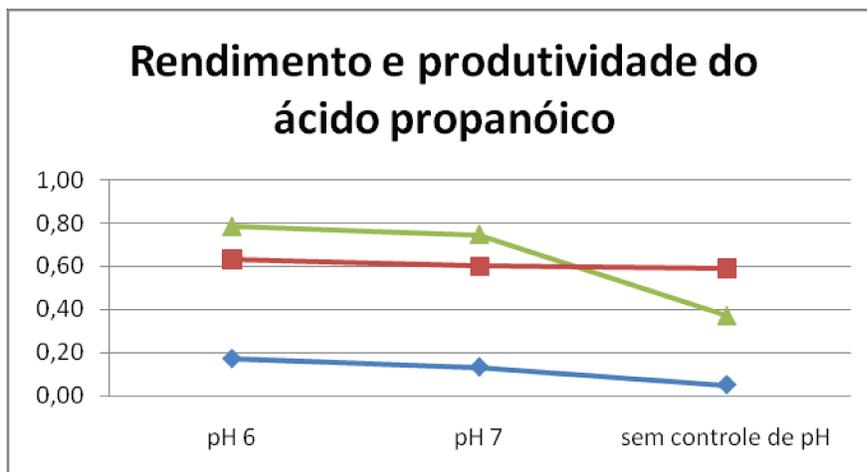
Os resultados da simulação para o estudo do pH na concentração de substrato inicial de 20 g/L e concentração microbiana inicial de 0,15 g/L estão apresentados na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6** – Estudo das variáveis de processo na fermentação propiônica através da variação no pH.

Variáveis	pH 7,0	pH 6,0	Sem controle de pH
$X^f$ (kgm <sup>-3</sup> )	5,71	6,43	1,49
$P_1^f$ (kgm <sup>-3</sup> )	11,92	13,27	5,99
$y_{x/s}$ (g/g)	0,29	0,31	0,14
$y_{p1/s}$ (g/g)	0,60	0,63	0,59

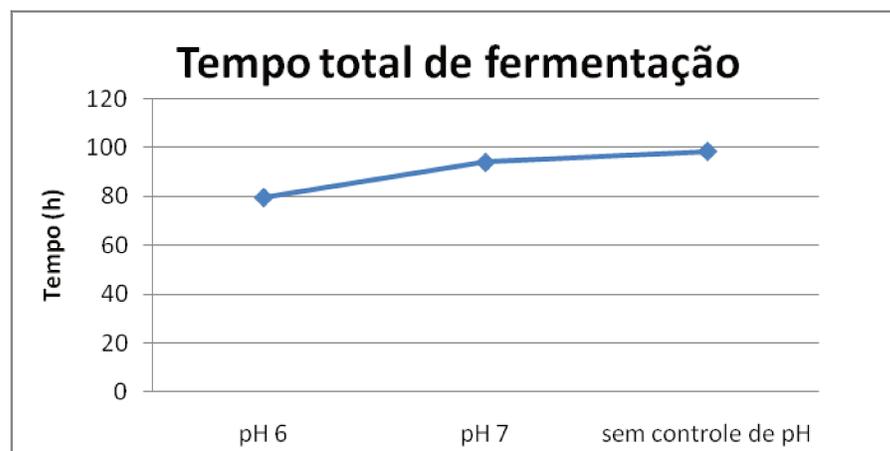
Os resultados observados permitiram observar um rendimento mais alto de ácido propanóico em relação ao experimento sem controle de pH. Para o pH 6.0 foi obtido um aumento de 7,8% com relação aos experimentos sem controle de pH e de 4,8% quando o pH 7.0 foi usado.

Dentre os pHs estudados, o pH 6.0 apresentou uma melhor resposta o qual pode ser verificado através da produtividade e do rendimento do ácido propanóico apresentado na Figura 4.4.



**Figura 4.4** – Rendimento em mmol do produto para cada 100 mmol de substrato consumido ( $\Delta$ ); rendimento mássico de produto produzido por substrato consumido ( $\square$ ), e produtividade ( $\diamond$ ) dos dados simulados da produção do ácido propanóico em função do pH para uma concentração inicial de substrato de 20 g/L e uma concentração inicial microbiana de 0,15 g/L.

Dessa forma, a escolha do pH, no qual o processo deve ser controlado, deve levar em conta não tão somente o rendimento do processo, bem como o tempo final de produção. A Figura 4.5 apresenta o tempo total de fermentação considerando os 3 modelos cinéticos do estudo do pH.



**Figura 4.5** – Esboço da influência do pH no tempo total da fermentação propiônica para as condições de  $S_0 = 20$  g/L e  $X_0 = 0,15$  g/L.

A fermentação executada com o controle do pH, apesar de possuir gastos com a adição de base, possui um maior rendimento, sendo portanto, mais vantajoso.

Para uma alta concentração de substrato, em um processo conduzido no pH 7.0 haverá uma saturação do substrato e portanto, o rendimento do processo será reduzido se comparado com um processo conduzido a pH 6.0. A constante de inibição do ácido propanóico,  $k_{II}$  no qual representam a constante de inibição do ácido propanóico, mostra que o processo que apresenta pH = 6.0 praticamente não possui inibição por produto, em virtude do alto valor da constante tender a 1 no termo que representa a inibição por produto da equação 2.9; o mesmo ocorre para o processo com pH=7.0, para baixas concentrações de substrato.

#### **4.2 Estudo do efeito da temperatura na fermentação para produção do ácido propanóico**

Serão apresentados nesta seção o estudo da temperatura frente ao crescimento celular, conversão, produtividade do ácido propanóico e tempo total de fermentação.

##### *4.2.1. Otimização dos parâmetros cinéticos através do Algoritmo Genético*

Em virtude das propionibacterias possuírem a faixa de temperatura ótima entre 30 e 36°C foram realizados experimentos com o objetivo de estudar a influência de cada temperatura na concentração celular conversão, produtividade do ácido propanóico e tempo total de fermentação.

As Tabelas 4.7 a 4.13 apresentam os dados experimentais das fermentações em batelada em diferentes temperaturas.

**Tabela 4.7** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 30°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e  $S_0=20,79 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,05	20,79	0,00	0,15
5,05	19,74	0,00	0,38
9,05	19,63	0,00	0,50
17,05	19,02	0,00	0,51
24,42	19,17	0,07	0,67
33,97	18,72	0,35	0,72
43,97	17,27	1,26	1,40
62,40	4,92	6,81	4,08
70,97	1,02	12,16	5,68
79,80	0	13,26	6,12
97,97	0	13,26	6,28
109,12	0	13,27	6,43

**Tabela 4.8** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 31°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e  $S_0=16,90 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,00	16,90	0,00	0,20
19,83	14,13	0,01	0,50
24,58	13,04	1,23	0,72
37,08	11,79	2,25	0,95
42,48	6,40	5,52	1,07
48,30	3,83	7,24	1,47
58,92	1,32	8,47	1,91
64,70	0,00	9,38	2,27
71,75	0,00	9,57	3,08

**Tabela 4.9** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 32°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e  $S_0=26,61 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,00	26,61	0,00	0,15
16,40	23,55	0,01	0,31
20,03	21,49	1,16	0,61
24,72	15,50	5,22	1,49
37,25	13,68	6,89	2,52
42,65	10,98	11,50	2,70
48,45	5,26	15,05	3,82
59,10	2,32	16,69	4,40
64,90	0,00	18,57	5,01

**Tabela 4.10** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 33°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e  $S_0=20,51 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,00	20,51	0,00	0,23
12,33	20,36	0,01	0,37
16,57	19,99	0,02	0,52
20,92	19,05	0,04	0,65
35,92	16,38	3,29	1,34
43,15	11,14	5,06	1,39
47,97	7,90	7,17	2,53
60,85	4,75	8,96	2,69
64,58	2,78	10,08	3,58
69,75	0,86	12,16	3,86
89,00	0,40	12,20	3,93
109,88	0,00	12,37	3,92

**Tabela 4.11** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 34°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e  $S_0=19,86 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,00	19,86	0,00	0,44
12,28	19,52	0,01	0,91
16,68	18,44	1,33	1,54
20,92	17,41	2,27	2,93
36,00	11,79	5,65	3,51
43,17	10,14	6,59	4,31
48,00	8,37	8,37	4,32
60,95	7,04	9,41	4,93
64,62	5,12	9,92	4,99
69,88	3,95	10,65	5,03
97,63	0,00	10,65	5,03

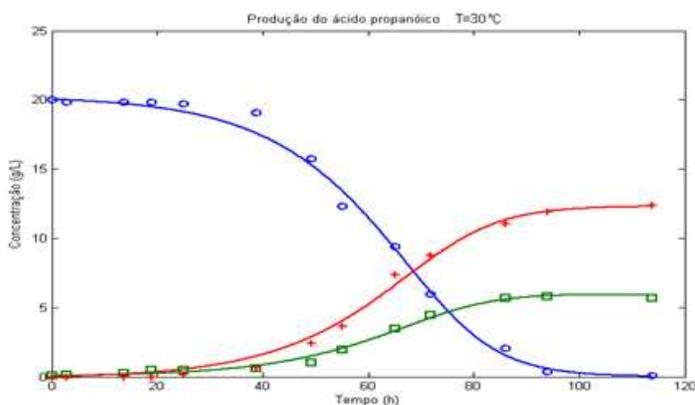
**Tabela 4.12** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 35°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e  $S_0=21,02 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,00	21,02	0,00	0,46
23,50	18,45	1,17	1,09
28,38	17,64	4,36	1,17
36,17	17,51	5,52	1,76
48,17	14,01	7,12	2,92
53,17	9,23	13,04	3,01
74,05	4,03	16,02	3,86
77,88	0,35	16,06	4,45
82,00	0,00	16,20	4,84

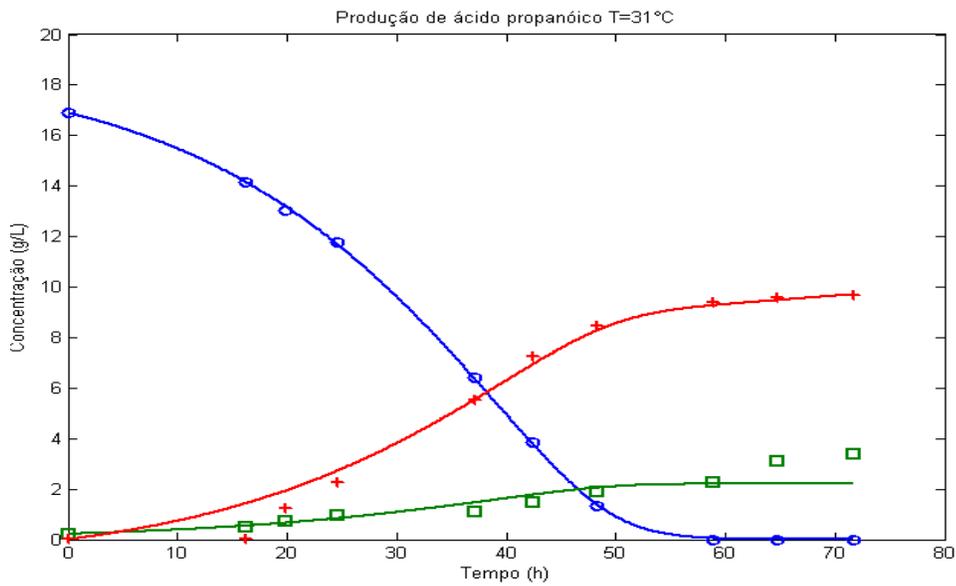
**Tabela 4.13** - Dados experimentais da fermentação em batelada à 36°C, agitação 100 rpm, pH = 6,0 e  $S_0=20,61 \text{ kgm}^{-3}$ .

Tempo (h)	S ( $\text{kgm}^{-3}$ )	P <sub>1</sub> ( $\text{kgm}^{-3}$ )	X ( $\text{kgm}^{-3}$ )
0,00	20,61	0,00	0,17
15,17	19,04	1,59	0,48
19,88	17,22	2,39	0,78
25,12	14,82	4,35	0,83
36,22	9,73	7,08	1,09
41,83	5,96	8,47	1,54
45,52	4,70	9,63	2,54
48,93	3,27	9,35	2,91
64,53	0,00	12,43	3,93
67,10	0,00	12,74	4,21

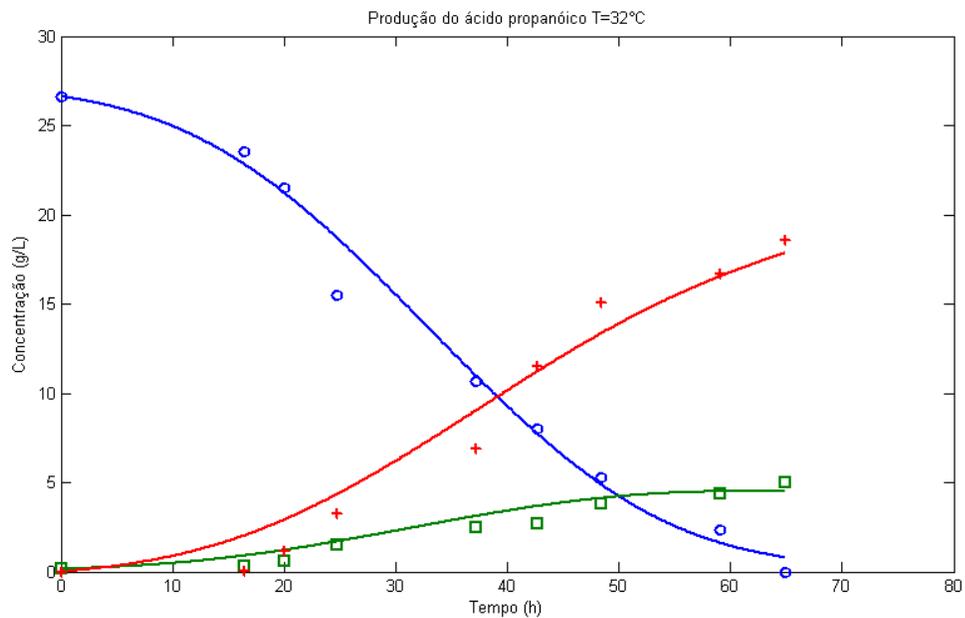
O modelo matemático, para representar os ensaios experimentais, consiste no sistema de equações (2.9, 2.10, 2.11 e 2.12). O ajuste de parâmetros foi realizado através da otimização por algoritmo genético e posterior simulação para cada temperatura dos ensaios experimentais, na qual permitiu obter perfis de concentração de glicerol, biomassa e ácido propanóico apresentado nas Figuras 4.6 a 4.12 que visam um bom ajuste aos dados experimentais, os quais foram obtidos quando a função objetivo apresentada pela equação 3.1 foi minimizada.



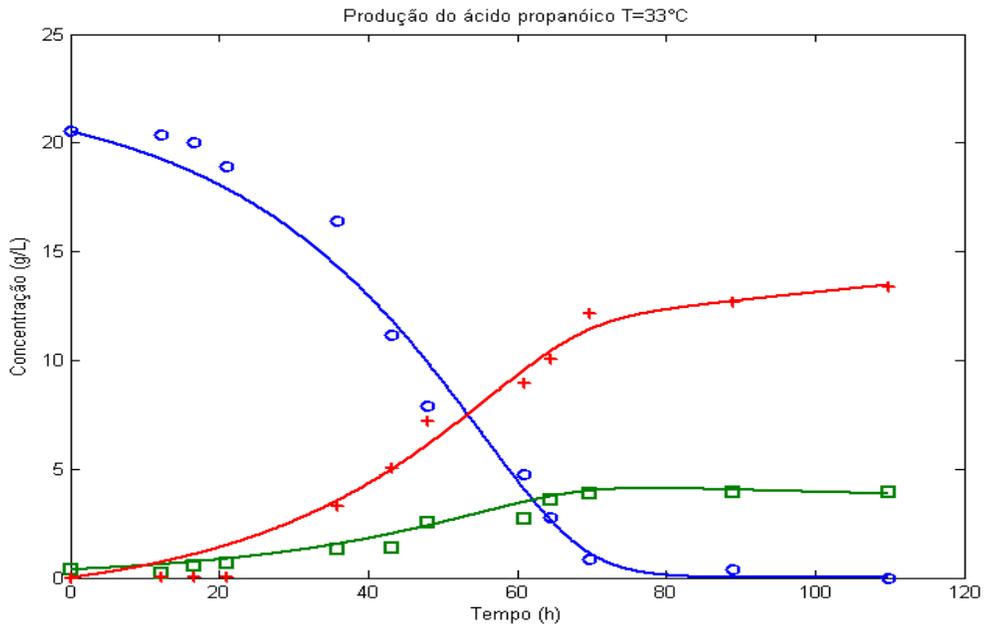
**Figura 4.6** - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 30 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



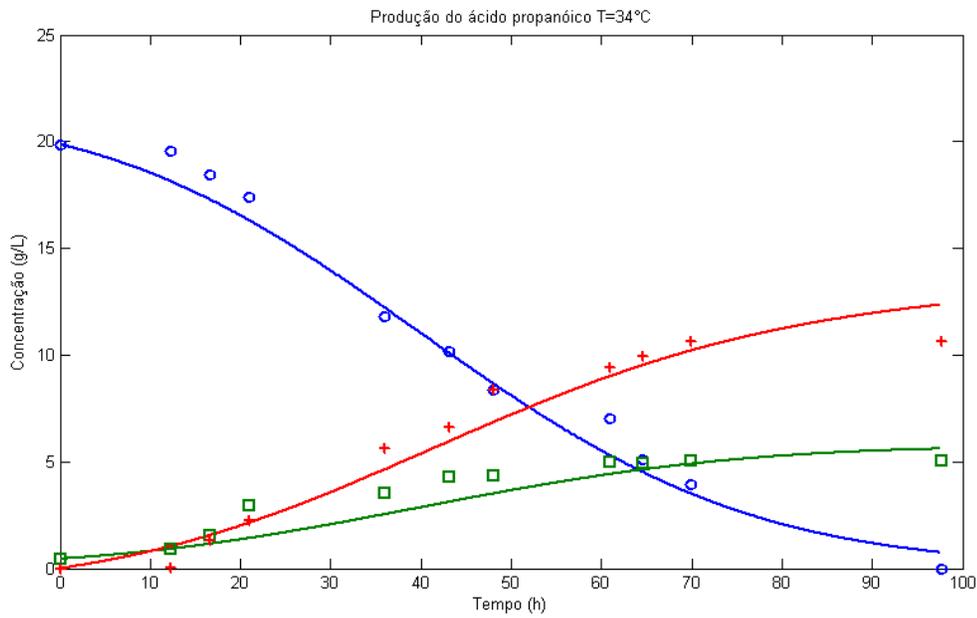
**Figura 4.7** - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 31 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



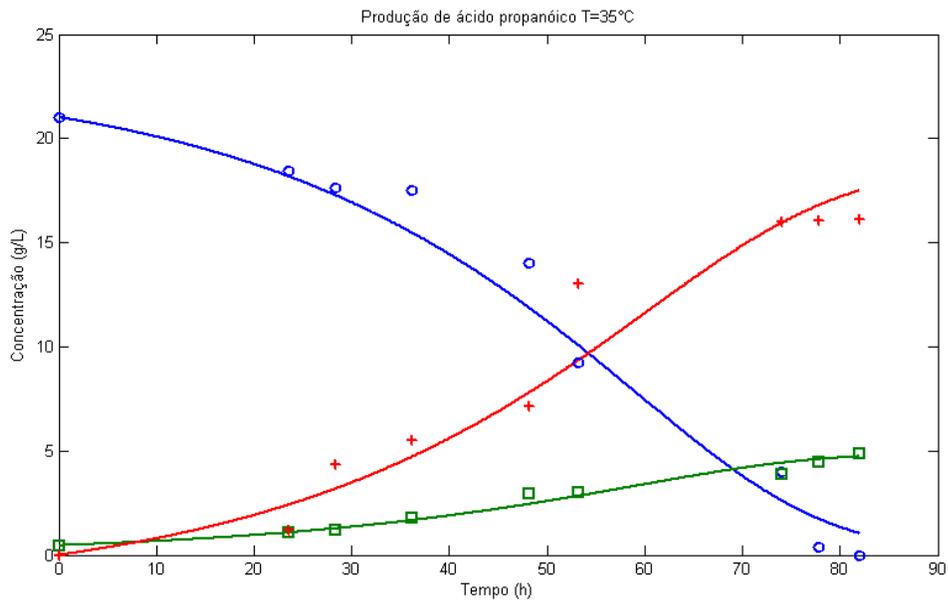
**Figura 4.8** - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 32 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



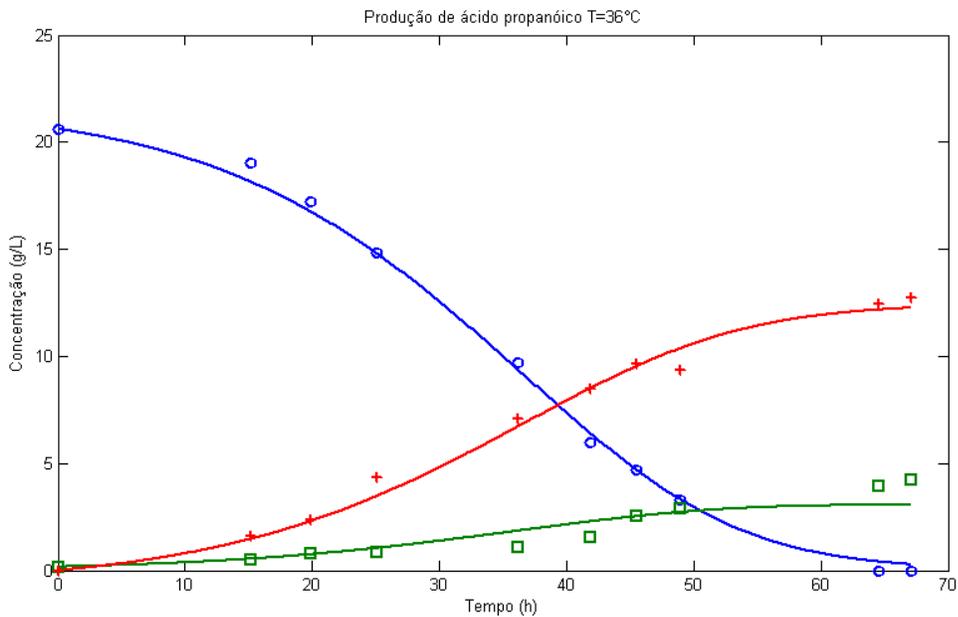
**Figura 4.9** - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 33 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



**Figura 4.10** - Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 34 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



**Figura 4.11** Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 35 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).



**Figura 4.12** – Perfis de concentração da fermentação propiônica na temperatura de 36 °C para os dados experimentais do glicerol (o), biomassa (□) e ácido propanóico (+), e para os dados da simulação (-).

Os resultados dos parâmetros cinéticos para os ensaios realizados em diferentes temperaturas encontram-se na Tabela 4.14.

**Tabela 4.14** – Parâmetros cinéticos otimizados por algoritmo genético para o estudo da temperatura.

Parâmetros	Temperatura (°C)						
	30	31	32	33	34	35	36
$y_{x/s}$	0,3067	0,1192	0,2105	0,2021	0,2021	0,2238	0,1565
$y_{p1/s}$	0,6113	0,4911	0,4699	0,5314	0,5846	0,8027	0,5959
$k_{II}$	2344,5299	25,4012	6,3497	322,5619	7,8946	1308,9607	17,8819
$k_s$	18,0412	2,4235	6,6479	4,2230	13,3225	7,2040	8,8213
$u_{Smax}$	0,4112	0,5589	0,7739	0,2576	0,3873	0,2270	0,7671
$m_x$	0,0029	0,0036	0,0322	0,0114	0,0012	0,0048	0,0172
$m_p$	0,0007	0,0145	0,0355	0,0089	0,0036	0,0079	0,0013

Os desvios do modelo em relação aos dados experimentais estão apresentados na Tabela 4.15.

**Tabela 4.15** – Desvio padrão residual.

RSD(%)	Temperatura dos ensaios (°C)						
	30	31	32	33	34	35	36
<b>X</b>	29,44	25,15	40,52	16,64	30,98	13,49	19,78
<b>S</b>	9,78	2,13	8,68	20,26	14,74	12,20	7,55
<b>P</b>	29,99	15,04	36,43	30,80	31,00	16,62	9,45

Através dos resultados apresentados na Tabela 4.15 é observada uma maior percentagem de desvio padrão relativo para a concentração microbiana, a qual foi inferior a 41%, quando comparada com o desvio para a concentração do substrato que foi inferior a 21%, e o desvio da concentração microbiana que foi inferior de 31%.

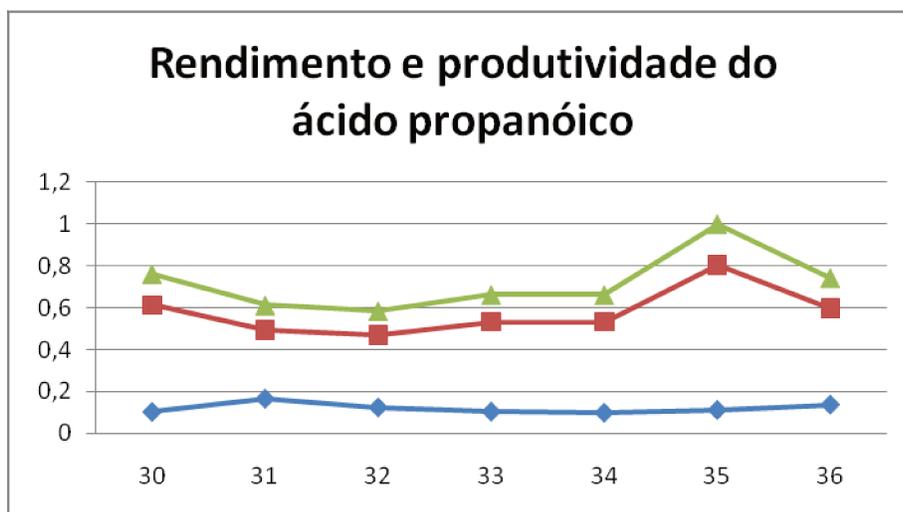
Os resultados da simulação para o estudo da temperatura na concentração de substrato inicial de 20 g/L e concentração microbiana inicial de 0,15 g/L estão apresentados na Tabela 4.16.

**Tabela 4.16** – Estudo das variáveis de processo na fermentação propiônica através da variação da temperatura.

	Temperatura (°C)						
	30	31	32	33	34	35	36
$X^f$ (kgm <sup>-3</sup> )	6,46	2,69	4,52	4,35	2,18	4,79	3,44
$P_1^f$ (kgm <sup>-3</sup> )	12,24	9,84	9,41	10,64	10,63	16,07	11,94
$y_{x/s}$ (g/g)	0,32	0,13	0,22	0,21	0,10	0,24	0,17
$y_{p1/s}$ (g/g)	0,61	0,49	0,47	0,53	0,53	0,80	0,60

Para a temperatura de 35 °C o rendimento tornou-se elevado em virtude ao aumento de células e a alta concentração de produto com uma baixa inibição. O aumento no rendimento na temperatura de 35 °C, em relação à temperatura de 30 °C deve-se a inibição do produto ser menor, e ser destinada a formação de produto ao invés de ser destinada as funções das células e ao crescimento microbiano.

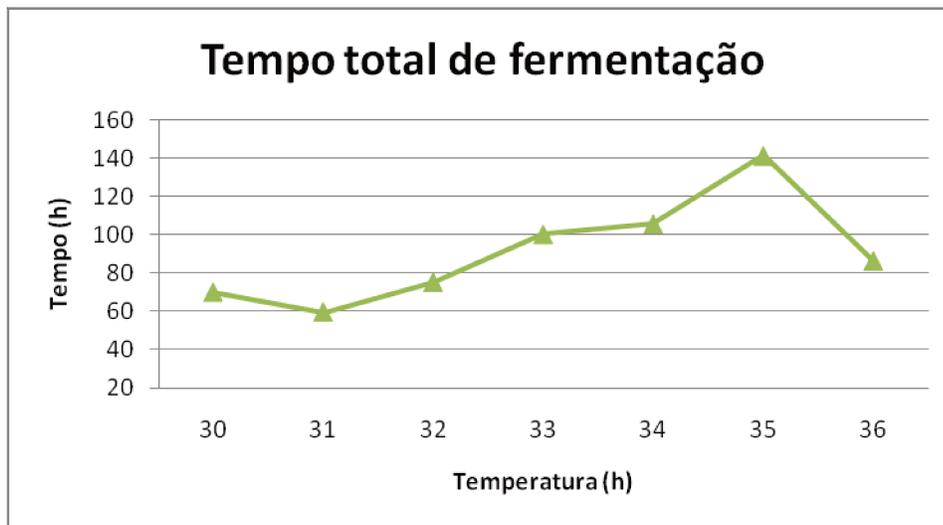
Dentre as temperaturas estudadas, a temperatura de 35 °C foi a que apresentou uma melhor resposta o qual pode ser verificado através dos rendimentos apresentado na Figura 4.13.



**Figura 4.13** – Rendimento em mmol do produto para cada 100 mmol de substrato consumido (Δ); rendimento mássico de produto produzido por substrato consumido (□), e produtividade (◇) dos dados simulados da produção do ácido propanóico em função da temperatura para uma concentração inicial de substrato de 20 g/L e uma concentração inicial microbiana de 0,15 g/L.

Mediante a Figura 4.15, pode ser verificada uma produtividade máxima de 0,17 (g/L.h), realizada no ensaio a temperatura de 30 °C e um rendimento máximo na temperatura de 35°C de 0,99 (mmol/100mmol) e 0,80 (g/g).

A Figura 4.14 apresenta o tempo total de fermentação considerando os 7 modelos do estudo da temperatura.



**Figura 4.14** – Esboço da influência da temperatura no tempo total da fermentação propiônica para as condições de  $S_0 = 20$  g/L e  $X_0 = 0,15$  g/L.

O tempo total de fermentação aumenta com o aumento da temperatura em virtude das células levarem um tempo maior para consumir o substrato. Para baixas temperaturas como a inibição é maior e o consumo é acelerado do substrato, devido ao substrato ser limitante e controlado pela formação de produto inibitório, o tempo de fermentação do processo é menor e pode ser verificado pela alta produtividade em baixas temperaturas.

### 4.3. Otimização do substrato e da biomassa para um processo em batelada

#### 4.3.1 Dados cinéticos da literatura

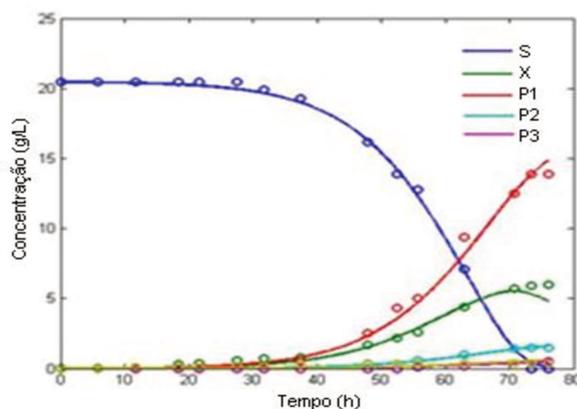
Foi realizada a simulação de um processo em batelada com o glicerol como substrato, usando o modelo matemático de Coelho *et al* (2010) e os dados experimentais de Barbirato (1997).

Dessa forma, com o objetivo de otimizar as concentrações de biomassa e de glicerol, os parâmetros cinéticos do modelo em batelada foram otimizados utilizando a equação 2.8. Os valores dos parâmetros estão apresentados na Tabela 4.17.

**Tabela 4.17-** Parâmetros cinéticos otimizados por GA à 30°C, 20g/L de glicerol e pH 6,8.

PARÂMETROS	VALOR
$Y_{P1/S}$	3,22658
$Y_{P2/S}$	25,7969
$Y_{P3/S}$	100
$K_{i1}$	20
$K_{i2}$	10,0002
$K_s$	1,34415
$r_{smax}$	0,308119
$m_s$	0,0923154
$Y_{X/S}$	0,555392
$m_1$	0,0672786
$m_2$	0,00643806
$m_3$	0,00327443

A Figura 4.15 apresenta os perfis de concentração para os dados experimentais e os simulados.



**Figura 4.15** – Perfis de concentração para o processo em batelada para os dados da simulação (—) e para os dados experimentais (o).

Pode-se observar que o modelo com os 12 parâmetros cinéticos ajustados representaram bem os dados experimentais para o substrato, biomassa e produtos.

Assim, com os parâmetros cinéticos do modelo, foram realizadas simulações para otimização mediante ao planejamento composto central. Para o delineamento do estudo do planejamento foi proposto um planejamento composto com 4 pontos axiais, e 1 ponto central perfazendo um total de 10 simulações. Foram consideradas duas variáveis de estudo, a saber: substrato e biomassa, e a resposta de interesse foi a produtividade de ácido propanóico.

As Tabelas 4.18 e 4.19 mostram os níveis utilizados no planejamento onde o nível (-1) representa o limite inferior e o nível (+1) representa o limite superior de cada variável. Para realizar o estudo estatístico foi utilizado o software STATISTIC 7.0.

**Tabela 4.18** - Parâmetros Operacionais analisados no planejamento composto central.

Parâmetros	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
S (g/L)	20	50	80
X (g/L)	0, 1	0,2	0, 3

**Tabela 4.19** - Matriz de planejamento composto central da produção do ácido propanóico.

Ensaio	S	X
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,682	0
6	1,682	0
7	0	-1,682
8	0	1,682
9	0	0

A Tabela 4.20 apresenta os efeitos dos variáveis, substrato (S) e biomassa (X), e a Tabela 4.21 os resultados da ANOVA (análise de variância) sobre a produtividade de ácido propanóico.

**Tabela 4.20** – Efeito da concentração microbiana e do substrato na produtividade do ácido propanóico nas variáveis de processo.

	Efeitos	Desvios padrão	p	Coefficiente de regressão
Media	0,567	0,089	0,003	0,567
S <sub>(L)</sub>	0,027	0,063	0,687	0,014
*S <sub>(Q)</sub>	-0,416	0,104	0,016	-0,208
X <sub>(L)</sub>	0,056	0,063	0,421	0,028
X <sub>(Q)</sub>	-0,064	0,104	0,572	-0,032

\*Parâmetros significativos ( $p < \alpha; \alpha = 0,05$ ).

**Tabela 4.21** - ANOVA dos parâmetros operacionais sobre a produtividade de ácido propanóico.

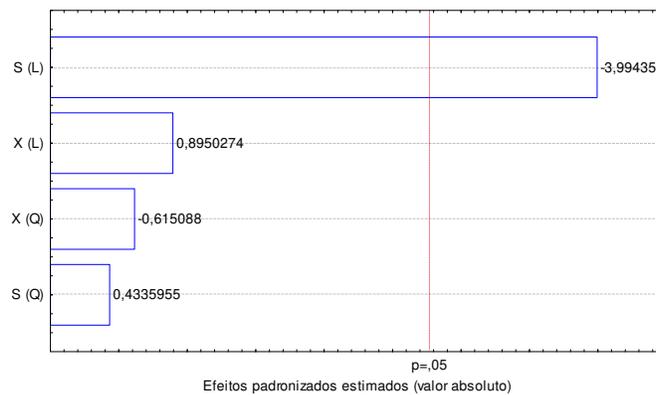
Fatores	SQ	GL	MQ	f	p
S <sub>(L)</sub>	0,0015	1	0,0015	0,1880	0,6869
*S <sub>(Q)</sub>	0,1257	1	0,1257	15,9548	0,0162
X <sub>(L)</sub>	0,0063	1	0,0063	0,80107	0,4213
X <sub>(Q)</sub>	0,0029	1	0,0029	0,3783	0,5718
Erro	0,0315	4	0,007875	6,8	
SQ <sub>R</sub>	0,2142	4	0,05355		
SQ <sub>T</sub>	0,2457	8	0,0307		
R <sup>2</sup>	0,8528				

\* Parâmetros significativos ( $p < \alpha; \alpha = 0,05$ ).

Através dos valores de "p" na Tabela 4.19, pode-se notar que a concentração de substrato tem influência significativa sobre a produtividade de ácido propanóico para um nível de confiança de 95%.

O valor de  $F_{\text{calculado}} = 6,8$  é maior do que o valor de  $F_{\text{tabelado}} (F_{4, 4} = 6,38)$  e possui um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) próximo de 1.

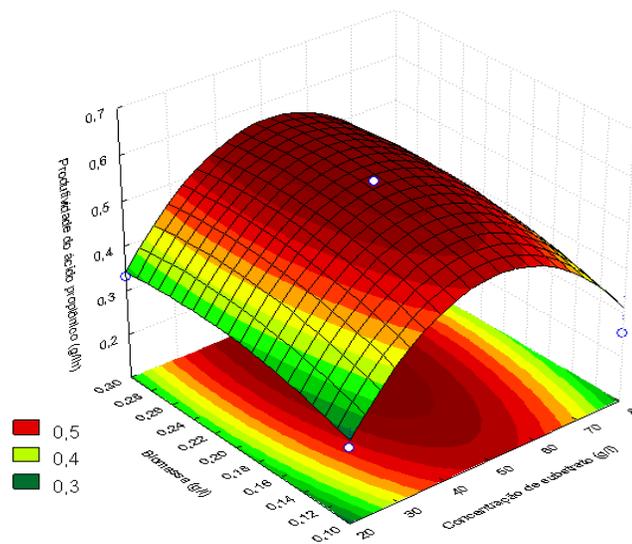
O diagrama de Pareto, mostrado na Figura 4.16, apresenta os efeitos estimados dos efeitos sobre a produtividade do ácido propanóico.



**Figura 4.16** - Diagrama de Pareto dos efeitos dos parâmetros operacionais sobre a produtividade do ácido propanóico.

Através da Figura 4.16 pode-se perceber que o parâmetro  $S_{(L)}$  exerce influência estatisticamente significativa sobre a produtividade do ácido propanóico, para um intervalo de confiança de 95%. O parâmetro significativo  $S_{(L)}$ , apresentou efeito negativo, ou seja, para que se consiga atingir a máxima produtividade do ácido propanóico, a concentração de substrato alimentadas no bioreator deverá ser mantida em seu valor mínimo (nível inferior).

A Figura 4.17 mostra a superfície de resposta da produtividade do ácido propanóico sobre a concentração microbiana e a concentração de substrato.



**Figura 4.17** - Superfície de resposta da produtividade do ácido propanóico.

A Figura 4.17 mostra que o aumento da concentração de ácido propanóico no processo de concentração de substrato tem de permanecer em valor intermediário e a concentração microbiana de 0,16 a 0,3 (g/L) torna-se desejável em temperatura de 30 °C e pH = 6,8, sendo apenas o substrato significativo sobre a produção de ácido propanóico, para um nível de confiança de 95%.

A função codificada representada pelo modelo quadrático é apresentada na equação 4.1.

$$P_{AP} = 0,57 - 0,21 S^2 \quad (\text{equação 4.1})$$

## CAPÍTULO V. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 Conclusões

O modelo que considera a inibição de produto e saturação de glicerol, representado por Aiba e Shoda (1969), foi capaz de representar com sucesso os dados experimentais para várias temperaturas e pHs.

Foi obtido um rendimento de substrato em ácido propanóico de 0,64 (g/g) para o pH = 7,0 e observado, que mesmo em baixas concentrações, o controle do pH na fermentação propiônica é importante e necessário para o processo, não tão somente para evitar a inibição por produto, quanto para aumentar o rendimento e a produtividade como consequência desse processo; além de propiciar um menor tempo de fermentação diminuindo custos de processo.

Para variações na temperatura de processo, foi possível verificar grandes variações nas constantes de inibição do produto e da constante de saturação do substrato. Nas temperaturas que foram obtidos os maiores rendimentos e produtividades, foram observados que para baixas temperaturas as células se destinam a formação de produto e ao crescimento celular, provocando uma maior inibição devido à alta concentração do produto. No caso, das altas temperaturas a inibição por produto é menor e, contudo, o rendimento do substrato em ácido propanóico é maior, atingindo para a temperatura de 35°C um rendimento de 0,95 (mmol/100mmol).

Dessa forma, com o objetivo de otimizar as concentrações de biomassa e de glicerol na obtenção durante a fase de inóculo do processo, foi obtido uma produtividade máxima de ácido propanóico de 0,7 (g/g), para uma temperatura de 30 °C e um pH de 6,8.

## **5.2 Sugestões para trabalhos futuros**

Em face dos trabalhos realizados as seguintes sugestões para a continuidade da pesquisa são:

Determinação das constantes da equação de Ahrenius, levando a um modelo mais generalizado, bem como, a otimização do processo com o objetivo de aumentar a produtividade do ácido propanóico, com variações no substrato e na biomassa.

Otimização das condições de operação, para um processo em batelada alimentada, os quais a taxa de diluição e tempo de fermentação estão inserido neste contexto.

Estudo do processo em batelada utilizando como substrato o subproduto do processo de produção de biodiesel, o glicerol, e comparar com o estudo realizado com o glicerol P.A.

Execução, através de processos viáveis, da separação e purificação do ácido propanóico.

## CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS

ABNT NBR 10520:2002 - Informação e documentação - Apresentação de citações em documentos.

ABNT NBR 14724:2005 - Informação e documentação — Trabalhos acadêmicos — Apresentação.

ABNT NBR 6023:2002 - Informação e documentação - Referências – Elaboração.

AIBA, S. Y SHODA, M. Reassessment of product inhibition in alcohol fermentation. *Journal Fermentation Technology*, 47, 790-794 (1969).

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica* 26: p.56-62, 2007.

ATALA, D.I.P., COSTA, A.C., MACIEL FILHO, R., MAUGERI FILHO, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. *Applied biochemistry and biotechnology*. v 91-93. p 353-364, 2001.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 47, 441-446, 1997.

BARROS NETO, B., SCARMINO, I. S., BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.

BERTLEFF, W.; ROEPER, M.; SAVA, X. “*Carbonylation*” in *Ullmann’s Encyclopedia of Chemical Technology* Wiley-VCH: Weinheim, 2003. DOI: 10.1002/14356007.a05 217.

Disponível em: << <http://www.answers.com/topic/propionic-acid> >>. Acesso em 4 de Setembro de 2009.

BIZZARI, S. N. e BLAGOEV, M. “*Propionic Acid*,” CEH Marketing Research Report: *Chemical Economics Handbook*, SRI Consulting, p. 6, 14–16, 2007.

BLANCH, H. W., CLARK, D.S.; *Biochemical Engineering*, Ed. Marcel Dekker, Inc, 1997

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U.A. e SCHIMIDELL, W.; Fermentação semicontínua. In: *Biotechnologia Industrial*; v. 2; In:Edgarg Blucher Ltda, p. 522, 2001.

BOYAVAL, P.; CORRE, C. Production of propionic acid. *Lait*. 75:453-461, 1995.

BOYAVAL, P.; CORRE, C.; MADEC, M. Propionic acid production in a membrane bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 883-886, 1994. apud CORAL J. Propionic acid production by propionibacterium sp. Using low-cost carbon sources in submerged fermentation. Tese de mestrado. Biotechnologist and Bioprocess Engineering Division Federal University of Parana. p.3-5, 2008.

CARVALHO, J. C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: *Biotechnologia industrial* apud LIMA, U. A., BORZANI, W., AQUARONE,E., SCHMIDELL, W. 1a. ed. v. 2. Cap. 9. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

COÊLHO, D. G.; LUNELLI, B. H.; FILHO, R. M. Development of the mathematic model through design process kinetic and process simulation of propionic acid production from glycerol derivates of biodiesel. *32 symposium biotechnology. For fuels and chemicals*, Clearwater beach, Florida, 2010.

CORAL, J. Propionic acid production by propionibacterium sp. Using low-cost carbon sources in submerged fermentation. Tese de mestrado. *Biotechnologist and Bioprocess Engineering* Division Federal University of Parana. p.3-5, 2008.

CORAL, J.; ROCHA, R. A.; LIMA, M.A.; SCHEIDT, G.N.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, C.R.; *Propionic acid production by Propionibacterium acidipropionici in Nath fermentation XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos Natal/RN, 2009.*

COELHO, D. G.; LUNELLI, B. H.; FILHO, R. M. Development of a mathematical model through kinetic design and process simulation of the propionic acid production from glycerol derived of the biodiesel. *32Symposium Biotechnol. For Fuels and Chemicals/*, Clearwater Beach, Florida, 2010.

- FAIRBANKS, M. Glicerina. *Revista: Químicos e Derivados*. edição. 487, 2009.
- FILHO, F.F.C. *Algoritmos numéricos*. Rio de Janeiro: Ed. LCC, 2001.
- FIORUCCI, A.R.; SOARES, M.H.F.; CAVALHEIRO, E.T.G. Ácidos orgânicos dos primórdios da *Química Experimental à sua presença em nosso cotidiano*. Química nova na escola, 2002.
- FUKUDA, H.; KONDO, A. e NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 92, n.5, pp.405-416, 2001.
- GOSWANI, V.; SRIVASTAVA, A.K. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Journal Biochemical Engineering*. 4, p.121-128, 2000.
- GU, Z.; GLATZ, B.A.; GLATZ, C.E. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 22 p.13-18, 1998.
- HIMMELBLAU, D. M., EDGAR, T. F., LASDON, L. S. *Optimization of chemical process*. 2a. ed. New York: McGraw Hill, 2001.
- HIMMI, E.H.; BORIES. A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Effects of inoculants containing propionic bacteria on fermentation and aerobic and *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 53: 435-440, 2000.
- HSU, S-T.; YANG, S-T. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: Effects of pH. *Biotechnol. Bioeng*. 38:571-578, 1991.
- HUANG, Y.L.; W.U, Z.; ZHANG L.; CHEUNG, C.M.; YANG, S-T. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. *Bioresouce Technology* 82: p. 51-59, 2002.
- INTERNATIONAL CHEMICAL SAFETY CARDS: *Propionic acid*. USA, 1997. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0806.html>>. Acesso em: 10 Abril, 2010.
- JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 6ª ed. p. 132-137, 2005.

JOHNS, A.T. The Mechanism of Propionic Acid Formation by *Clostridium propionicum*.  
*Journal gen. Microbiol.* p 123-127, 1952.

KRISTIANSEN, B.; RATLEDGE, C. *Basic Biotechnology*. 2 ed. Cambridge University Press, 2001, p. 568.

KUMAR, S; BABU, B.V. *A brief review on propionic acid; a renewable energy source*. In: National Conference on Environmental Conservation. p.459-464, 2006

KUN, L. Y. *Microbial Biotechnology: Principles and applications*. Cap 1 *Screening for Microbial Products*. Kemin Industries (Asia) Pte Ltd, 12 Senoko Drive, Singapore 758200. p. 3-23, 2003

LEWIS, V. P.; YANG, S. Propionic acid fermentation by *propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 437-442, 1992A.

LEWIS, V. P.; YANG, S. A novel extractive fermentaion process for propionic acid production from whey lactose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 104-110, 1992b.

LIDE, D. R., *Handbook of Chemistry and Physics*, 87th ed., Taylor and Francis Group: Boca Raton, 2006;

LOPES, O.C. *Novos catalisadores para transesterificação de óleos vegetais*. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1983. 98p. Dissertação de mestrado, 1983.

MA F., CLEMENTS L.D E HANNA M. A., Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow, *In. Eng. Chem. Res.*, 3768-3771, 1998.

MARTINEZ-CAMPOS, R.;TORRE, M. *Production of propionate by fed-batch fermentation of Propionibacterium acidipropionici using mixed feed of lactate and glucose*. *Biotechnology Letters*. 24:427-431, 2002 apud CORAL J. Propionic acid production by *propionibacterium sp*. Using low-cost carbon sources in submerged fermentation. Tese de mestrado. *Biotechnologist and Bioprocess Engineering Division Federal University of Parana*. p.3-5, 2008.

MARVEL, C.S.; VIGNEAUD V. du (1943), " *$\alpha$ -bromo-Isovaleric acid*", Org. Synth. Vol. 2: 93. Disponível em: << <http://www.answers.com/topic/propionic-acid> >>. Acesso em 4 de Setembro de 2009.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. *Fontes de carbono na produção do ácido propanóico: glicerol, glicose, o sorbitol, e a xylose*. The biochemistry of silage. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340p.

MOLINA, M.; GIANNUZZI, L. Modelling of a aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid médium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International* 35: p.585-594, 2002.

MORRISON, L.R. *Glycerol*. In: Encyclopedia of Chemical Technology. New York; Wiley, pp 921-932, 1994.

MOTA, C. J.A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Glicerolquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Quim. Nova*, v. 32, n 3, 639-648, 2009

NAKANO, K.; KATAOKA, H.; MATSUMURA, M. High Density of *Propionibacterium freudenreichii* Coupled with Propionic Acid Removal System with Activated Charcoal. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. V.81, p. 37-41, 1996.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2002. 401p.  
Adicionar

PAIK H-D, GLATZ B.A. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: p.22-27, 1994.

PARENTE, E. J. S. *Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado*. Fortaleza: EUFC, 2003. Disponível em: <<http://www.xitizap.com/Livro-Biodiesel.pdf>>. Acesso em: 14 março 2010.

- PERRY, R.H.; GREEN, D. W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. 7<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill. London, UK, cap. 2-116, 1997.
- PIRT, S.J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. 1 ed. Nova York, A Halsted Press Book, John Wiley & Sons, 1975.
- PLAYNE, M. J., Propionic and Butyric Acids. In: *Moo-young, M. Comprehensive Biotechnology*. Great Britain:Pergamon Press, p. 731-759, 1985.
- QUESADA-CHANTO, A.; AFSCHAR, A.S.; WAGNER, F. Optimization of a Propionibacterium acidipropionici continuous culture utilizing sucrose. *Appl. Microbiol* 42: p.16-21, 1994.
- RAMSAY, J.A.; ALY HASSAN, M.C.; RAMSAY, B.A. Biological conversion of hemicelulose to propionic acid. *Enzime microb. Technol.*, v. 22, p 292-295.1998.
- RIVALDI, J.D.; SARROUB, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. *Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 37: p. 44-51. 2007/2008.
- RIVERA, E.C.; JUNIOR, F.F.; ATALA, D.I.P.; ANDRADE, R.R.; COSTA, A.C.; FILHO, R.M. Development and implementation of na automated monitoring system for improved bioethanol production. *Chemical Engineering*, v.18, 2009, p 451-456.
- ROUTH, J. I., EYMAN, E. P., BURTON, D. J. *A Brief Introduction to General, Organic and Biochemistry*. Saunders Golden Series, 1971
- SANTANA, G. C. S. *Simulação e análise de custos na produção de biodiesel a partir de óleos vegetais*. FEQ/UNICAMP. Campinas – SP. 2008. s/n. Tese de Doutorado
- SESHADRI, N.; MUKHOPADHYAY, S. N. Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocessing by Propionibacterium acidipropionici. *Journal Biotechnol.* 29, 321-328, 1993

SHULER, M.L., KARGI, F. *Bioprocess Engineering-Basic Concepts*, In: Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, p.479, 1992.

SILVA, N. L. *Otimização das variáveis de processo da transesterificação etanólise do óleo de mamona: produção de biodiesel*. FEQ/UNICAMP Campinas – SP. s/n. Dissertação de mestrado, 2008

SOLETTI, J. I. ; CARVALHO, S. H. V ; LOPES, A. C. O. ; COÊLHO, Dayana de Gusmão . *Estudo do processo de extração líquido-líquido, na purificação de ésteres etílico (biodiesel), obtidos a partir do óleo de mamona*. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química; IV Congresso Brasileiro de Termodinâmica aplicada. Recife-PE, 2008.

SOLICHEN, M.S.; BRIEN, D.O.; HAMMOND, E.G. GLATZ, C.E. Membrane-based extractive to produce propionic and acetic acids: Toxicity and mass transfer considerations. *Enzyme and Microbiol Technology* 17: p.23-31, 1995.

SUWANNAKHAM, S. *Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by propionibacterium acidipropionici*. Tese de doutorado. Univ. Estatal de Ohio, Columbus, USA, 2005.

TEO, A.Y.L.; TAN, H.M. apud KUN, LEE YUAN. *Microbial Biotechnology: Principles and applications*. Cap 1 Screening for Microbial Products. Kemin Industries (Asia) Pte Ltd, 12 Senoko Drive, Singapore 758200. p. 3-23, 2003.

VOIROL, A.J.; DURAND, I.; HILLION, G.; DELFORT, B.; MONTAGNE, X. Glycerin for new Biodiesel formulation. *Oil & Gas Science and Technology*. Vol.63, No 4. p 395-404, 2008

WANG, L.; ZHOU, Q.; LI, F.T. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. *Biomass and Bioenergy* 30 p.177-182, 2006.

WEE, Y-J.; KIM, J-N.; R, H-W. Biotechnological production of lactic acid and its Recent Applications. *Food Technology Biotechnology*. 44(2) p. 163-172, 2006.

WÓDSKI, R. NOMACZYK, J. KUJAWSKI, M. Separation of propionic and acetic acid by pertraction in a multimembrane hybrid system. *Separation and Purification Technology* 21 p. 39-54, 2000

WOOD, H. G.; STONE, R. W.; WERKMAN, C. H. The intermediate metabolism of propionic acid bacteria. *Journal Biochem.* 31(3), 349-359, 1937.

WOOD, H. G.; WERKMAN, C. H. The utilization of  $\text{CO}_2$  in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. *Journal Paper.* 48-53, 1938.

WOSKOW, S.A.; GLATZ, B.A. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation. *Appl. Environmental microb.* 57:2821-2828, 1991.

ZHANG, A.; YANG, S-T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineering *propionibacterium acidipropionici*. *Proc. Biochem.* 44(12): 1346-1351, 2009.

## ANEXOS

### ANEXO A: Curvas de calibração

Neste anexo são apresentadas as curvas de calibração utilizadas para a determinação das concentrações dos ácidos orgânicos e do glicerol através das concentrações dos padrões e das áreas do pico.

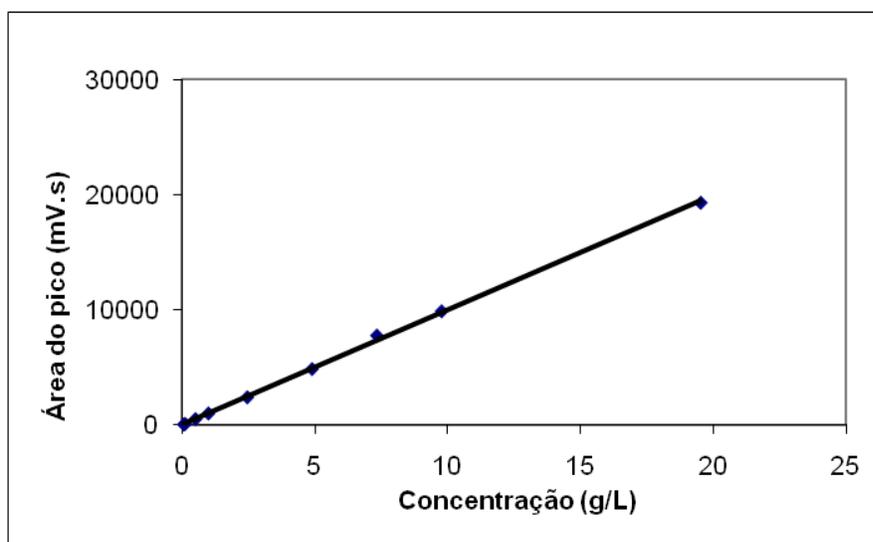
Em virtude da possibilidade de formação de alguns ácidos na fermentação propiônica além do ácido propanóico, foram realizadas as curvas de calibração para os possível formação dos ácidos.

#### A.1 Ácido succínico

$$\text{Equação : } y = 995,74x + 72,835$$

Onde,  $y$  = Concentração do ácido succínico e  $x$  = área do pico

$$R^2 = 0,9992$$



**Figura A.1** – Curva de calibração do ácido succínico.

### A.2 Ácido fórmico

Equação :  $y = 1558,2x + 167,84$ ;  $R^2 = 0,9989$

Onde,  $y$  = Concentração do ácido fórmico e  $x$  = área do pico

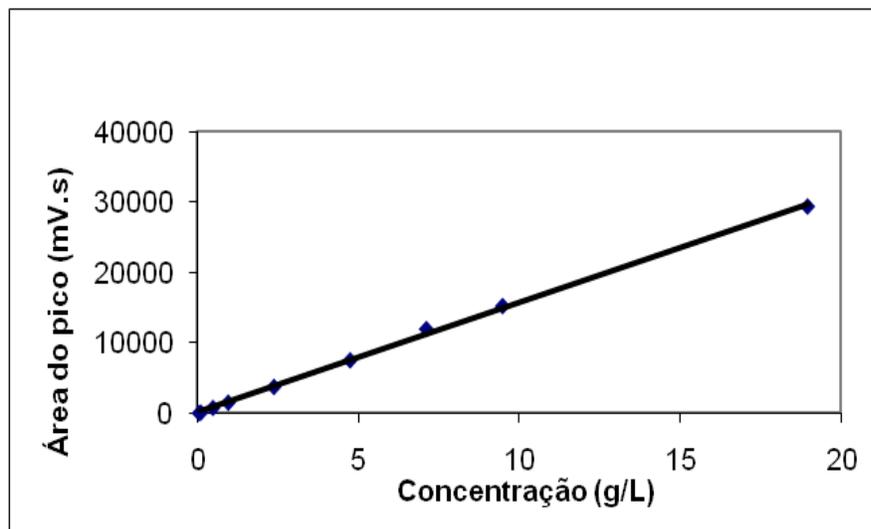


Figura A.2 – Curva de calibração do ácido fórmico.

### A.3 Ácido acético

Equação :  $y = 994,72x + 77,647$ ;  $R^2 = 0,9994$

Onde,  $y$  = Concentração do ácido acético e  $x$  = área do pico

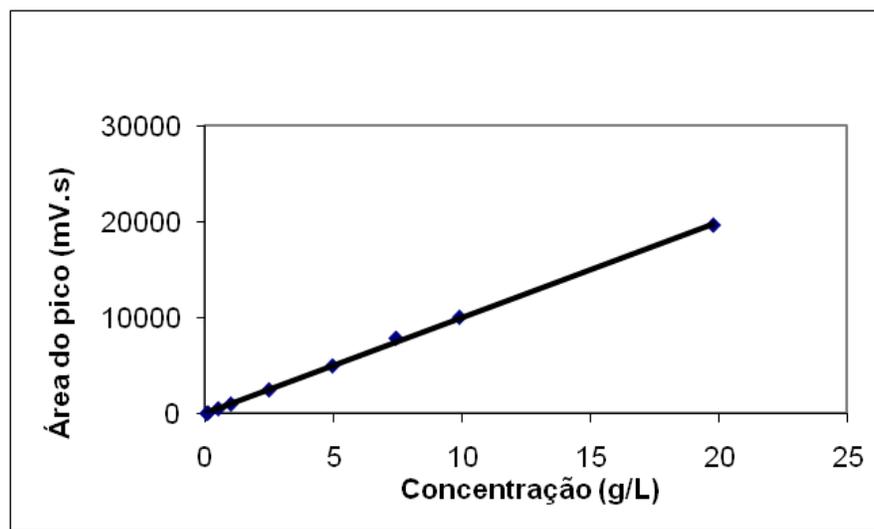


Figura A.3 – Curva de calibração do ácido acético.

#### A.4 Ácido propanóico

Equação :  $y = 951,42x + 62,613$ ;  $R^2 = 0,9993$

Onde,  $y$  = Concentração do ácido propanóico e  $x$  = área do pico

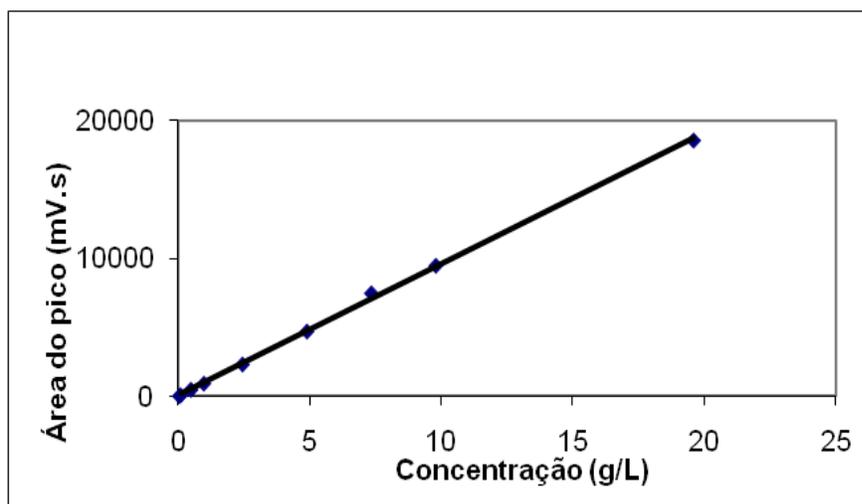


Figura A.4 – Curva de calibração do ácido propanóico.

#### A.5 Glicerol

Equação :  $y = 515,8x - 5,3827$ ;  $R^2 = 0,9999$

Onde,  $y$  = Concentração do glicerol e  $x$  = área do pico

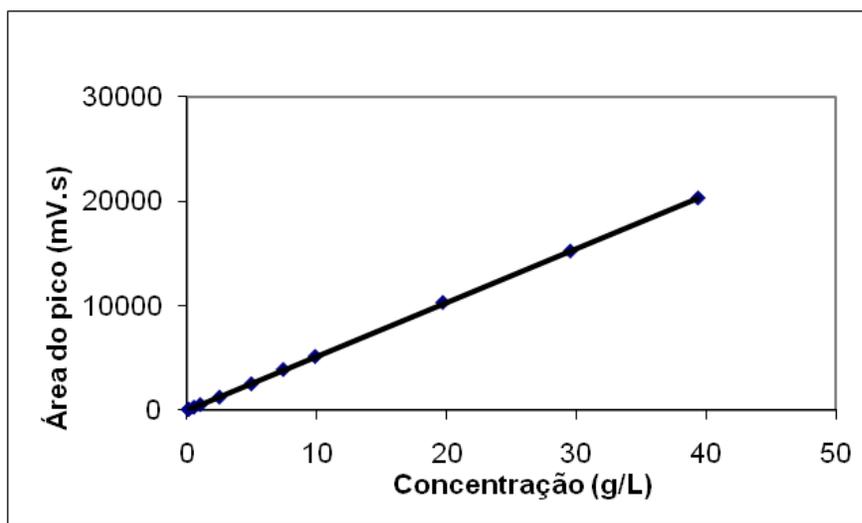
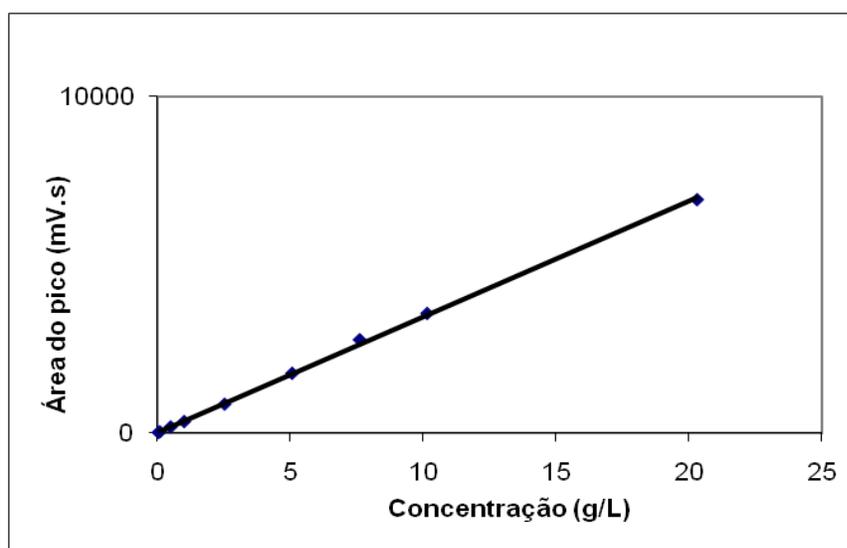


Figura A.5 – Curva de calibração do glicerol.

### A.6 n-propanol

Equação :  $y = 344,57x + 19,443$ ;  $R^2 = 0,9993$

Onde,  $y$  = Concentração do n-propanol e  $x$  = área do pico



**Figura A.6** – Curva de calibração do n-propanol.

Os tempos de retenção para detecção dos ácidos orgânicos e do glicerol no HPLC estão apresentados na Tabela A.1.

**Tabela A.1**– Tempos de retenção.

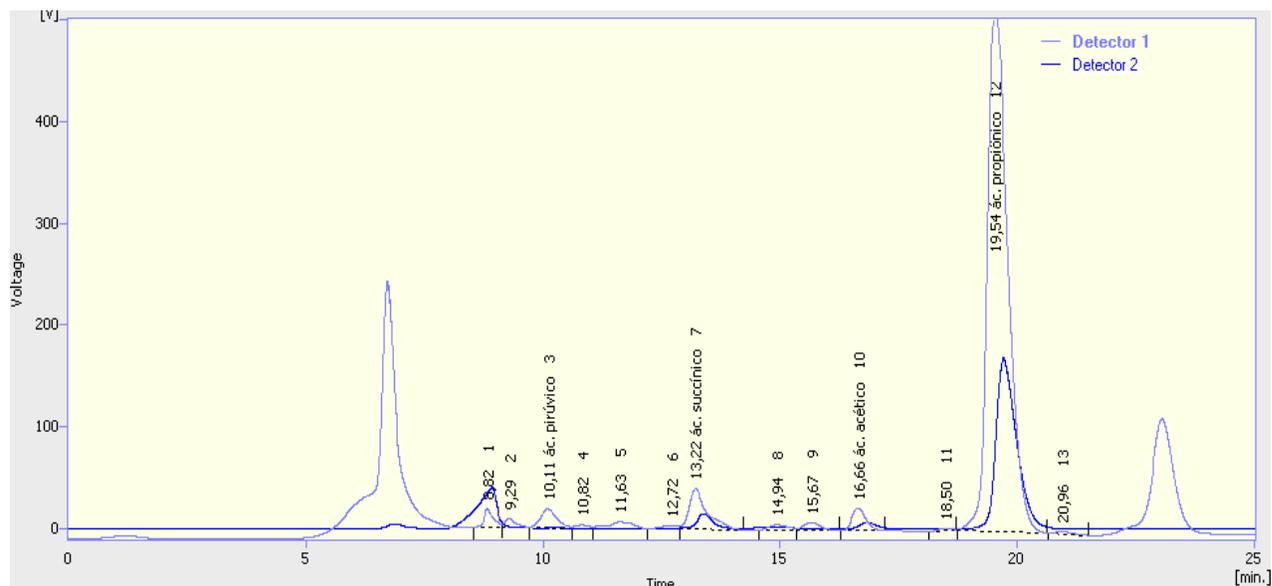
<b>Compostos</b>	<b>Tempos de retenção</b>
Ácido succínico (99%)	13,16
Glicerol (99%)	14,59
Ácido fórmico (98%)	15,26
Ácido acético (99,7%)	16,54
Ácido propanóico (99,5%)	19,44
Propanol (99,7%)	29,08

## ANEXO B: Quantificação dos ácidos e do glicerol através da Cromatografia Líquida de Alta Performance

Serão apresentadas as curvas cromatográficas do ponto cinético no tempo final da fermentação dos experimentos realizados.

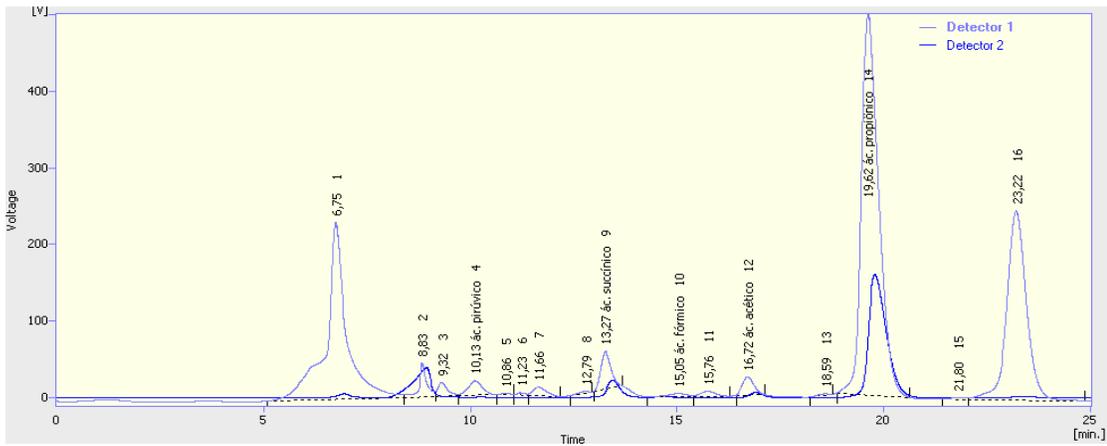
Onde, o detector 1 é o detector UV (ultravioleta) e o detector 2 é o RI (índice de refração).

### B.1 Curva cromatográfica para o pH 7,0



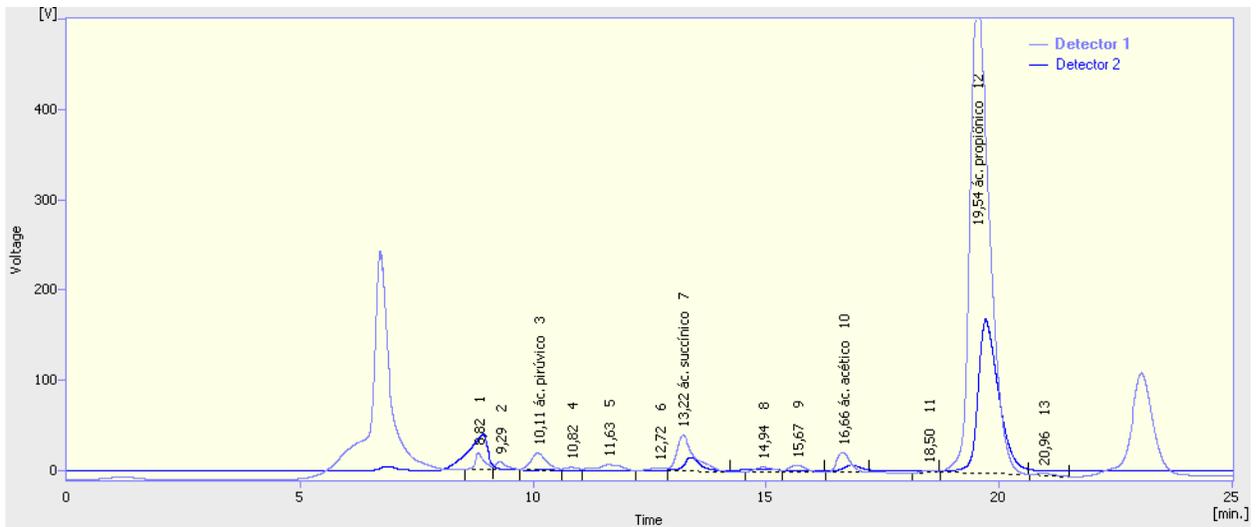
**Figura B.1** – Curva cromatográfica o pH 7,0 na temperatura de 30 °C para 93,98 h de fermentação.

### B.2 Curva cromatográfica para o ensaio sem o controle do pH



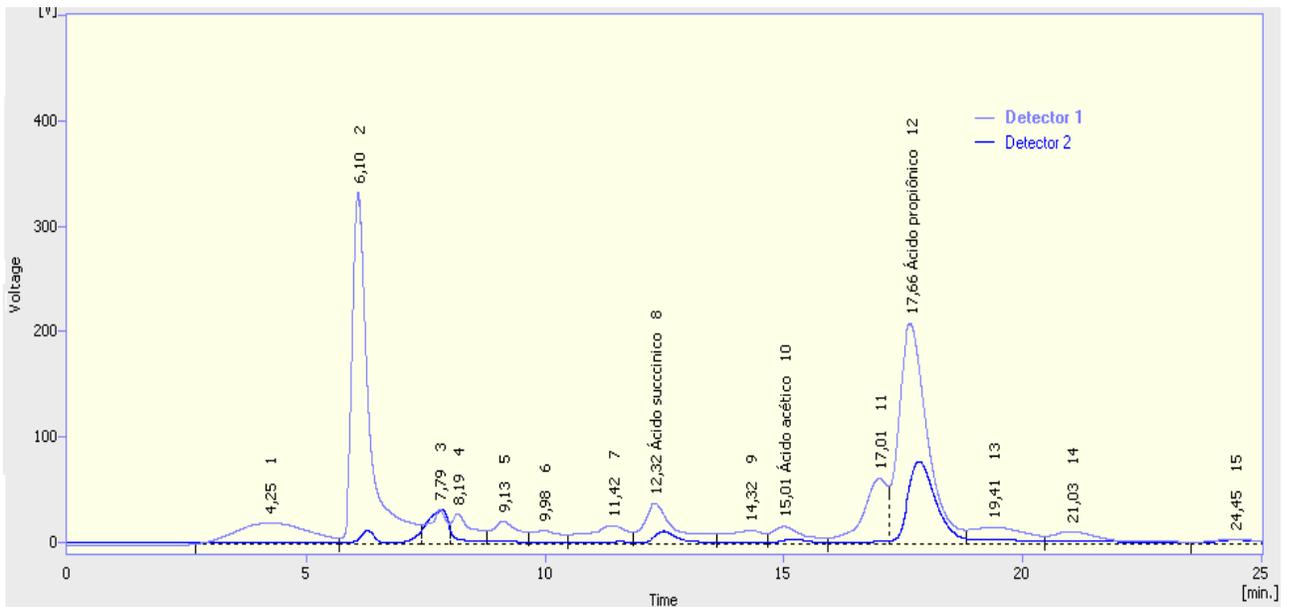
**Figura B.2** – Curva cromatográfica sem o controle do pH na temperatura de 30 °C para 115,3 h de fermentação.

### B.3 Curva cromatográfica para a temperatura de 30 °C



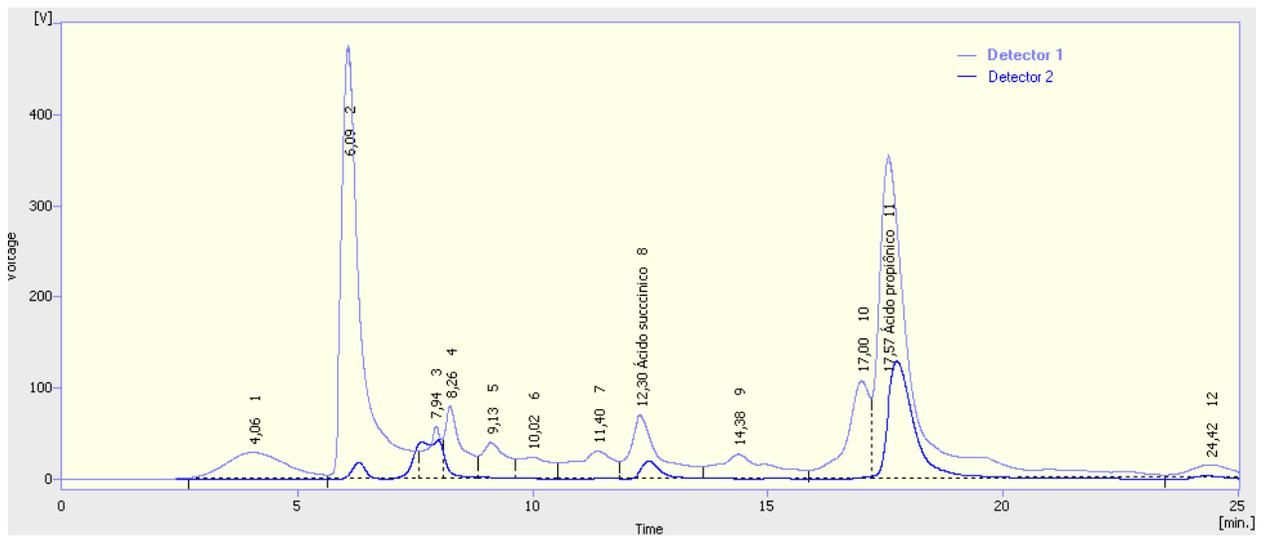
**Figura B.3** – Curva cromatográfica na temperatura de 30 °C e pH 6,0 para 109,12 h de fermentação.

*B.4 Curva cromatográfica para a temperatura de 31 °C*



**Figura B.4** – Curva cromatográfica na temperatura de 31 °C e pH 6,0 para 71,75 h de fermentação.

*B.5 Curva cromatográfica para a temperatura de 32 °C*



**Figura B.5** – Curva cromatográfica na temperatura de 32 °C e pH 6,0 para 64,90 h de fermentação.

### B.6 Curva cromatográfica para a temperatura de 33 °C

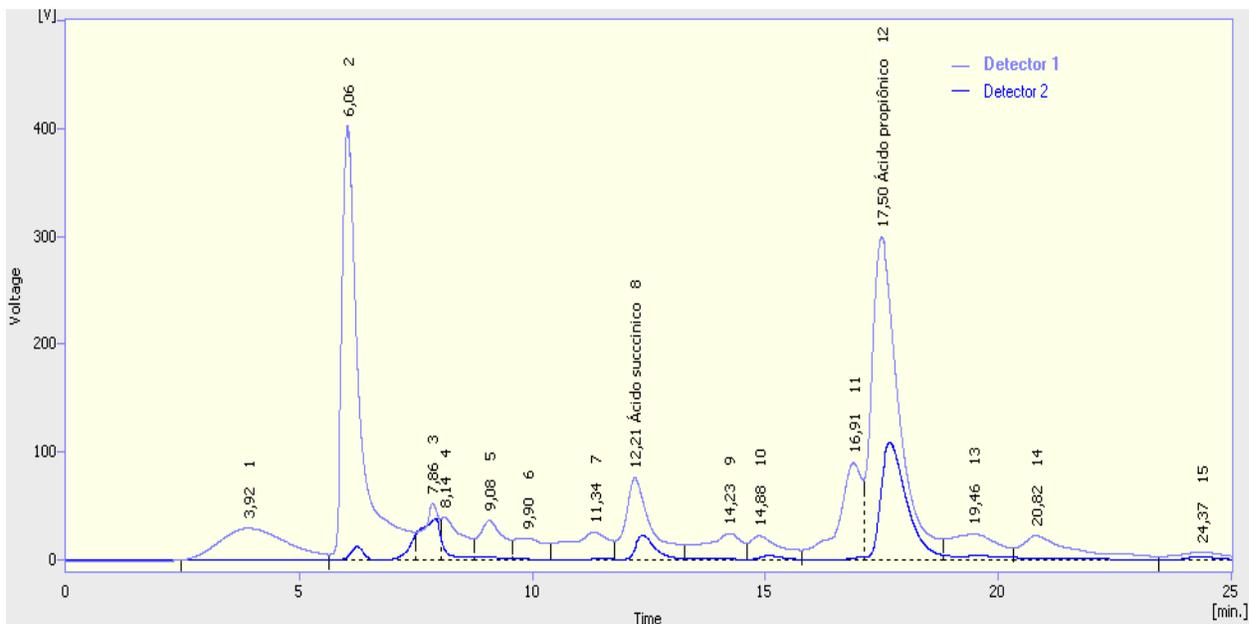


Figura B.6 – Curva cromatográfica na temperatura de 33 °C e pH 6,0 para 109,88 h de fermentação.

### B.7 Curva cromatográfica para a temperatura de 34 °C

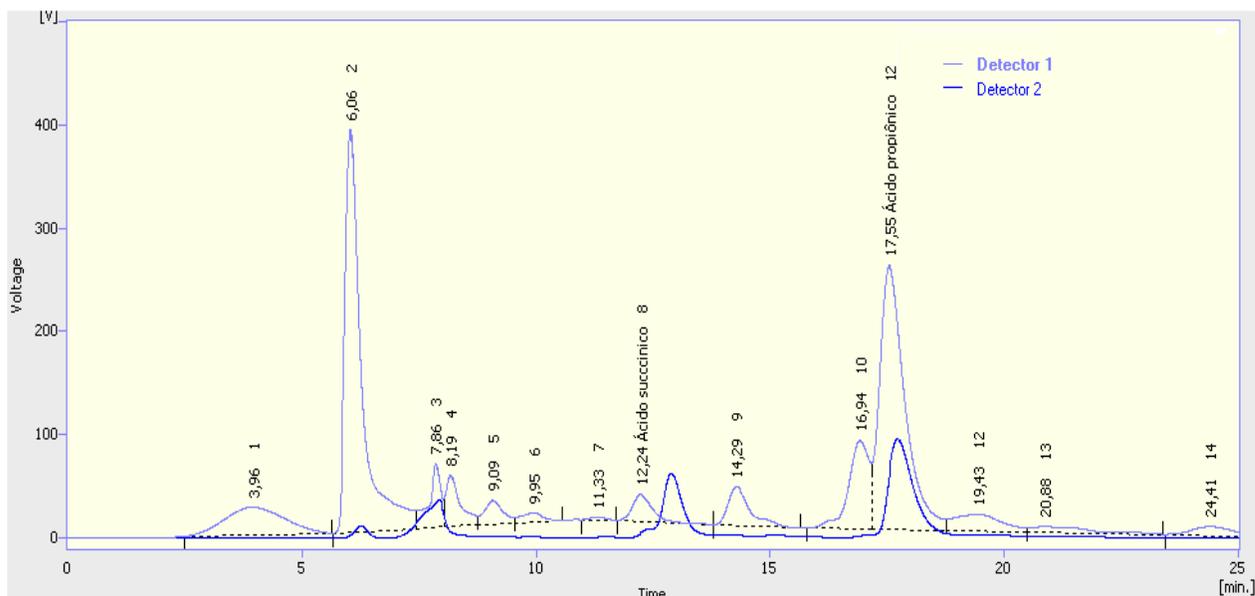


Figura B.7 – Curva cromatográfica na temperatura de 34 °C e pH 6,0 para 97,63 h de fermentação.

B.8 Curva cromatográfica para a temperatura de 35 °C

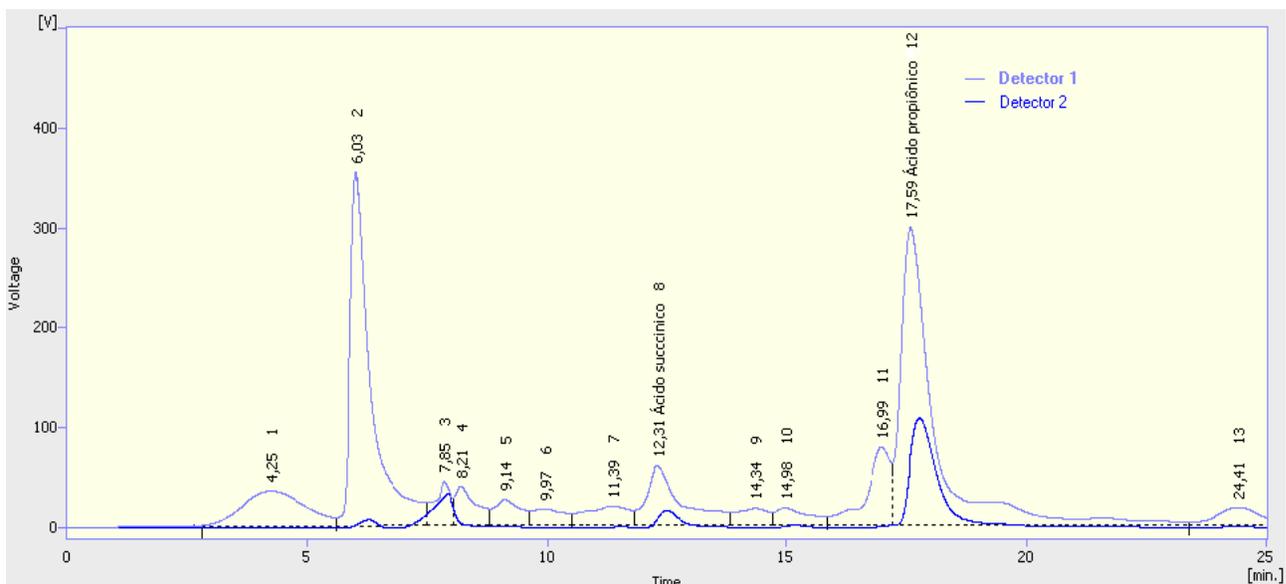


Figura B.8 – Curva cromatográfica na temperatura de 35 °C e pH 6,0 para 82 h de fermentação.

B.9 Curva cromatográfica para a temperatura de 36 °C

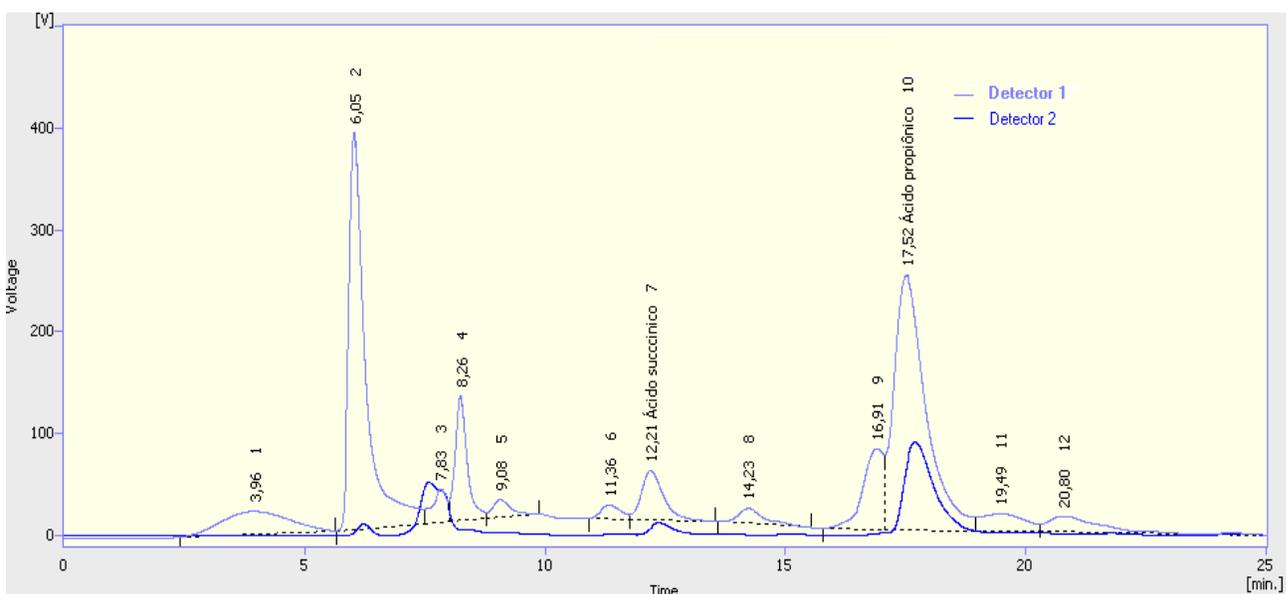


Figura B.9 – Curva cromatográfica na temperatura de 36 °C e pH 6,0 para 67,10 h de fermentação.