



BRUNA TORRES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO USANDO
ÁCIDO LÁCTICO FERMENTADO DOS AÇÚCARES DA
CANA-DE-AÇÚCAR**

CAMPINAS
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS E
PRODUTOS

BRUNA TORRES DA SILVA

Produção de Ácido Propiônico usando Ácido Láctico Fermentado dos Açúcares
da Cana-de-Açúcar

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade
de Engenharia Química como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em
Engenharia Química.

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida pela aluna Bruna
Torres da Silva, orientada pela professora
Dra. Maria Regina Wolf Maciel.

Assinatura da Orientadora



Prof. Dra. Maria Regina Wolf Maciel

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Si38p Silva, Bruna Torres da, 1987-
Produção de ácido propiônico usando ácido láctico fermentado dos açúcares da cana-de-açúcar / Bruna Torres da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Regina Wolf Maciel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ácido láctico. 2. Ácido propiônico. 3. Fermentação. 4. Biotecnologia. 5. Processos - Fermentação. I. Maciel, Maria Regina Wolf, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Propionic acid production using lactic acid fermentated from sugars of sugar cane

Palavras-chave em inglês:

Lactic acid
Propionic acid
Fermentation
Biotechnology
Process - Fermentation

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Regina Wolf Maciel [Orientador]
Betânia Hoss Lunelli
Elenise de Banwart Moraes Torres

Data de defesa: 31-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

Aprovado em 31 de outubro de 2013.



Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel



Dra. Betânia Hoss Lunelli



Dra. Elenise Bannwart de Moraes Torres

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo realizado para avaliar a viabilidade da produção de dois ácidos por uma metodologia nova e livre de sínteses químicas. Para a produção do ácido láctico, analisou-se o comportamento de três cepas bacterianas diferentes na fermentação do melaço de cana-de-açúcar: *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*. Foram realizados estudos em *shaker*, para simular o comportamento desses microrganismos frente a diferentes condições de temperatura (de acordo com cada bactéria), de concentrações de sacarose (15 g/L, 25 g/L e 35 g/L, aproximadamente) e de extrato de levedura (2 g/L, 4g/L e 6 g/L). Posteriormente, as melhores condições obtidas para cada bactéria foram reproduzidas em fermentador de grande volume, com controle de pH para avaliar a viabilidade do processo. A segunda etapa consistiu na aplicação do ácido láctico, obtido via fermentação, como substrato para a produção do ácido propiônico pela bactéria *Propionibacterium acidipropionici*. A manutenção da cepa e a preparação do pré-inóculo foram constituídos de lactato de sódio, em concentrações progressivas, até que a mesma estivesse pronta para ser inserida no meio de fermentação. Por ser um microrganismo anaeróbio, foi utilizada a alimentação de N₂ ao reator, previamente ao início do processo, para manutenção da vida da cepa durante o processo, que contou com controle de pH, agitação e, conseqüentemente, taxa de formação de O₂ durante o processo. Todas as amostras retiradas durante os processos foram quantificadas com relação aos açúcares e aos ácidos em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

PALAVRAS-CHAVE: ácido láctico, ácido propiônico, fermentação, biotecnologia, processos – fermentação.

ABSTRACT

This paper describes the study conducted to evaluate the feasibility of production of two acids by a new methodology free of chemical syntheses. For the production of lactic acid, the behavior of three different bacterial strains in the fermentation of sugar cane molasses were analyzed: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. Shaker studies were performed to simulate the behavior of these microorganisms to different temperature conditions (in accordance with each bacterium), and concentrations of sucrose (15 g/L 25 g/L and 35 g/L, approximately), and yeast extract (2 g/L, 4g/L and 6 g/L). Subsequently, the best conditions obtained for each bacterium were reproduced in large volume fermenter with pH control to assess the viability of the process. The second step consisted of the application of lactic acid obtained through fermentation, as a substrate for the production of propionic acid by the bacterium *Propionibacterium acidipropionici*. The maintenance of strains and the preparation of the pre-inoculum consisted of sodium lactate at progressive concentrations until it was ready to be inserted into the fermentation medium. Being an anaerobic microorganism, it was used to feed the reactor N₂, prior to the start of the process, to maintain the life of the strain during the process, which had control of pH, agitation and the consequent rate of formation of O₂ during the process. All samples taken during the process were quantified with respect to sugars and acids in high performance liquid chromatography (HPLC).

KEYWORDS: lactic acid, propionic acid, fermentation, biotechnology, process – fermentation.

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I</i>	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	4
<i>CAPÍTULO II</i>	5
<i>Revisão Bibliográfica</i>	5
2.1. CANA-DE-AÇÚCAR	5
2.2. ÁCIDO LÁCTICO	7
2.2.1. Produção do ácido láctico	9
2.2.2. Bactérias LAB	10
2.2.2.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	11
2.2.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	12
2.2.2.3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	12
2.2.3. Aplicações do ácido láctico e consumo mundial	13
2.3. ÁCIDO PROPIÔNICO	14
2.3.1. Produção do ácido propiônico.....	15
2.3.2. Bactérias do ácido propiônico	16
2.3.3. Aplicações do ácido propiônico e consumo mundial.....	18
2.4. Acompanhamento das fermentações – definição de concentração, rendimento e produtividade.....	21
2.4.1. Concentração	21
2.4.2. Rendimento	21
2.4.3. Produtividade.....	22
<i>CAPÍTULO III</i>	23
<i>Produção do ácido láctico</i>	23

3.1. FONTE DE CARBONO.....	23
3.2. SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS	23
3.3. CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	23
3.4. ESTUDOS EM <i>SHAKER</i>	25
3.5. FERMENTAÇÃO EM REATOR	25
3.6. METODOLOGIA ANALÍTICA	27
3.7. RESULTADOS	27
3.7.1. Resultados das fermentações em <i>shaker</i>	27
3.7.1.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	28
3.7.1.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	28
3.7.1.3. <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
3.7.2. Resultados da fermentação em reator.....	31
3.7.2.1. Perfil da concentração pela bactéria <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	34
3.7.2.2. Perfil da concentração pela bactéria <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	35
3.7.2.3. Perfil da concentração pela bactéria <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
CAPÍTULO IV	39
<i>Produção do ácido propiônico</i>	39
3.1. FONTE DE CARBONO.....	39
3.2. MICRORGANISMO	39
3.3. CULTIVO E MANUTENÇÃO DA CEPA	39
3.4. FERMENTAÇÃO EM REATOR	41
3.5. METODOLOGIA ANALÍTICA	42
3.6. RESULTADOS	43
CAPÍTULO V	47
<i>Conclusões e sugestões para trabalhos futuros</i>	47

5.1. CONCLUSÕES	47
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	48
<i>Referências Bibliográficas</i>	49
ANEXOS	56
ANEXO I – RÓTULO PARA IDENTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS ORIGINADOS DURANTE O TRABALHO	57
ANEXO II – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS AÇÚCARES E ÁCIDO LÁCTICO	58
ANEXO III – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDOS LÁCTICO E PROPIONICO	60
PUBLICAÇÕES.....	61

*Aos maiores presentes de Deus em minha vida:
Sandra, Reinaldo, Lucas, Ana Paula,
Helena (in memoriam) e Josefina, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho, para que pela arte dos encontros, me proporcionasse a concretização do meu sonho de ser mestra.

À minha família, agradeço com todo meu amor incondicional e imensurável. Pessoas maravilhosas que sempre apoiaram todos os meus sonhos e que, nos momentos de aperto e saudade, estavam ao meu lado e enxugaram minhas lágrimas, independente da distância.

À professora Maria Regina que desde meu primeiro dia na Unicamp já me acolheu em sua equipe, me orientou, me aconselhou e dirigiu meus passos até a conclusão do trabalho. Meu imenso agradecimento principalmente nesses últimos meses.

Ao professor Rubens pelo apoio e dedicação na ajuda com minhas dúvidas.

Ao John, pela ajuda com a produção do ácido láctico e divisão dos trabalhos durante essa etapa.

À Betânia, por toda ajuda nos momentos que precisei, pela divisão de experiências e dicas durante o desenvolvimento do trabalho.

À Dayana, que em todos os momentos dividiu comigo suas experiências relacionadas a produção do ácido propiônico, desde o entendimento do acompanhamento do cultivo da bactéria, até a discussão dos resultados.

Às minhas amadas amigas de casa, Luizinha, Mariana, Juliana, Nathália, Alliny, Bárbara e Aline pela convivência diária, pelo carinho e pelos 2 anos e meio de muitas risadas.

Aos amigos de Assis, que vieram para Unicamp e aqui pudemos continuar nossa convivência e manter nossa amizade. Obrigada por todos os momentos em que vocês sempre estiveram (e ainda estão) presentes.

À todos os amigos que conheci aqui e que contribuíram muito para o desenvolvimento do projeto, principalmente ao pessoal do LOPCA/Bioen.

À Braskem e à Fapesp pelo apoio financeiro, projeto PITE/FAPESP – nº 2008/03694-5.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Conversão do lactato a propionato (Adaptado de Rehm e Reed, 1981).	3
Figura 2.1. Melaço de cana-de-açúcar.....	6
Figura 2.2. Isômeros do ácido láctico.....	8
Figura 2.3. Obtenção do ácido láctico via síntese química (Adaptado de Bermúdez, 2013). ..	9
Figura 2.4. Consumo mundial de ácido láctico, seus sais e ésteres em 2012 (Adaptado de IHS Chemical, 2013).	14
Figura 2.5. Rota de obtenção do sal do ácido propiônico a partir do ácido acrílico (Adaptado de Tholozan <i>et al.</i> , 1992).	17
Figura 2.6. Rota dos ácidos dicarboxílicos até obtenção do propionato (Adaptado de Coral <i>et al.</i> , 2008).	17
Figura 2.7. Consumo mundial de ácido propiônico em 2012 (Adaptado de IHS Chemical, 2013).	19
Figura 3.1. Esquema geral para preparo do inóculo para ensaios de fermentação em <i>shaker</i> .	24
Figura 3.2. Fermentador usado na produção do ácido láctico.	26
Figura 3.3. Tempo de fermentação versus funcionamento da bomba de base para <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	32
Figura 3.4. Tempo de fermentação versus funcionamento da bomba de base para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	33
Figura 3.5. Tempo de fermentação versus funcionamento da bomba de base para <i>Lactobacillus plantarum</i>	33
Figura 3.6. Perfil da fermentação do melaço pela cepa <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	34
Figura 3.7. Perfil da fermentação do melaço pela cepa <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	36
Figura 3.8. Perfil da fermentação do melaço pela cepa <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
Figura 4.1. Comportamentos da degradação do substrato e da formação do produto, obtidos na primeira fermentação do ácido propiônico.	44
Figura 4.2. Comportamentos da degradação do substrato e da formação do produto, obtidos na segunda fermentação do ácido propiônico.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição geral do melaço de cana-de-açúcar utilizado no desenvolvimento do projeto.....	7
Tabela 2.2. Propriedades dos isômeros do ácido láctico (Lunelli, 2010).....	7
Tabela 2.3. Utilização de fontes renováveis para produção do ácido láctico.	10
Tabela 2.4. Estudos desenvolvidos para produção de ácido propiônico via fermentação.....	20
Tabela 3.1. Composição do meio MRS.....	24
Tabela 3.2. Temperaturas estudadas para cada bactéria.	25
Tabela 3.3. Concentrações de sacarose e de extrato de levedura.	25
Tabela 3.4. Resultados das fermentações em <i>shaker</i> para <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	28
Tabela 3.5. Resultados das fermentações em <i>shaker</i> para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	29
Tabela 3.6. Resultados das fermentações em <i>shaker</i> para a bactéria <i>Lactobacillus plantarum</i>	30
Tabela 3.7. Concentrações de ácido láctico para diferentes concentrações de extrato de levedura.	31
Tabela 3.8. Dados obtidos nas fermentações realizadas.....	38
Tabela 4.1. Composição do meio ágar de reativação.	40
Tabela 4.2. Composição do meio de ativação (Coral <i>et al.</i> , 2008).....	40
Tabela 4.3. Resultados da fermentação para produção do ácido propiônico.	43

NOMENCLATURA

NAD: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio oxidada

NADH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio reduzida

ATP: Adenosina trifosfato

ADP: Adenosina difosfato

LDH: Lactato desidrogenase

PLA: polímero de ácido láctico

FAT: Fundação André Tosello

C= concentração (g/L)

m = massa (g)

v = volume (litros)

P = concentração de produto no fermentador (g/L)

S = concentração de substrato residual no fermentador (g/L)

S_m = concentração de substrato no mosto de alimentação (g/L)

t = tempo (h)

V = volume de meio no fermentador (fase sólida + fase líquida) (L)

X = concentração celular no fermentador (g de matéria seca/L)

Y_{P/S} = rendimento do produto em relação ao substrato consumido (g de produto formado/ g de substrato consumido)

Q_v = produtividade volumétrica (g/L.h)

t_r = tempo de reação (h)

CAPÍTULO I

Introdução

Os produtos químicos usualmente aplicados nas indústrias têm origem, na maioria das vezes, na síntese química de fontes fósseis. Entretanto, com o esgotamento dessas matérias-primas e devido ao fato de que essas reações geram produtos não amigáveis ao meio ambiente, o uso de fontes renováveis tem chamado a atenção de muitos pesquisadores.

O processo chamado de “química verde” que tem como principal ideia a aplicação de recursos biodegradáveis e tem como maior vantagem o uso de diferentes rotas metabólicas de microrganismos durante a geração dos produtos. Isso possibilita a descoberta de novos processos de alto valor agregado, sem a geração de produtos tóxicos e sem fazer uso de fontes esgotáveis.

Somado ao fato de se usar matéria-prima renovável, é importante estudar as melhores metodologias a serem aplicadas, durante a produção, para que se otimize o bom emprego desse material, acoplado à processos que evitem agressões ao meio ambiente. Esse fator foi de extrema importância durante a realização da presente dissertação, já que a produção do produto de interesse, ácido propiônico, foi realizada em sua totalidade por rotas biotecnológicas, a partir de um resíduo agroindustrial, o melaço da cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar, uma rica fonte de carboidratos, é uma das plantas de maior interesse no Brasil, já que o país lidera a produção mundial, por ser uma matéria-prima com grande capacidade fotossintética e, por isso, grande fonte de energia renovável. A partir dos anos 70, a indústria de açúcar e álcool no país passou por uma notável transformação, que deixou de ter o foco voltado apenas para o setor de alimentos para se destinar também ao energético (Waak e Neves, 1998). A elevada capacidade de fotossíntese dessa planta também colabora para uma redução do efeito estufa, já que há uma grande fixação de CO₂ (Almazan *et al.*, 1998).

A composição da cana-de-açúcar varia de 50 a 60% de açúcares redutores totais e, disso, 70 a 91% é sacarose (James, 2004). Entretanto, quase todo o interesse no uso dessa planta é voltado para as produções de açúcar, álcool e seus subprodutos no Brasil.

A indústria de açúcar produz, como resíduo, o melaço da cana-de-açúcar durante sua fabricação, que é composto por aproximadamente 50% de sacarose não cristalizada, além de outros açúcares redutores, vitaminas e componentes nitrogenados (Zhang *et al.*, 2012). Por isso, é estudado como fonte direta de fermentação para geração de bioetanol e de alguns compostos químicos, como o ácido láctico, produto intermediário de interesse na realização desse projeto.

O ácido láctico é um ácido carboxílico muito importante na indústria por ser de versátil aplicação, rentabilidade e renovável. É usado na fabricação de alimentos, com uma demanda de, aproximadamente, 85%, sendo o restante distribuído em outros tipos de indústrias. Nos últimos anos, tem ganhado espaço na produção de produtos biodegradáveis, principalmente na preparação de polímeros para uso médico, como suturas, próteses e medicamentos controlados (Rojan *et al.*, 2009).

Quando o ácido láctico sofre reação de redução, à elevada temperatura, ele pode dar origem ao ácido propiônico, que é amplamente usado na indústria de conservantes, como inibidor do crescimento celular. Justamente por essa característica, outro interesse no estudo da obtenção de ácido propiônico, via fermentativa, consiste em propor estratégias que consigam amenizar a limitação da conversão, causada pela inibição da reação pelo aumento da concentração do produto principal no meio, que se reflete em baixas concentrações finais desse ácido. Com baixo rendimento final, os custos na etapa de purificação se elevam o que torna o processo de fermentação incapaz de competir com a síntese química.

A Figura 1.1 apresenta a rota metabólica de formação do propionato a partir do lactato, que se forma no lugar dos respectivos ácidos porque há adição de base ao meio fermentativo, durante o processo, para manutenção bacteriana.

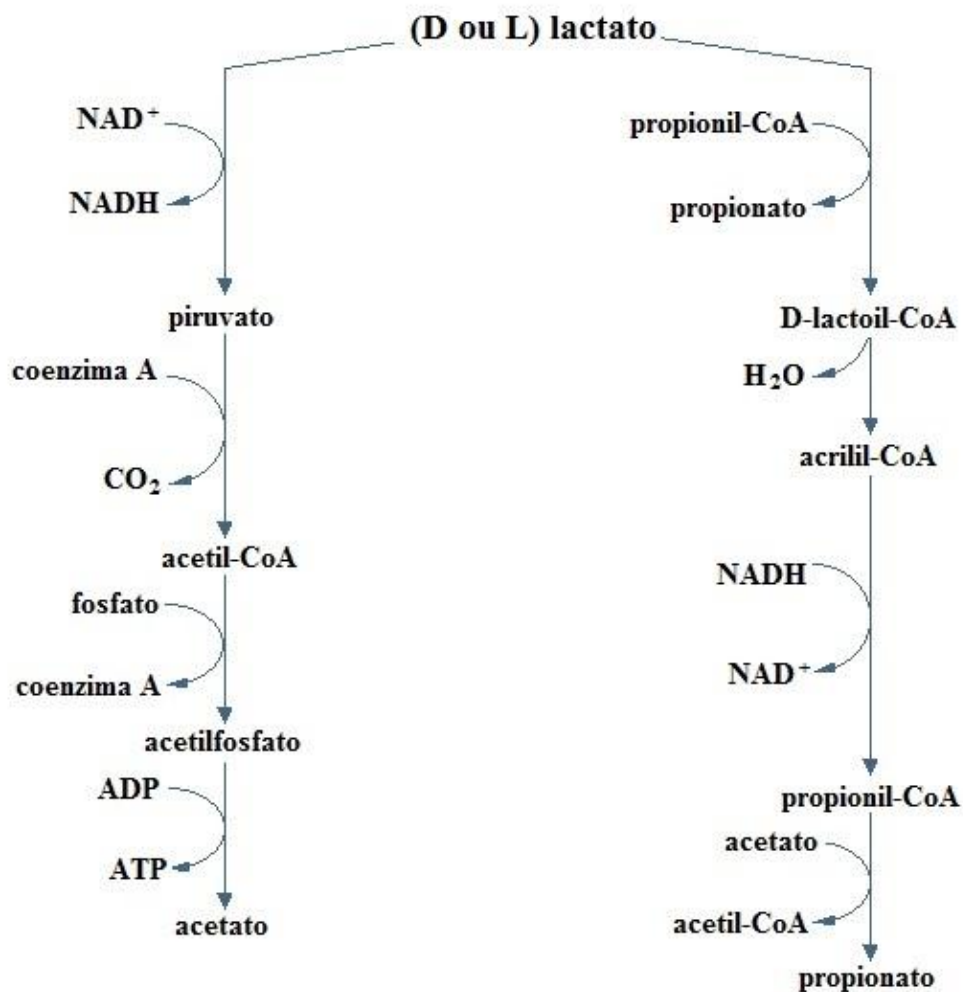


Figura 1.1. Conversão do lactato a propionato (Adaptado de Rehm e Reed, 1981).

Assim, a motivação do trabalho se baseou na ideia de desenvolver um processo alternativo e ecologicamente viável para obtenção do ácido propiônico, usando como substrato o ácido láctico produzido pela fermentação de açúcares presentes no melaço da cana-de-açúcar.

1.1. OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi a produção de ácido propiônico a partir da fermentação de ácido láctico, obtido a partir de açúcares derivados da cana-de-açúcar. Assim, para atender todo o processo, os objetivos específicos traçados foram:

a-) Avaliação de três cepas microbianas para a produção de ácido láctico.

b-) Otimização das condições do processo, com estudos em *shaker*.

c-) Produção do ácido láctico.

d-) Produção do ácido propiônico a partir da fermentação do ácido láctico fermentado.

1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Essa dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos, sendo o Capítulo I destinado à introdução, para breve descrição dos tópicos relacionados diretamente ao desenvolvimento desse trabalho e apresentação dos objetivos propostos.

O Capítulo II é composto da revisão bibliográfica dos assuntos de maior relevância para a realização do trabalho, como cana-de-açúcar, ácido láctico, ácido propiônico, produção de ambos os ácidos e microrganismos utilizados.

No Capítulo III, encontram-se todas as etapas de produção do ácido láctico. Assim, neste capítulo, é possível encontrar a descrição dos experimentos realizados com as 03 diferentes bactérias lácticas usadas, bem como testes iniciais, metodologia utilizada para análise das amostras das fermentações e os resultados obtidos para essa primeira etapa.

O Capítulo IV abrange todo o processo de obtenção do ácido propiônico, a partir da fermentação do ácido láctico. É apresentado e justificado o microrganismo aplicado, preparo do inóculo, composição do meio de fermentação, a metodologia analítica, os resultados e a determinação dos parâmetros de operação.

No último capítulo, V, serão apresentados os tópicos finais a serem considerados, como conclusões e contribuições deste trabalho e algumas sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica

O Capítulo II apresenta a revisão bibliográfica relacionada aos principais tópicos estudados durante o desenvolvimento da dissertação, tais como cana-de-açúcar, fermentação, ácido láctico, ácido propiônico, bactérias utilizadas, meios de cultivo, justificativa e interesse na geração dos produtos finais, pelos métodos usados. A maior parte do ácido láctico utilizado industrialmente provém da fermentação da glicose, em processo batelada e com baixo rendimento final. Um dos problemas na produção de ácido propiônico via fermentação é a inibição microbiana pelo produto de interesse. Todo o estudo feito, para ambos os ácidos, teve o intuito de aumentar a produtividade final, reduzir o tempo de fermentação e diminuir os problemas com inibição.

2.1. CANA-DE-AÇÚCAR

As primeiras mudas da planta chegaram ao Brasil, vindas de Portugal, em meados dos anos 1515, tendo o primeiro engenho de açúcar construído 17 anos depois, na capitania de São Vicente. Entretanto, em Pernambuco e na Bahia foram onde os engenhos se multiplicaram (James, 2004). No século seguinte, o país já se tornava o maior produtor e fornecedor de açúcar do mundo e, ainda hoje, ocupa a primeira posição no *ranking* mundial da cultura.

Com relação à produção mundial, os últimos dados da FAO (Food and Agriculture Organization) são de 2010 e demonstraram que o Brasil produziu 719.157.000 toneladas de cana-de-açúcar, seguido da Índia, com 277.750.000 toneladas produzidas. Isso mostra que o país está muito à frente na produção da planta.

Só no primeiro semestre de 2013, a Companhia Nacional do Abastecimento (Conab) registrou um montante de 588.915,700 mil toneladas de cana-de-açúcar moídas no Brasil, com o estado de São Paulo na liderança nacional, com 51,82%, que corresponde a 4.419,46 mil hectares, da área produtiva voltada para o cultivo da cana.

Os dados apresentados favorecem a situação do país, principalmente do estado paulista, frente às pesquisas em busca de rotas alternativas e sustentáveis de utilização dos subprodutos da planta.

Por ter uma elevada capacidade de acumular açúcares, os subprodutos da cana-de-açúcar são foco de muitas pesquisas relacionadas ao estudo de novas fontes de energia renovável. O interesse no desenvolvimento de metodologias alternativas está voltado, principalmente, à substituição: da matéria-prima, petroquímica no desenvolvimento de processos que reduzam o custo do etanol e na produção de compostos químicos por vias alternativas, como por exemplo, o ácido láctico.

Os subprodutos que podem ser extraídos da cana-de-açúcar são: caldo, melaço e bagaço, sendo que os dois últimos são resíduos, que se acumulam em grandes volumes, das usinas sucroalcooleiras. Assim, é importante ressaltar o valor agregado do produto final de interesse do desenvolvimento da presente dissertação, uma vez que a matéria-prima utilizada foi o melaço.

O melaço é uma massa viscosa de coloração marrom, conforme Figura 2.1, originada durante os processos de cristalização e decantação da fabricação de açúcar (Chauhan *et al.*, 2011). A sua importância como matéria-prima é cada dia maior na indústria, devido ao seu baixo custo e alto teor de açúcares e de minerais (Casetta *et al.*, 2007).



Figura 2.1. Melaço de cana-de-açúcar.

A matéria-prima não precisa de pré-tratamentos, já que a maior parte dos açúcares está em forma de sacarose, o que a torna um excelente substrato para processos fermentativos (Ghorbani *et al.*, 2011). Sua composição é apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Composição geral do melaço de cana-de-açúcar utilizado no desenvolvimento do projeto.

Açúcar	Porcentagem (%)
Sacarose	49
Glicose	5,6
Frutose	6
ART	60,6

2.2. ÁCIDO LÁCTICO

O ácido láctico é um ácido hidroxicarboxílico, de fórmula $\text{CH}_3\text{--CH(OH)--COOH}$ e foi, primeiramente, descrito por Carl Wilhelm Scheele em 1780. Scheele o considerou como sendo um componente do leite e, em 1857, Pasteur notou que o ácido não estava presente no leite, mas que era um metabólito gerado por alguns microrganismos durante a fermentação (Wee *et al.*, 2006).

Quando puro, se apresenta como sólido branco, mas é geralmente encontrado em soluções aquosas diluídas ou concentradas por ser difícil sua obtenção de outra forma. Portanto, sua densidade varia proporcionalmente à sua concentração na solução e de acordo com a temperatura. A Tabela 2.2 apresenta as características do ácido láctico.

Tabela 2.2. Propriedades dos isômeros do ácido láctico (Lunelli, 2010).

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

Está presente na natureza sob duas formas isoméricas: dextrogiro “D”(desviam a luz polarizada para a direita) ou levogiro “L” (desviam a luz polarizada para a esquerda), conforme Figura 2.2.

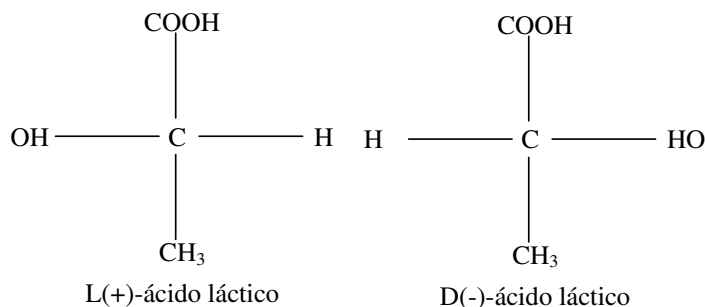


Figura 2.2. Isômeros do ácido láctico.

Os dois isômeros apresentam as mesmas propriedades físicas (ponto de fusão, solubilidade, densidade, constante de dissociação e outras) e as mesmas propriedades químicas, com exceção das reações em que outros compostos com atividade óptica estejam presentes. Uma consequência disso é a dificuldade em separá-los através das técnicas tradicionais (cromatografia, destilação e cristalização fracionada), sendo necessárias técnicas apropriadas de separação e uso de substâncias com atividade óptica (Martinez *et al.*, 2013).

As formas puras dos isômeros possuem maior valor agregado do que a mistura racêmica devido às aplicações industriais específicas para cada isômero, por exemplo, para a produção do ácido poli L-láctico, um polímero semicristalino biodegradável e termoestável, a forma levogira é a utilizada na síntese. Já para a produção do ácido poli D-láctico, a forma dextrogira é a utilizada.

Os isômeros se comportam de maneira diferente nos tecidos vivos, sendo o ácido láctico encontrado mais comumente nos seres vivos em sua forma levogira (L). No homem, por exemplo, somente a forma levogira é produzida na contração muscular (Trindade, 2002). Para aplicações em alimentos e na medicina, a forma levogira é preferida, pois a conversão metabólica no corpo humano é mais rápida do que a forma dextrogira. Além

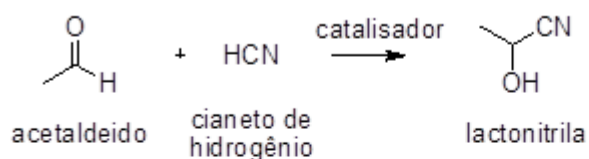
disso, recém-nascidos têm dificuldade em metabolizar tanto o isômero D quanto a mistura racêmica, o que impede as indústrias alimentícias de aplicar essas formas em alimentos para bebês com menos de 3 meses de idade (FAO, 1974).

Diferentes modos de produção fornecem quantidades diferentes de isômeros. Na produção do ácido láctico por síntese química, apenas a mistura racêmica é obtida e as concentrações dos isômeros são iguais, enquanto que a fermentação permite a obtenção de um dos isômeros em maior quantidade.

2.2.1. Produção do ácido láctico

Apesar de ter sido encontrado pela primeira vez como produto de metabolismo microbiano, o ácido láctico pode ser obtido também por síntese química, que é baseada na síntese de petroquímicos, originando a lactonitrila que, posteriormente, é hidrolisada por ácidos fortes, conforme Figura 2.3. Os métodos sintéticos de produção do ácido láctico são geralmente mais caros que os fermentativos. A vantagem competitiva do ácido láctico produzido por síntese química está nos menores custos de purificação necessários, entretanto, os custos de matéria prima são geralmente elevados (Capellari, 2010).

Formação da lactonitrila



Oxidação da lactonitrila para ácido láctico

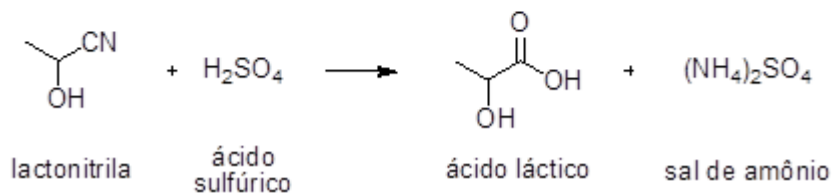


Figura 2.3. Obtenção do ácido láctico via síntese química (Adaptado de Bermúdez, 2013).

Ao contrário disso, a obtenção do ácido láctico por fermentação por microrganismos oferece vantagens como: utilização de carboidratos, que são fontes renováveis, baixa

temperatura de produção, baixo consumo de energia e a produção de um ácido láctico com alta pureza óptica, por seleção de uma cepa apropriada (Mohammed *et al.*, 2011).

A produção biotecnológica de ácido láctico tem sido reportada na literatura, conforme apresentado na Tabela 2.3, como extremamente interessante, do ponto de vista de que a fonte de carbono pode ser substituída de açúcares para materiais ricos em carboidratos que sejam resíduos agroindustriais. Vale ressaltar, entretanto, que somente materiais ligninocelulósicos devem passar por um pré-tratamento antes de irem para fermentação, devido à incapacidade dos microrganismos usarem diretamente esses materiais (Okano *et al.*, 2010).

Tabela 2.3. Utilização de fontes renováveis para produção do ácido láctico.

Autor	Microrganismo	Substrato	Produtividade (g/L.h)	Tipo
Adsulet <i>al.</i> (2007)	<i>L. delbrueckii</i>	celobiose e celotriose	2,3	L
Dumbrepatilet <i>al.</i> (2008)	<i>L. delbrueckii</i> mutante Uc-3	melaço de cana-de-açúcar	4,2	L
Guilherme <i>et al.</i> (2009)	<i>L. mesenteroides</i>	xarope de caju	2	D
Lunelli (2010)	<i>L. plantarum</i>	melaço de cana-de-açúcar	2,49	DL
Djukic'-Vukovic' <i>et al.</i> (2013)	<i>L. rhamnosus</i> (imobilizado)	vinhaça	1,62	L

De acordo com Aquarone (2001), o rendimento das fermentações industriais, para produção do ácido láctico é de 93 a 95%, quando a glicose é usada como substrato, e o rendimento da separação varia com a metodologia aplicada e o grau de pureza desejado. Muitos processos de separação do ácido láctico são estudados, porém o mais usado industrialmente é a precipitação e posterior filtração.

2.2.2. Bactérias LAB

As bactérias do ácido láctico (LAB) se caracterizam por serem gram-positivas, não esporogênicas (com exceção de gênero *Sporolactobacillus*), catalase negativas, não possuem citocromo, ar e ácido-tolerantes e que são capazes de produzir ácido láctico como principal metabólito. Na natureza, essas bactérias estão limitadas a crescerem em locais que sejam ricos em nutrientes, como: leite, carne, vegetais, algumas espécies vivem em plantas,

enquanto outras fazem parte do trato gastrointestinal de humanos e animais (Stoyanova, 2012).

Mayo *et al.* (2005) descrevem três possíveis rotas metabólicas para essas bactérias: A. Homofermentativa, B. Mista e C. Heterofermentativa, que podem acontecer por meio do metabolismo da glicose. Dessas rotas, as vias A e C são as mais conhecidas e aceitas para a produção de ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos. A primeira rota acontece quando são usadas bactérias do gênero *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e algumas *Lactobacillus*. Bactérias que tem como objetivo fermentar o monossacarídeo para piruvato por meio da rota Embden –Meyerhoff – Parnas (EMP), e logo, obter o ácido láctico por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH). Rota que pode dar lugar para a obtenção dos isômeros óticos, *L* e *D*, na etapa estero específica do NAD, o qual depende das enzimas *L*-LDH e *D*-LDH. Na rota heterofermentativa, tem-se como representantes: *Leuconostoc*, *Oenococcus* e algumas *Lactobacillus*, que fermentam açúcares em geral, pela via fosfocetolase (PKP). Nessa rota, as pentoses (xilose e ribose) são fermentadas para piruvato e acetil-P com posterior conversão em lactato e acetato, respectivamente. Além disso, na mesma rota heterofermentativa pode acontecer a fermentação de hexoses (glicose, frutose) para lactato, CO₂ e etanol, sendo o CO₂ produto de degradação na conversão de hexoses para pentoses.

As principais funções das bactérias do ácido láctico durante a fermentação podem ser classificadas como: enriquecimento da dieta (através do desenvolvimento de uma diversidade de sabores, aromas e texturas em alimentos); preservação de alimentos através do próprio ácido láctico, ácido acético, etanol e fermentações alcalinas; enriquecimento dos alimentos com substratos biológicos como proteínas, aminoácidos essenciais, ácidos graxos essenciais e vitaminas; desintoxicação durante o processamento de fermentação de alimentos; redução no tempo de cozimento (Lui e Zhou, 2011).

As LAB utilizadas no desenvolvimento do trabalho serão descritas a seguir.

2.2.2.1. *Lactobacillus delbrueckii*

Bactéria homofermentativa que consegue produzir ácido láctico com elevada pureza óptica, dependendo da condição de inóculo. A maioria dos trabalhos encontrados na

literatura, como Monteagudo *et al.* (1997), Kadam *et al.* (2006) e John & Nampoothiri (2008) estudaram o comportamento desta cepa na produção de L-ácido láctico e obtiveram purezas desse isômero de 95, 98 e 97%, respectivamente.

Em contrapartida, Zhang & Vadlani (2013) e Tanashiro (2011) obtiveram D-ácido láctico da mesma cepa, com purezas de 99,8 e 96%, respectivamente em seus estudos.

As principais diferenças observadas entre os grupos de pesquisadores acima citados foram o valor do pH de controle das fermentações e a temperatura. Nos estudos em que se produziu, quase que em sua totalidade, L-ácido láctico, o pH da fermentação foi controlado em 5, com solução de NaOH 4M e a temperatura aplicada foi 40°C. Já no grupo que produziu D-ácido láctico, observou-se que o pH foi mantido em 6, com soluções de NaOH 6M e temperatura de 46°C.

2.2.2.2. *Lactobacillus plantarum*

Esta é uma cepa extremamente versátil, sendo capaz de produzir soluções de ácido láctico tanto opticamente puras quanto misturas racêmicas, dependendo das condições de trabalho aplicadas. Karp *et al.* (2011) estudaram a produção de L-ácido láctico, tendo como fonte de açúcares o melaço de soja. O grupo obteve uma pureza óptica de 91% para esse isômero. Entretanto, a produtividade final foi baixa, 0,73 g/L.h. As condições deste trabalho foram: temperatura ótima de crescimento, ou seja, 28°C e não houve controle de pH, já que os experimentos foram realizados em pequena escala.

Entretanto, outros autores como Hofvendahl & Hahn-Hägerdal (2000) descreveram experimentos que resultaram na produção de um ácido láctico obtido em misturas racêmicas. As proporções variam em torno 50% de cada forma opticamente ativa do ácido. As condições de trabalho estão por volta de pH controlado em 5 e as temperaturas de trabalho vão de 37 a 40°C.

2.2.2.3. *Leuconostoc mesenteroides*

É a principal representante das bactérias heterofermentativas, que produz, além do ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂. Essa cepa é muito usada na manufatura de alimentos fermentados. Produz, preferencialmente, o D-ácido láctico pela presença da

enzima D-lactato desidrogenase (ldhD) durante o metabolismo do piruvato (Yoon *et al.*, 2005).

Li *et al.* (2012) identificaram o gene responsável pela produção do D-ácido láctico neste microrganismo e caracterizaram a enzima, para facilitar a produção de um ácido láctico opticamente puro em sua forma D. De acordo com o grupo, essa enzima não é inibida na presença de soluções que contenham os íons Ca^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} e Na^{+} , com atividade ótima em temperatura de 30°C.

2.2.3. Aplicações do ácido láctico e consumo mundial

As aplicações do ácido láctico são muito amplas e algumas delas são descritas por Datta e Henri (2006): sofrer desidratação catalítica, para produção de ácido acrílico; passar por reações de esterificação, na presença de álcool, para originar ésteres de lactato; sofrer hidrogenação, para produzir óxido de propileno e dar origem às fibras plásticas, após passar por uma destilação catalítica, que é uma nova aplicação desse ácido.

A indústria que mais consome ácido láctico é a alimentícia, onde ele é usado como acidulante e aromatizante. Entretanto, esse cenário está em constante mudança, pois em 2006, Datta e Henri descreveram um valor de 85% de todo ácido láctico produzido voltado à aplicação em alimentos. Já em 2013, Martinez *et al.* descreveram um montante de 70% da produção desse ácido voltado ao mesmo ramo. Essa diminuição se justifica pela descoberta da versatilidade das propriedades higroscópicas e emulsificantes do ácido láctico. O ácido está ganhando espaço na área da saúde, sendo aplicado na produção de suturas, de dispositivos de produção e de liberação de medicamentos internos, em produtos ligados ao rejuvenescimento da pele, higiene oral e prevenção de acne.

A aplicação de maior destaque e que será responsável pelo aumento na produção do ácido láctico até 2017, segundo estatísticas apresentadas pela IHS Chemical em janeiro de 2013, é o seu consumo para produção do poli-ácido láctico (PLA). Esse estudo prevê um aumento anual de 9%, motivado por essa aplicação, para os Estados Unidos da América e para a Europa Ocidental, que atualmente são os maiores produtores desse ácido, conforme expresso na Figura 2.4. Assim que o consumo de poli-ácido láctico e de seus produtos for regularizado para aplicações na área da saúde, o crescimento será mais intenso.

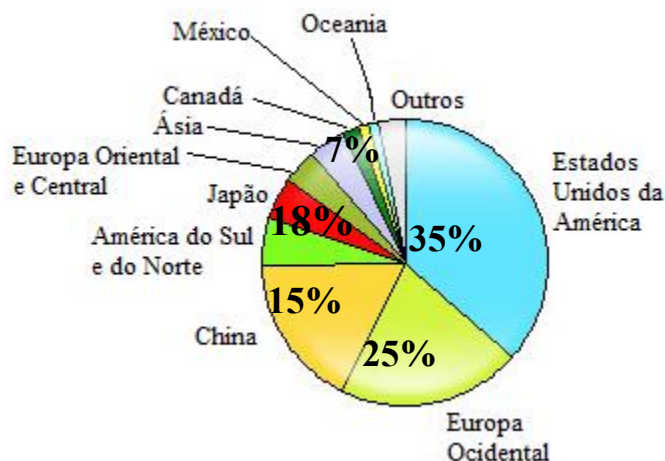


Figura 2.4. Consumo mundial de ácido láctico, seus sais e ésteres em 2012 (Adaptado de IHS Chemical, 2013).

A previsão do estudo é a de que a China ocupe o segundo lugar no *ranking*, devido ao aumento do mercado de comidas e bebidas processadas, assim como sua forte exportação. No Japão, apenas um crescimento moderado é esperado durante o período de previsão. Em outros países da Ásia, um crescimento significativo (maior do que 20% ao ano) é esperado e a demanda de ácido láctico para PLA deverá apoiar esse crescimento, e uma porcentagem de 5-6% ao ano também ocorrerá para o mercado de alimentos e bebidas, bem como o mercado de assistência farmacêutica e pessoal. Espera-se que até 2017, as aplicações industriais sejam responsáveis por mais da metade do consumo mundial de ácido láctico.

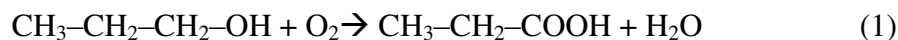
2.3. ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico é um líquido, incolor, corrosivo com acentuado odor desagradável. É um ácido carboxílico de corrente aberta, com fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$, com temperatura de ebulição de 141°C , à pressão de 1atm, é miscível em água (em qualquer proporção) e essa mistura não forma azeótropo. Tem massa molar de 74,079 g/mol, densidade relativa de 0,992 g/cm³ e viscosidade de 10 mPa.s (ICSC, 1997).

2.3.1. Produção do ácido propiônico

A rota de produção do ácido propiônico comercialmente utilizada, até os dias atuais, é a síntese química de petroquímicos. As principais reações são:

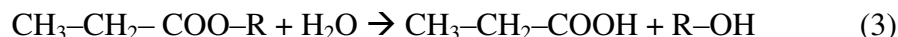
a) Oxidação do propanol (na presença de manganês ou cobalto, a temperaturas entre 40 e 50°C)



b) Oxidação do propanal



c) Hidrólise de ésteres (propanoato)

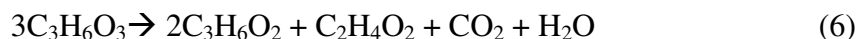


d-) Síntese ou processo oxo (usa etileno e gás de síntese)



Entretanto, problemas como o esgotamento da matéria-prima fóssil e seu elevado custo, o uso de reagentes tóxicos e grande demanda de energia pela conversão transformam esse processo em tóxico ao meio ambiente (Zárate e Chaia, 2012). Esse conjunto de fatores fez com que as pesquisas voltassem seus interesses para estudar a produção do ácido propiônico através de vias biotecnológicas e sustentáveis.

Porém, observa-se por registros na literatura, que o interesse em descobrir uma nova rota alternativa viável é bastante antigo. As primeiras pesquisas para descoberta de novas rotas para produção de ácido propiônico já têm registros no final século XIX, com Pasteur (1879), que reportou a formação do ácido propiônico a partir da fermentação do tartarato de cálcio. Anos depois, Sherman e Shaw (1923) publicaram um artigo que investigava a produção de ácido propiônico a partir da fermentação do lactato e descreveram a equação dessa conversão, em que 3 mols de lactato conduzem à produção de relação molar 2:1:1, ácido propiônico, ácido acético e dióxido de carbono, respectivamente.



Entretanto, muitas fontes de carbono são alvo de pesquisa para a produção do ácido. As fontes de carbono citadas na literatura são: glicose (Himmi *et al.*, 2000), hemicelulose (Ramsay *et al.*, 1998), glicerol (Zhu *et al.*, 2010), lactose (Goswami e Srivastava, 2000), lactato (Gu *et al.*, 1998), melão de cana-de-açúcar (Coral *et al.*, 2008) e melão de cana-de-açúcar hidrolisado (Feng *et al.*, 2011). De todos esses substratos citados acima, o lactato é preferencialmente usado, quando comparado com a glicose, como substrato pela maioria das bactérias produtoras de ácido propiônico (Coral *et al.*, 2008).

2.3.2. Bactérias do ácido propiônico

Na produção do ácido propiônico via processos fermentativos, utilizam-se grupos de bactérias pertencentes aos gêneros *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, etc. No entanto, os processos de fermentação convencionais para a produção de ácido propiônico apresentam baixo rendimento, baixa concentração de produto final e baixa produtividade causada por uma forte inibição dos produtos finais. A fim de tornar a produção de ácido propiônico por processo fermentativo economicamente atraente, o desenvolvimento de novos processos fermentativos é necessário (Coral *et al.*, 2008).

As bactérias do gênero *Propionibacterium* foram os microrganismos estudados nesse projeto e, assim, responsáveis pela produção do ácido propiônico, através da fermentação. Isso porque elas têm uma grande facilidade em converter lactato e carboidratos em ácido propiônico, ácido acético e dióxido de carbono (Woskow e Glatz, 1991). O processo é feito de forma anaeróbia e elas são, em geral, gram-positivas, anaeróbias facultativas, catalase-positivas, não formam esporos e capazes de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, para a produção do ácido.

O propionato pode ser formado a partir do lactato tanto pela rota do ácido acrílico, conforme Figura 2.5, quanto pela rota dos ácidos dicarboxílicos, demonstrada na Figura 2.6 (Coral *et al.*, 2008).

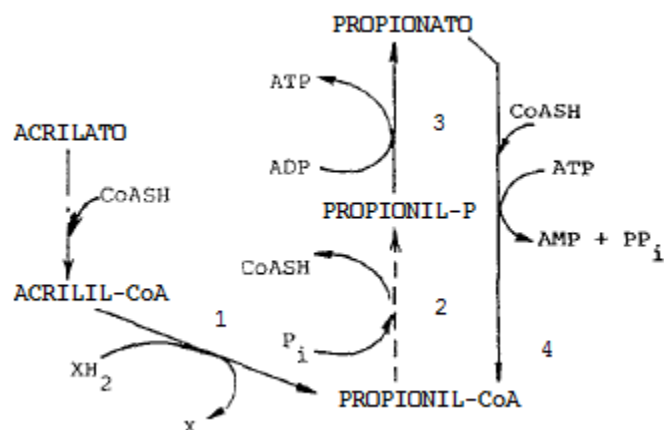


Figura 2.5. Rota de obtenção do sal do ácido propiônico a partir do ácido acrílico Os números representam as enzimas necessárias: 1: propionil-CoA desidrogenase, 2: fosfato propioniltransferase, 3: propionatoquinase e 4: propionil-CoA sintetase. X: molécula carregadora de elétrons não determinada no estudo de onde a figura foi retirada(Adaptado de Tholozan *et al.*, 1992).

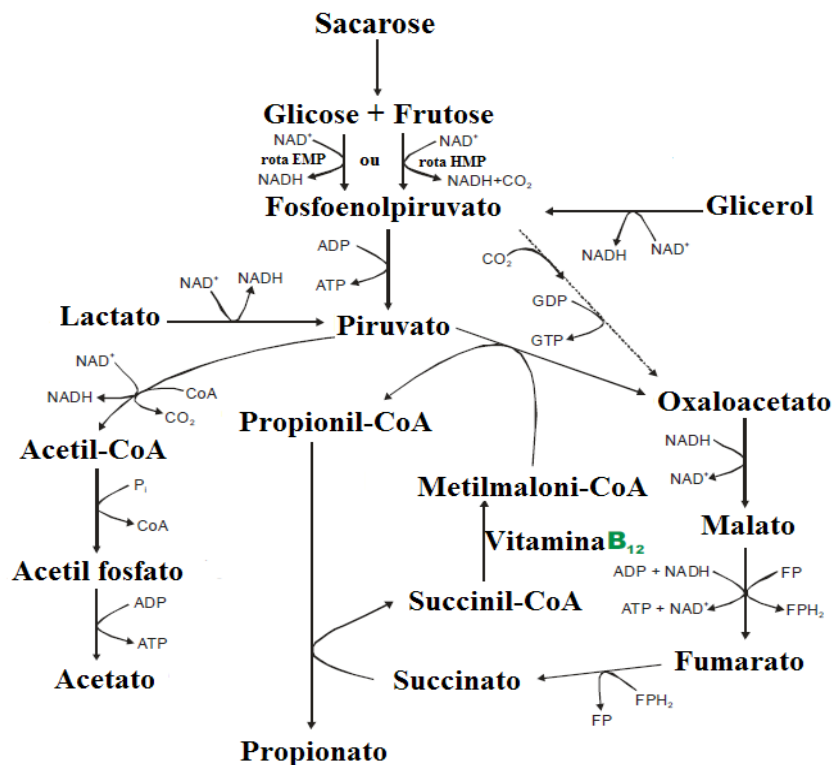


Figura 2.6. Rota dos ácidos dicarboxílicos até obtenção do propionato (Adaptado de Coral *et al.*, 2008).

2.3.3. Aplicações do ácido propiônico e consumo mundial

O ácido propiônico e seus sais de cálcio, sódio e potássio são conhecidos por inibir o crescimento celular e, assim, podem ser aplicados em conservantes e herbicidas, assumindo função antimicrobiana. Esse fenômeno já pode ser observado em fermentações quando o produto alcança uma concentração entre 20 e 30 g/L. O mecanismo de inibição ocorre porque o ácido propiônico perturba o gradiente de pH na membrana celular, que é a força motriz para os microrganismos conseguirem transportar nutrientes e metabólitos entre o interior celular e o meio externo. Devido à natureza hidrofóbica, tanto da membrana celular, quanto do ácido propiônico, um ácido não dissociado pode se difundir pela membrana celular, atingindo o citoplasma e, então, se dissociar em próton e ânion propionato, no interior dessa célula. Com isso, ocorre um acúmulo interno de prótons. Como a célula deve manter um gradiente funcional de prótons através da membrana, uma energia extra, no caso ATP, deve ser consumido pela H^+ – ATPase para expulsar esse excesso. Portanto, há uma diminuição do ATP disponível para o metabolismo celular (Guet *al.*, 1998 *apud* Coral *et al.*, 2008).

A maioria das aplicações do ácido propiônico se baseia nessa característica de inibição de crescimento celular de fungos, leveduras e algumas bactérias. O ácido propiônico é também utilizado como um intermediário sintético na fabricação de herbicidas e produtos farmacêuticos, propionato de acetato de celulose (CAP) de plástico, em ésteres de propionato de alquilo para os solventes e aromas e fragrâncias. Preservação da ração animal, grãos e alimentos (propionatos de cálcio e sódio) foram responsáveis por 78,5% do consumo mundial de ácido propiônico, em 2012, seguido por vários herbicidas e dietil cetona. Outras aplicações de menor volume incluem: medicamentos, ésteres solventes, aromas, fragrâncias, plastificantes, tintas e têxtil, couro e auxiliares de borracha. A demanda por ácido propiônico é, em grande parte, dependente da produção de ração animal e de grãos, seguido por alimentos e produtos de padaria embalados. Perspectivas de crescimento mundial para o ácido propiônico e seus sais na alimentação/grão preservação e alimentos de origem animal são significativos. Outros mercados de crescimento rápido incluem ésteres de propionato para solventes, tais como n-butilo e pentilo propionato; estes

ésteres são cada vez mais utilizados como substitutos para os solventes listados como poluentes perigosos do ar.

A Figura 2.7 apresenta o consumo mundial do ácido em 2012. Um estudo realizado pela IHS Chemical mostrou que a perspectiva até o ano de 2018 é a de que esse quadro se modifique nas menores fatias, já que os mercados da Ásia, África Central e América do Sul estão em constante desenvolvimento. Entretanto, os três primeiros lugares continuarão a ser ocupados pela Europa Ocidental, América do Norte e Ásia, que serão responsáveis pelo maior volume produzido mundialmente.

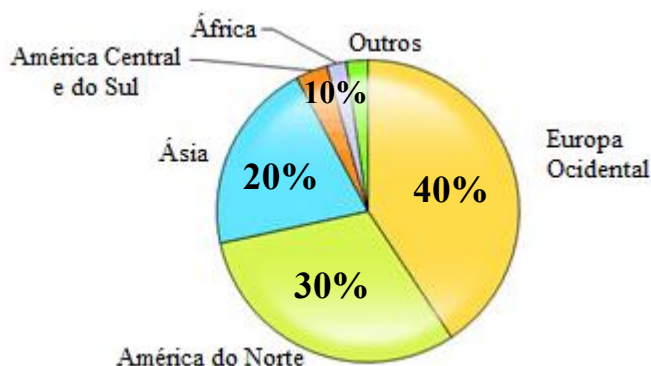


Figura 2.7. Consumo mundial de ácido propiônico em 2012 (Adaptado de IHS Chemical, 2013).

Por ser um ácido forte, o ácido propiônico apresenta um grande problema de inibição em estudos de fermentação, pois as propionibactérias têm seu crescimento prejudicado por isso e a conversão de qualquer substrato sofre uma estagnação. Muitos autores tentam estudar saídas para contornar esse problema. Gu *et al.* (1998) propuseram um estudo detalhado da cinética da fermentação para poder remover uma quantidade de ácido do meio de fermentação continuamente; Zhu *et al.* (2010) e Woskow e Glatz, (1998), estudaram a otimização da produção do ácido propiônico por uma propionibactéria ácido-tolerante obtida via evolução adaptativa. Processo em batelada alimentada, como tentativa de controle de pH do caldo fermentado e, assim, controlar a inibição de ácido propiônico sobre a mesma (Goswani e Srivastava, 2000), fermentação extrativa, com solventes e membranas extrativas (para minimizar o contato entre o caldo fermentado e o solvente)

conectadas ao fermentador (Jin e Yang, 1998) e remoção do produto *in situ* (ISPR – In Situ Product Removal) com o uso de resinas (Wang *et al.*, 2012) são outras alternativas para evitar a inibição celular.

Alguns estudos reportados na literatura sobre produção de ácido propiônico via processo fermentativo são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Estudos desenvolvidos para produção de ácido propiônico via fermentação.

Autor	Microrganismo*	Fonte de carbono	Produtividade	Fermentação
Coral <i>et al.</i> (2008)	<i>P. zeae</i>	glicerol	0,064 g/L.h	batelada
Coral <i>et al.</i> (2008)	<i>P. arabinosum</i>	melaço de cana-de-açúcar	0,062 g/L.h	batelada
Feng <i>et al.</i> (2011)	<i>P. freudenreichii</i>	melaço de cana-de-açúcar hidrolisado	0,36 g/L.h	batelada-alimentada
Goswami e Srivastava (2000)	<i>P. acidipropionici</i>	lactose	0,23 g/L.h	batelada-alimentada
Gu <i>etal</i> (1998)	<i>P. thoenii</i>	lactato	0,42 g/L.h	batelada-alimentada
Jin e Yang (1998)	<i>P. acidipropionici</i>	lactose	0,2 g/L.h	batelada
Ramsay <i>et al.</i> (1998)	<i>P. acidipropionici</i>	hemicelulose	0,23 g/L.h	batelada
Zhu <i>et al.</i> (2010)	<i>P. acidipropionici</i>	glicerol	0,19 g/L.h	batelada
Zhu <i>et al.</i> (2010)	<i>P. acidipropionici</i>	glicerol	0,20 g/L.h	batelada alimentada
Wang <i>et al.</i> (2012)	<i>P. freudenreichii</i>	glicose	0,33 g/L.h	batelada alimentada
Dishisha <i>et al.</i> (2013)	<i>P. acidipropionici</i>	mistura de glicerol e suco de batata	0,88 g/L.h	batelada (alta densidade celular)

* Todos os microrganismos apresentados nestes estudos se referem ao gênero *Propionibacterium*.

Pode-se observar, pela tabela apresentada, que as produtividades globais das diferentes fermentações são baixos. Esse fenômeno é explicado pela forte característica inibidora do ácido propiônico.

Assim, pretendeu-se estudar a viabilidade do processo de fermentação do ácido láctico (lactato de sódio), produzido a partir da fermentação de açúcares presentes na cana-de-açúcar, para produção de ácido propiônico, por um processo completamente sustentável.

Nos próximos capítulos, serão apresentados os resultados dos experimentos realizados e uma comparação dos mesmos com os apresentados na literatura.

2.4. Acompanhamento das fermentações – definição de concentração, rendimento e produtividade.

O acompanhamento e o estudo de um processo fermentativo consistem, inicialmente, na análise dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes, o microrganismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes que compõe o meio de cultura (Aquarone *et al.*, 2001).

Para tanto, é necessário que os conceitos de concentração, rendimento e produtividade sejam definidos, uma vez que todas as análises se baseiam nos resultados destes cálculos.

2.4.1. Concentração

A concentração é a razão que representa a quantidade, ou a massa de uma substância, e o volume em que este composto se encontra dissolvido. A unidade usual em artigos de pesquisa é g/L (gramas de soluto/litros de solvente). A relação é calculada pela equação apresentada a seguir.

$$C = m / v \quad (1)$$

2.4.2. Rendimento

O rendimento do processo de formação do produto em relação ao substrato consumido pode ser expresso sob duas formas: rendimento teórico e rendimento observado.

O primeiro representa a razão entre a quantidade total, em massa ou moles, de substrato consumido para o crescimento microbiano ou formação do produto. O segundo é a razão entre a quantidade do produto formado e a quantidade total consumida do substrato, ambas em massa ou moles. Ao se multiplicar estes números por 100, tem-se a porcentagem de rendimento da reação. A equação a seguir apresenta o cálculo do rendimento observado, que foi utilizada no desenvolvimento do trabalho.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \times 100 \quad (2)$$

2.4.3. Produtividade

A produtividade volumétrica, para um reator em batelada, é a relação entre a concentração do componente formado P, no biorreator de volume V, em um tempo t_r , em que a concentração microbiana ou do produto é constante (Coêlho, 2011). A relação é representada abaixo.

$$Q_v = \frac{P}{t_r} \quad (3)$$

CAPÍTULO III

Produção do ácido láctico

Neste capítulo, serão apresentadas as justificativas da escolha das 3 cepas bacterianas usadas na produção do ácido láctico, bem como todas as condições do estudo em *shaker* realizado para cada bactéria. Esta seção também está reservada para a discussão dos resultados dessa etapa inicial e apresentação dos parâmetros utilizados para a produção do ácido láctico em fermentador.

3.1. FONTE DE CARBONO

Para a produção de ácido láctico, foi usado o melaço de cana-de-açúcar, não hidrolisado, obtido da Usina Costa Pinto S.A. de Piracicaba – SP, safra 2012.

3.2. SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS

Para o estudo da produção do ácido láctico, que constituiu a etapa de estudo em *shaker*, procurou-se identificar dois tipos de bactérias que favorecessem a produção de diferentes isômeros durante a fermentação, e uma terceira que fosse capaz de gerar a mistura racêmica, de acordo com as condições de estudo levantadas da literatura. Assim, as três cepas adquiridas na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello foram: *Lactobacillus plantarum* (D e L), *Lactobacillus delbrueckii* (isômero L) e *Leuconostoc mesenteroides* (isômero D).

3.3. CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As culturas foram reativadas em tubos (ver Figura 3.1) contendo 7mL de meio MRS ágar, previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os inóculos foram mantidos em incubadora por 48 horas em suas respectivas temperaturas ótimas de crescimento, sendo que para *Lactobacillus plantarum* foi 28°C, para *Lactobacillus delbrueckii* 37°C e para *Leuconostoc mesenteroides* 26°C.

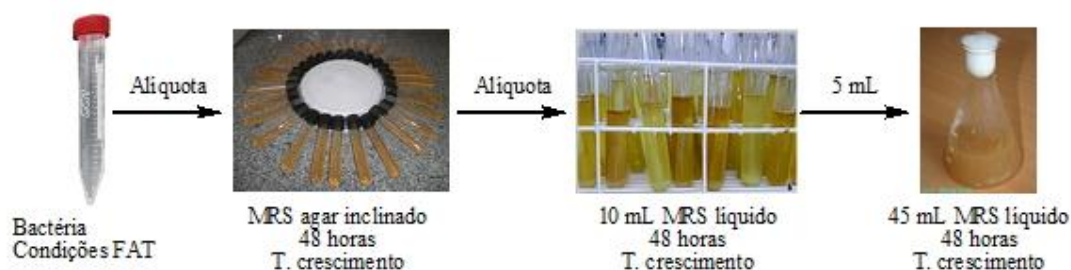


Figura 3.1. Esquema geral para preparo do inóculo para ensaios de fermentação em *shaker*.

Passado o período de incubação, uma alíquota da cultura foi transferida para tubos de ensaio com 11 mL de meio MRS caldo, permanecendo nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, 5 mL dessa solução foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL com 45 mL de meio MRS caldo e mantidos por 2 dias em suas respectivas temperaturas de crescimento. A composição dos meios MRS é a mesma e é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição do meio MRS.

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

* O composto ágar só está presente na formulação do meio da primeira etapa descrita, ou seja, o de repique e manutenção das bactérias.

3.4. ESTUDOS EM *SHAKER*

Para os estudos em *shaker*, após o tempo total de incubação, o melaço foi diluído em água destilada em diferentes concentrações, suplementado com três concentrações diversas de extrato de levedura e mantido por 24 horas, a 150 rpm em temperaturas diferentes, a fim de se realizar um estudo prévio sobre o comportamento das bactérias. O volume de inóculo correspondeu a 14% do volume total de fermentação. Assim, o volume final totalizou 300 mL. Amostras de 4 mL foram retiradas com 4, 10 e 24 horas, para acompanhar o processo. Os experimentos foram separados por temperaturas, sendo assim compostos por nove erlenmeyers cada. Ao fim das fermentações realizadas em *shaker*, um total de 243 amostras foi obtido e analisado para compor o estudo. As Tabelas 3.2 e 3.3 mostram as temperaturas usadas em cada ensaio e as diferentes concentrações de sacarose a partir do melaço e de extrato de levedura.

Tabela 3.2. Temperaturas estudadas para cada bactéria.

Microrganismo	Temperatura (°C)		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	31	34	37
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	40	43	46
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	29	32	35

Tabela 3.3. Concentrações de sacarose e de extrato de levedura.

Fatores	Concentrações (g/L)		
Sacarose	14	23	33
Extrato de levedura	2	4	6

3.5. FERMENTAÇÃO EM REATOR

Depois de estabelecidas as melhores condições para cada bactéria, estudos foram realizados em um fermentador New Brunswick, modelo BioFlo 415, com capacidade total de 7000 mL, montado sobre uma base de controle que permite controlar algumas variáveis do processo, como temperatura, pH, turbidez, CO₂, agitação, conforme Figura 3.2. O

inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.3, diferenciando apenas nas duas últimas etapas.

Para substituir a última etapa, foi usado um erlenmeyer de 1000 mL com 450 mL de meio MRS líquido e os 50 mL totais provenientes da fase antecedente. Os 500 mL foram mantidos em *shaker* a 150 rpm às respectivas temperaturas de crescimento, por 30 horas à temperatura de crescimento de cada bactéria, para compor o inóculo para a fermentação.

Passado esse período, foram inoculados 300 mL, 10% de inóculo do volume total, em 2700 mL de meio composto por melaço diluído suplementado com extrato de levedura. A rotação foi estabelecida em 200 rpm e o tempo variou de 30 a 50 horas de processo, dependendo do comportamento da bactéria. Dois pulsos de melaço de cana-de-açúcar foram dados durante o processo, com a intenção de manter uma boa concentração de sacarose no meio (Lunelli, 2010). O volume dos pulsos era relativo ao volume total de amostras retiradas até aquele momento. As amostras eram retiradas de 2 em 2 horas, para estudo da formação de produto, consumo de substrato, crescimento celular e estudo dos parâmetros de produção. Para o controle de pH em 5,0, foi usada uma solução de NaOH 4M. O tempo de fermentação foi determinado pelo acompanhamento do funcionamento da bomba do controle de pH.



Figura 3.2. Fermentador usado na produção do ácido láctico.

3.6. METODOLOGIA ANALÍTICA

As amostras, dos estudos em *shaker* e das fermentações, foram centrifugadas em uma centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5810R. O sobrenadante foi filtrado em membranas millipore de 0,22 µm e usado para determinação das concentrações de ácido láctico e açúcares residuais (sacarose, glicose e frutose) e o precipitado usado para determinação da concentração celular, essa última feita por peso seco (gravimetria).

As concentrações de açúcar, ácido láctico, e subprodutos foram determinadas através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), marca Agilent, modelo 1260 Infinity Quaternary LC System. Foi usada uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H.

A metodologia usada foi adaptada de Lunelli (2010), com solução de ácido sulfúrico, como fase móvel, a 5mM, pH de 2,16, filtrada em membrana Milipore e degaseificada por 30 minutos em banho ultrassom para que não houvesse a formação de bolhas. A injeção foi de 15 µL, a 42°C, com taxa de fluxo de 0,6mL/minuto, sendo que cada corrida tomou um tempo de 20 minutos, com 30 segundos de intervalo entre cada uma.

Para determinação da concentração celular por gravimetria, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e centrifugado. A massa celular foi colocada em tubos eppendorfs, previamente secos e pesados, e seca em estufa a 105°C por 4 horas.

3.7. RESULTADOS

3.7.1. Resultados das fermentações em *shaker*.

As amostras retiradas durante o estudo e analisadas no HPLC permitiram observar um comportamento crescente, com relação à produção de ácido láctico, proporcional ao decréscimo da concentração dos açúcares presentes no melaço. Esse comportamento foi observado para as três bactérias, mesmo com ausência de controle de pH nessa etapa. Os resultados serão apresentados a seguir e estão separados por cepa, para melhor visualização.

3.7.1.1. *Lactobacillus delbrueckii*

A Tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos para a *Lactobacillus delbrueckii*, mas somente as dosagens realizadas no tempo final, ou seja, em 24 horas, para justificar a escolha da condição reproduzida em fermentador.

Tabela 3.4. Resultados das fermentações em *shaker* para *Lactobacillus delbrueckii*.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido lático (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido lático (g/L)
40	14	2	7,2	43	23	6	8,6
40	14	4	7,7	43	33	2	8,8
40	14	6	8,5	43	33	4	9,0
40	23	2	8,6	43	33	6	10,0
40	23	4	8,8	46	14	2	10,3
40	23	6	9,5	46	14	4	5,1
40	33	2	10,0	46	14	6	6,5
40	33	4	10,1	46	23	2	6,3
40	33	6	10,3	46	23	4	5,0
43	14	2	7,1	46	23	6	6,2
43	14	4	7,9	46	33	2	6,2
43	14	6	8,4	46	33	4	5,1
43	23	2	8,4	46	33	6	5,7
43	23	4	7,2	-	-	-	-

Os melhores resultados foram obtidos com as seguintes condições: 40°C, 33 g/L de sacarose e 6g/L de extrato de levedura, com um valor final de produção de ácido láctico de 10,3 g/L e 46°C, 14 g/L de sacarose e 2 g/L de extrato de levedura. Pensando no gasto energético da etapa de produção em grande escala, optou-se por reproduzir a condição de menor temperatura.

3.7.1.2. *Leuconostoc mesenteroides*

Os resultados de 24 horas de estudo em *shaker* para a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Resultados das fermentações em *shaker* para *Leuconostoc mesenteroides*.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
29	14	2	5,3	32	23	6	7,8
29	14	4	5,1	32	33	2	9,0
29	14	6	4,7	32	33	4	8,7
29	23	2	6,2	32	33	6	9,2
29	23	4	6,0	35	14	2	5,6
29	23	6	6,0	35	14	4	6,7
29	33	2	6,8	35	14	6	6,3
29	33	4	7,0	35	23	2	8,1
29	33	6	7,0	35	23	4	7,7
32	14	2	5,3	35	23	6	7,6
32	14	4	5,2	35	33	2	8,7
32	14	6	5,3	35	33	4	8,6
32	23	2	6,1	35	33	6	8,3
32	23	4	6,7	-	-	-	-

Observa-se que, nas condições de temperatura de 32°C, concentração de sacarose de 33 g/L e concentração de extrato de levedura de 6 g/L foi obtido o melhor resultado, com uma dosagem de ácido láctico, após 24 horas, de 9,2 g/L.

3.7.1.3. *Lactobacillus plantarum*

Na Tabela 3.6, são apresentados os resultados obtidos das análises cromatográficas para 24 horas de processo, no estudo em *shaker*, para a bactéria *Lactobacillus plantarum*.

Tabela 3.6. Resultados das fermentações em *shaker* para a bactéria *Lactobacillus plantarum*.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
31	14	2	7,1	34	23	6	9,7
31	14	4	4,3	34	33	2	10,6
31	14	6	6,8	34	33	4	10,4
31	23	2	8,3	34	33	6	8,7
31	23	4	8,4	37	14	2	9,0
31	23	6	7,3	37	14	4	9,1
31	33	2	9,2	37	14	6	10,0
31	33	4	9,8	37	23	2	10,6
31	33	6	10,3	37	23	4	10,8
34	14	2	7,8	37	23	6	11,9
34	14	4	8,2	37	33	2	11,4
34	14	6	8,2	37	33	4	11,5
34	23	2	8,8	37	33	6	11,9
34	23	4	9,9	-	-	-	-

O comportamento dessa bactéria foi diferente das anteriores, sendo possível analisar que com o aumento de todas as condições estudadas, obteve-se um maior rendimento de ácido láctico no estudo. O máximo valor obtido foi de 11,9 g/L de ácido láctico ao fim do processo, com a temperatura de 37°C, a concentração de sacarose de 33 g/L e a concentração de extrato de levedura de 6 g/L.

Ao analisar os resultados das três bactérias, comprovou-se que as melhores condições, com relação aos nutrientes, foram de 33 g/L de sacarose e 6 g/L de extrato de levedura. Entretanto, de acordo com os dados apresentados, é possível notar que com relação à fonte de nitrogênio, é tangível a diminuição dessa concentração para 2 g/L, por se tratar de um reagente de elevado custo, conforme Tabela 3.7.

O principal problema ao se trabalhar com bactérias lácticas é a necessidade de assimilação de nitrogênio e suplementos para manutenção destes microrganismos. O extrato de levedura é muito relatado pelos pesquisadores como sendo o melhor reagente para tal fim (Arasaratnam *et al.*, 1996; Nancib *et al.*, 2005). Mas, quando se avalia um

processo industrial, a viabilidade econômica pode ficar comprometida devido ao alto custo do extrato de levedura.

Alguns autores, como Silveira (2009), estudam a substituição o efeito de fontes alternativas de nitrogênio, sendo que ambos os estudos analisaram a viabilidade do uso de sulfato de amônio, que é seis vezes mais barato que o extrato de levedura, e obtiveram bons resultados. Foram feitos dois tipos de ensaios: o primeiro estudo comparou fermentações realizadas com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 6 g/L de extrato de levedura e com 50 g/L de açúcares redutores totais iniciais e 6 g/L de sulfato de amônio. Observou-se que as produtividades máximas, após 12 horas de processo, foram de 2,5 g/L.h e 3,1 g/L.h, respectivamente.

Assim, optou-se por realizar os estudos fermentativos com a menor concentração desse nutriente.

Tabela 3.7. Concentrações de ácido láctico para diferentes concentrações de extrato de levedura.

Microrganismo	Sacarose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	32,88	2	9,1
	32,88	4	10,0
	32,88	6	10,3
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	32,88	2	9,2
	32,88	4	8,1
	32,88	6	9,1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	32,88	2	11,4
	32,88	4	11,5
	32,88	6	11,9

3.7.2. Resultados da fermentação em reator

Um fator importante a ser considerado é o de que para o estudo da fermentação, de acordo com a metodologia explicada anteriormente, optou-se por fornecer pulsos de melaço durante o processo, a fim de se manter uma concentração de sacarose que fosse a mais próxima possível da inicial. Para saber o momento em que a fonte de açúcar tinha se esgotado, analisou-se constantemente o gráfico de funcionamento da bomba de adição de solução NaOH 4M, para controle de pH em 5,0, uma vez que a adição de base era realizada automaticamente pelo equipamento conforme a concentração de ácido láctico aumentava.

O comportamento da bomba de base é exemplificado nas Figuras 3.3 a 3.5, obtidos das fermentações das três cepas. De acordo com a Figura 3.3, referente à fermentação pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii*, observa-se que a bomba parou de funcionar nos períodos de 20 a 25 horas, aproximadamente. O pulso foi dado após esse tempo, para garantir que todo açúcar tinha sido realmente degradado pela bactéria e que não houvesse uma quantidade maior de sacarose do que a inicial. O mesmo ocorreu após 30 horas de processo.

Para as fermentações realizadas nesta etapa do trabalho, a concentração dos pulsos era de 173g/L de sacarose e o volume variava de acordo com o resultado da soma dos volumes de amostras retirados até o momento. Entretanto, quando esta solução era inserida no fermentador, a concentração de sacarose ficou bastante abaixo disto. No momento das análises, observou-se que esta concentração ficava em torno de 5 a 10 g/L de sacarose.

Não foi possível produzir uma concentração solução de melaço mais concentrada, pois devido a sua elevada viscosidade, o melaço não diluía. Esse fator, relacionado ao pequeno volume inserido justifica a pouca quantidade de base fornecida pela bomba, mesmo após os pulsos.

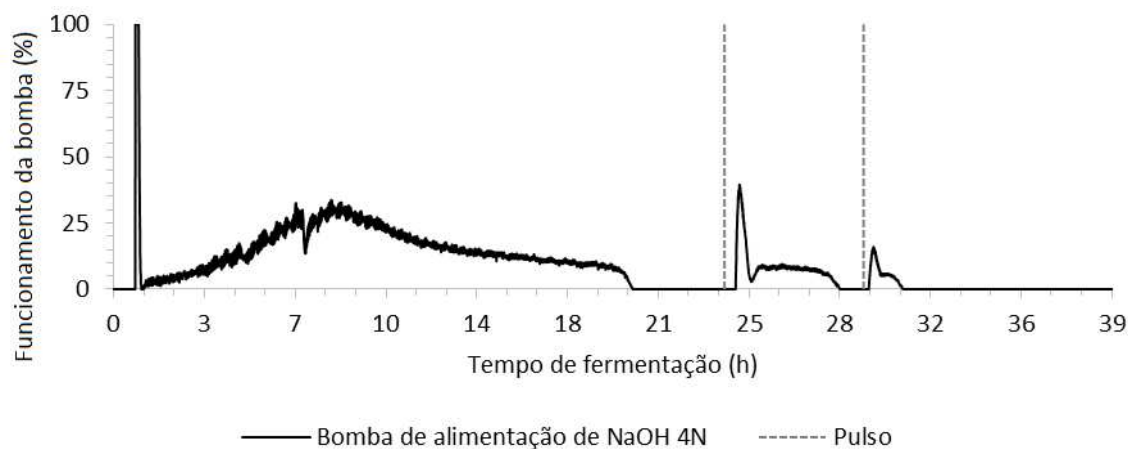


Figura 3.3. Tempo de fermentação versus funcionamento da bomba de base para *Lactobacillus delbrueckii*.

O mesmo comportamento foi observado em todas as fermentações realizadas, variando somente o momento do pulso e o volume do mesmo, conforme pode ser

observado nas Figuras 3.4 e 3.5. O fato de se ter fornecido o pulso com elevada concentração foi importante na produção final do ácido láctico. Entretanto, foi importante considerar o volume inserido ao fermentador, já que a concentração real no meio ficou abaixo disso e será apresentado na discussão dos resultados a seguir.

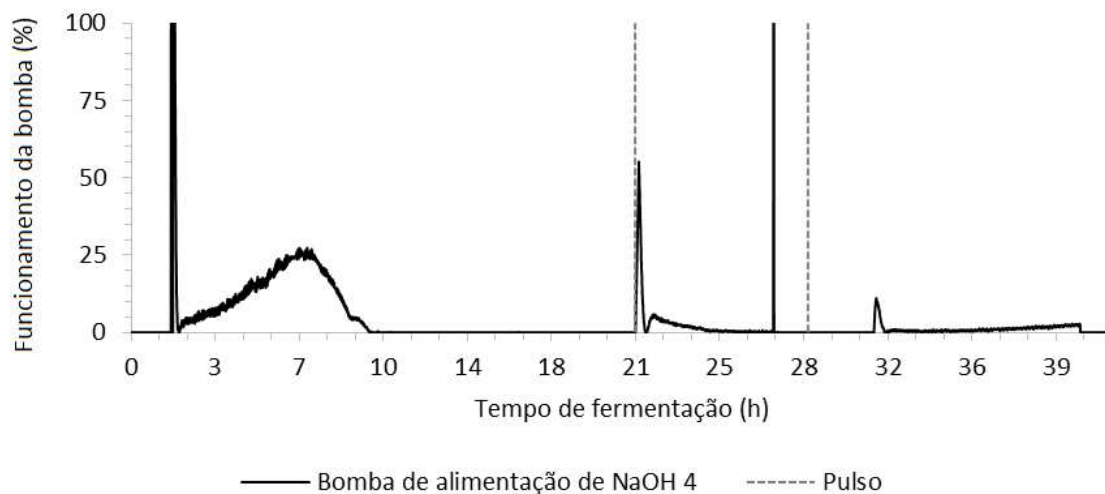


Figura 3.4. Tempo de fermentação versus funcionamento da bomba de base para *Leuconostoc mesenteroides*.

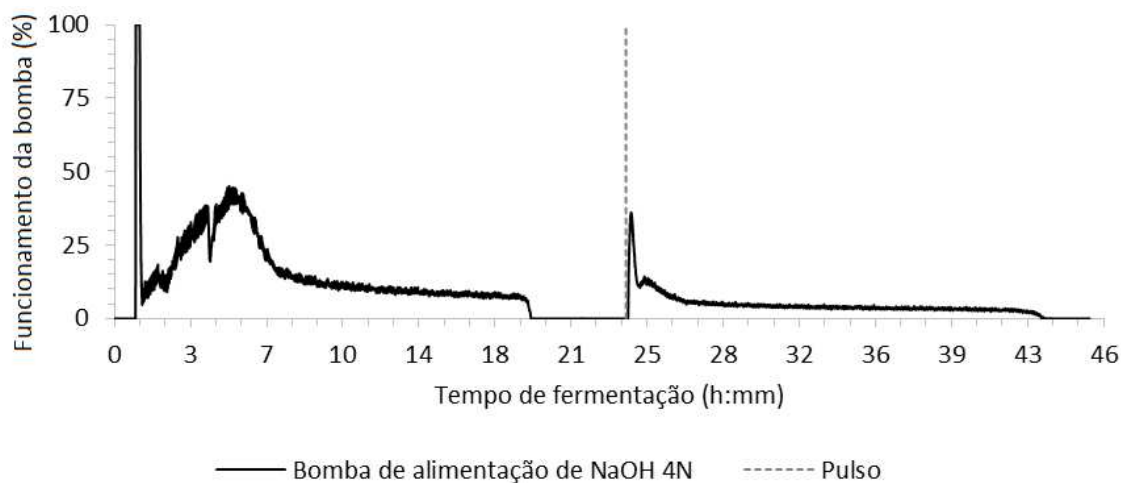


Figura 3.5. Tempo de fermentação versus funcionamento da bomba de base para *Lactobacillus plantarum*.

3.7.2.1. Perfil da concentração pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii*

No início dessa fermentação, notou-se que houve um aumento na concentração inicial de sacarose, conforme observado na Figura 3.6, para 43,3 g/L. Esse erro se justifica pelo fato de o reator usado, o BioFlo 45, perder água durante o processo de esterilização do meio fermentativo.

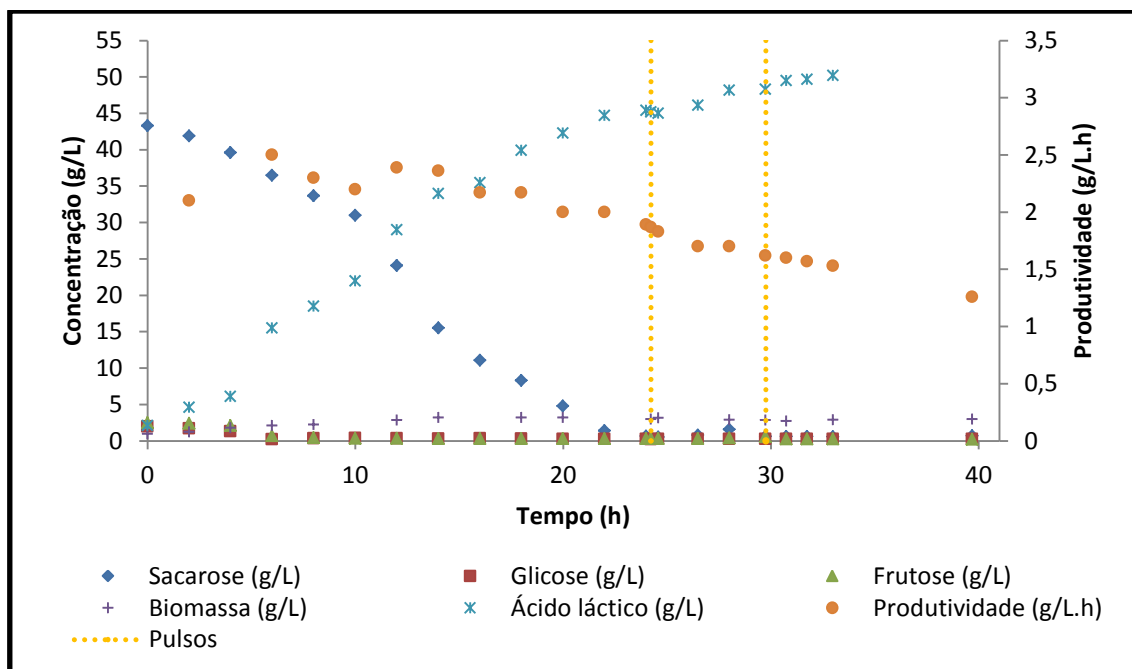


Figura 3.6. Perfil da fermentação do melaço pela cepa *Lactobacillus delbrueckii*.

De acordo com a Figura 3.6, é possível visualizar que em 39 horas, o processo mostrou-se eficiente, com uma concentração de ácido láctico de 50,2 g/L, uma produtividade de 1,26 g/L.h e taxa de conversão, dos açúcares disponíveis na fermentação em ácido láctico, de 80%. Os resultados obtidos podem ser considerados bons, quando comparados com os observados na literatura. Kadam *et al.* (2006) usando o melaço hidrolisado, suplementado com extrato de levedura e uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii*, alcançaram uma faixa 0,5-1,6 g/L.h, variando segundo a concentração de sacarose usada.

Estudos diferentes para produção dos dois isômeros do ácido láctico foram encontrados na literatura. Timbuntan *et al.* (2006) e Nakano *et al.* (2012), descreveram essa

cepa como sendo uma bactéria homofermentativa, que produz D-ácido láctico com elevada pureza óptica e tem facilidade para fermentar os açúcares como sacarose e glicose. As condições apresentadas nesses estudos foram: temperaturas de 40°C, com pH 6, controlados por três tipos de soluções básicas, NaOH, Ca(OH)₂ e NH₄OH.

Em ambos os estudos, o substrato usado foi a glicose e os fermentados de maior pureza óptica foram aqueles em que a solução de NaOH 6M foi usada para controle do pH da fermentação. A pureza óptica do ácido obtido no primeiro estudo estava entre 97 e 98%, em sua forma D(-). Já na segunda referência, o ácido láctico produzido apresentou uma pureza óptica de 95% do isômero D.

Entretanto, Rashid (2008) em seu estudo da viabilidade da produção de L-ácido láctico pela mesma bactéria fermentando resíduos da produção de suco de abacaxi, utilizou a temperatura de 40°C, pH controlado em 5 por uma solução de NaOH 4M, de condição de trabalho, encontrou uma solução de L-ácido láctico a 95%.

3.7.2.2. Perfil da concentração pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*

Nesta fermentação, nota-se, através da Figura 3.7, que a concentração inicial de sacarose é menor do que a proposta pelos estudos em *shaker*. Esse fato se justifica pela adição de água ao meio de fermentação, uma vez que, após a análise das características do reator, notou-se uma perda considerável de vapor e, por isso, concentração da sacarose no meio.

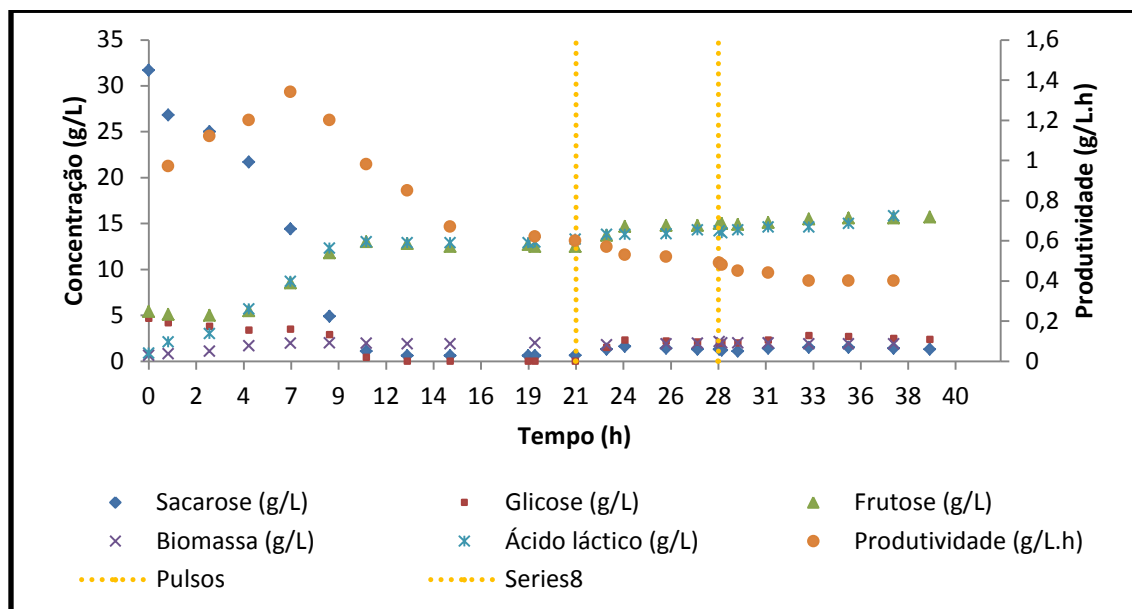


Figura 3.7. Perfil da fermentação do melaço pela cepa *Leuconostoc mesenteroides*.

Em relação aos açúcares e ao ácido láctico, foi observado que durante o processo, a concentração de frutose teve um aumento, o que indica que este substrato é pouco metabolizado pela bactéria. Esse comportamento possivelmente foi afetado pelo valor de pH usado na fermentação e que poderia levar à formação de dextrana (Queiróz, 1987). Devido a isso, ressalta-se que das cepas utilizadas, a *Leuconostoc mesenteroides* foi a que produziu uma menor quantidade de ácido láctico, 15,8g/L com produtividade de 0,4 g/L.h e taxa de conversão do substrato em produto de aproximadamente 50% dos açúcares totais disponíveis na fermentação.

No entanto, nota-se que a maior produtividade foi obtida no momento em que a sacarose e a glicose foram metabolizadas, conjuntamente, durante as primeiras 9 horas de fermentação alcançando uma produtividade de 1,34 g/L.h. Mesmo assim, a biomassa teve um máximo de crescimento nesse tempo. Em parte, a baixa produtividade foi devida ao longo tempo que a fermentação ficou estagnada devido ao esgotamento da sacarose, antes da adição dos pulsos. Após os pulsos, o incremento na concentração de ácido láctico foi pequeno, levando à diminuição da produtividade.

No entanto, Coelho *et al.* (2011) apresentaram uma produtividade de 0,85 g/L.h, o que indica que a produtividade encontrada nesse trabalho é considerável.

3.7.2.3. Perfil da concentração pela bactéria *Lactobacillus plantarum*

De acordo com a Figura 3.8, nota-se que com 46,4 horas, o processo mostrou-se eficiente, atingindo uma concentração de ácido láctico de 50,6 g/L, e uma produtividade de 1,1 g/L.h e conversão de 92%. Para este cálculo, considerou-se a concentração dos açúcares disponíveis do melaço tanto no momento do inóculo, quanto no momento do pulso dado.

Os resultados obtidos podem ser considerados compatíveis com a literatura. Lunelli (2010) usando melaço sem hidrólise, com concentração de sacarose por volta de 36 g/L (concentração inicial e pulsos dados) suplementado com extrato de levedura e uma cepa de *Lactobacillus plantarum* isolada de uma cultura mista, obteve perto de 33 g/L de concentração final de ácido láctico, em um processo com dois pulsos e 50 horas de processo, que resultou em uma taxa de 90% de sacarose destinada à conversão para ácido láctico e células.

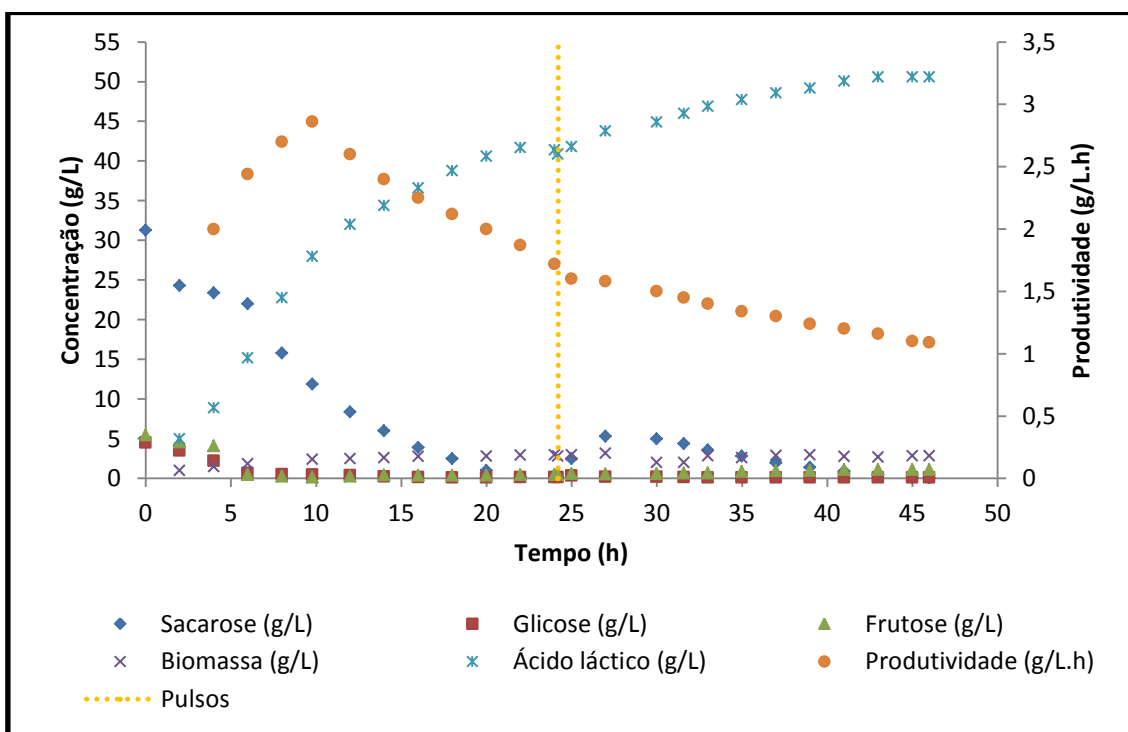


Figura 3.8. Perfis das concentrações das fermentações do melaço.

Portanto, ao fim da etapa de produção de ácido láctico, foi possível observar as diferenças de produtividade e rendimento de produto final obtidas, de acordo com a Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Dados obtidos nas fermentações realizadas.

Microrganismo	Concentração (g/L)	Produtividade (g/L.h)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	50,2	1,26
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	15,8	0,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50,6	1,1

É importante ressaltar que um dos objetivos iniciais do projeto era a aplicação de uma etapa de separação e purificação do ácido láctico produzido, a fim de se aumentar a concentração desse ácido para utilização como substrato da produção do ácido propiônico, próximo capítulo da dissertação. Entretanto, devido às concentrações encontradas, não foi necessária a realização desta etapa, pois as propionibactérias são sensíveis a altas concentrações de ácido láctico e sofreriam de inibição pelo substrato.

CAPÍTULO IV

Produção do ácido propiônico

Neste capítulo, serão apresentadas as condições de manutenção da cepa bacteriana usada para produção do ácido propiônico, o preparo do inóculo, a composição do meio, as fermentações realizadas e, por fim, os resultados obtidos.

3.1. FONTE DE CARBONO

Para a produção do ácido propiônico, foi usado o ácido láctico obtido na etapa anterior, ou seja, proveniente de fermentação.

3.2. MICRORGANISMO

A cepa usada foi a *Propionibacterium acidipropionici* CCT-4843 obtida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. De acordo com uma seleção feita por Coral (2008), esse é um dos gêneros que se mostrou com maior capacidade de conversão de ácido láctico para ácido propiônico. A escolha também se justifica pelo fato de que o grupo de pesquisas do LOPCA já possuía experiência e conhecimento para manipulação e manutenção desta cepa.

3.3. CULTIVO E MANUTENÇÃO DA CEPA

As culturas foram repicadas e mantidas em tubos contendo 7 mL de meio com ágar e composição de acordo com a Tabela 4.1, adaptado de Coêlho (2011), previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os inóculos foram mantidos em incubadora por 30 horas a 30°C.

Tabela 4.1. Composição do meio ágar de reativação.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de malte	10
Extrato de levedura	5
Peptona	10
Ágar	10
Glicose	10

Após o tempo de incubação, uma alíquota foi retirada de cada tubo de ensaio e transferida para outros tubos com 9 mL de meio, conforme composição descrita na Tabela 4.2, e mantidos nas mesmas condições anteriores.

Nesta etapa, é importante notar que o componente lactato de sódio já foi inserido, para ambientação da bactéria à principal fonte para a fermentação.

Tabela 4.2. Composição do meio de ativação (Coral *et al.*, 2008).

Componente	Concentração (g/L)
Lactato de sódio	10
Extrato de levedura	5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2
KH_2PO_4	20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1

Ao final das 30 horas, todo o volume final do tubo, ou seja 10 mL, foi inoculado em um erlenmeyer de 100 mL com 90 mL do mesmo meio. Entretanto, a concentração de lactato de sódio, que no meio de ativação era de 10 g/L, foi aumentada para 20 g/L nesta etapa. É importante salientar que, devido ao fato de ser uma bactéria anaeróbia, o processo,

até aqui, foi realizado sem agitação e em frascos em que o volume seja correspondente ao volume total de líquido, para diminuir a presença de oxigênio durante a preparação do inóculo.

O erlenmeyer foi mantido em incubadora a 30°C até que o inóculo atingisse absorvância de aproximadamente 0,8, a um comprimento de onda de 660 nm ($A_{660} \approx 0,8$) e, assim, estivesse pronto para ser usado na fermentação. Esta metodologia de acompanhamento do crescimento celular se mostrou presente nos trabalhos de Coêlho (2011) e Coral *et al* (2008).

3.4. FERMENTAÇÃO EM REATOR

Para o estudo da viabilidade do processo de produção de ácido propiônico a partir do ácido láctico fermentado, a seguinte metodologia foi estudada: os caldos obtidos diretamente após a fermentação do ácido láctico foram centrifugados, misturados, para se obter a concentração ideal de ácido láctico, e analisados em HPLC. Após isso, o caldo final foi suplementado com extrato de levedura, fonte de nitrogênio para o microrganismo, e com as mesmas concentrações de sais das etapas anteriores, e foi fermentado novamente. A metodologia descrita foi totalmente diferenciada, uma vez que não foi encontrado na literatura nenhum estudo que a propusesse.

O caldo resultante foi dividido em volumes iguais, já que o volume mínimo de trabalho do reator era de 2000 mL, e usado como meio de fermentação. Foram realizados dois processos onde cada um contou com 2475 mL de meio e 25 mL de inóculo, correspondente a 1% do volume total. Este valor de concentração de inóculo foi encontrada nos trabalhos de Coral *et al.*, (2008) e Coêlho (2011), que foram usados como base para o desenvolvimento desta parte da dissertação.

Pela ausência de trabalhos que explorem a produção do ácido propiônico a partir do ácido láctico fermentado, apenas a concentração do substrato no meio fermentativo foi usada como base. Coral, *et al.* (2008) observaram uma concentração ideal de ácido láctico sintético por volta de 40 g/L, pois notou que em concentrações acima de 50 g/L, há inibição do crescimento das propionibactérias.

O reator utilizado nesse processo foi o mesmo usado para a produção do ácido láctico, um New Brunswick, modelo BioFlo 415, com capacidade total de 7000 mL,

montado sobre uma base de controle que permite controlar algumas variáveis do processo, como temperatura, pH, turbidez, CO₂, agitação.

As condições de inóculo e fermentação foram adaptadas de Coêlho (2011) e Coral *et al.*(2008), com 1% de inóculo, agitação a 100 rpm, 30°C, pH mantido em 6, com a adição de uma solução de NaOH a 5M, 120 horas de processo e alimentação de gás N₂ antes do inóculo, para manter a anaerobiose. Amostras foram coletadas de 12 em 12 horas para acompanhar a fermentação.

3.5. METODOLOGIA ANALÍTICA

As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5810R. O sobrenadante foi filtrado em membranas millipore de 0,22 µm e usado para determinação das concentrações dos ácidos: propiônico, acético e láctico e o precipitado usado para determinação da concentração celular, essa última feita por peso seco (gravimetria).

As concentrações de ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico foram determinadas através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), marca Agilent, modelo 1260 Infinity Quaternary LC System. Foi usada uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H.

A fase móvel utilizada foi uma solução de H₂SO₄ 0,005 M, preparada com água ultra-pura (Milli-Q) e filtrada com membrana em éster de celulose com 0,45 µm de porosidade, numa taxa de fluxo de 0,6 mL/min, com volume de injeção de 15 µL a 30°C e tempo de corrida de 30 minutos, com 30 segundos de intervalo entre cada amostra. As áreas dos picos foram detectadas através dos detectores UV (ultravioleta) e RID (Índice de refração) e determinadas quantitativamente através do ajuste de curvas dos padrões sigma dos componentes (Coêlho, 2011).

Para determinação da concentração celular por gravimetria, o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e centrifugado. A massa celular foi colocada em tubos eppendorfs, previamente secos e pesados, e seca em estufa a 105°C por 4 horas.

3.6. RESULTADOS

A composição do caldo obtido da fermentação para produção do ácido láctico e usado no processo fermentativo para produção de ácido propiônico é apresentado na Tabela 4.3. São resultantes de análise prévia ao processo, realizada pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Tabela 4.3. Resultados da fermentação para produção do ácido propiônico.

Composição	
Volume final (mL)	5100
Concentração de ácido láctico (g/L)	40,5
Concentração de sacarose (g/L)	0,027
Concentração de glicose (g/L)	0,029
Concentração de frutose (g/L)	1,5

A partir da Tabela 4.3, é possível notar uma quantidade considerável de frutose proveniente do caldo de fermentação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. Observou-se que, inicialmente, esse açúcar foi preferencialmente degradado, com relação ao ácido láctico pela propionibactéria. Esse fator foi notado durante as análises cromatográficas das amostras retiradas nas fermentações. De acordo com Wang *et al.* (2012), as propionibactérias possuem uma preferência metabólica por monômeros, que é o caso da frutose. A sacarose também é um substrato de grande relevância nas pesquisas para produção de ácido propiônico, entretanto, sua quantidade residual, assim como a da glicose, não apresentou alteração significativa nas análises.

Entretanto, conforme é possível observar nas Figuras 4.1 e 4.2, foi somente após o esgotamento da frutose e, assim, começo da degradação considerável do ácido láctico é que houve uma produção brusca de ácido propiônico com, aproximadamente, 48 horas de processo.

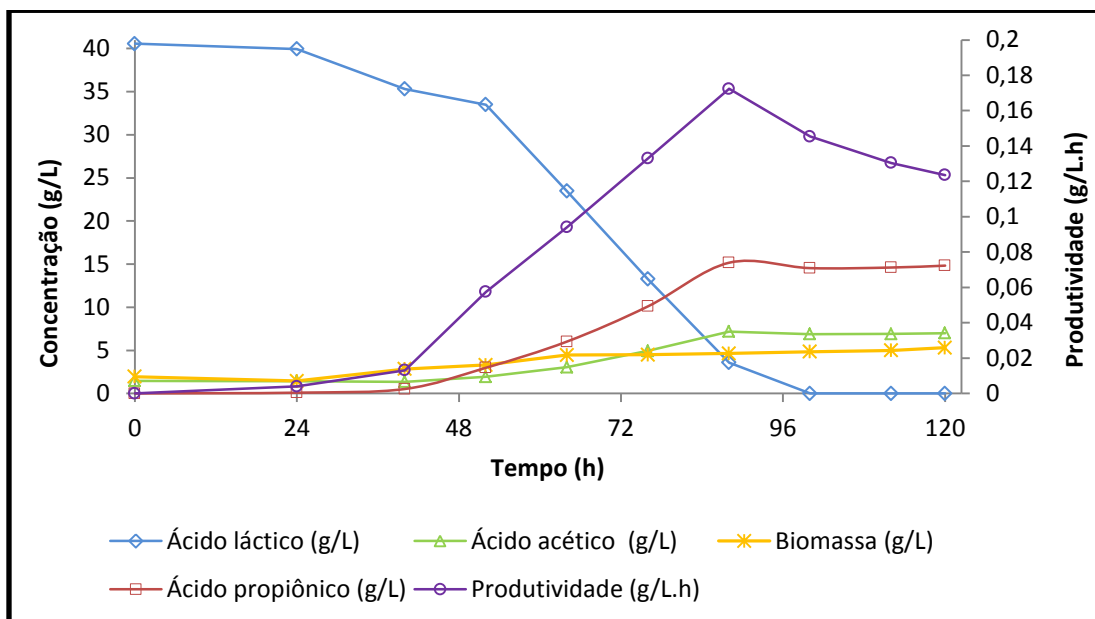


Figura 4.1. Comportamentos da degradação do substrato e da formação do produto, obtidos na primeira fermentação do ácido propiônico.

Coral *et al.* (2008) estudaram a viabilidade da produção de ácido propiônico a partir do ácido láctico sintético e encontraram um tempo ideal de fermentação de 144 horas de processo, com formação de aproximadamente 16 g/L de ácido propiônico, resultando em uma produtividade de 0,11 g/L.h.

Já no desenvolvimento deste trabalho, o valor máximo de concentração de ácido propiônico alcançado para a primeira fermentação foi de 14 g/L, com 96 horas de processo, apresentando uma produtividade de 0,144 g/L.h. Contudo, observa-se que o pico máximo foi alcançado com 84 horas de processo, onde havia uma concentração de 13,76 g/L e uma produtividade de 0,17 g/L.h.

A fermentação foi interrompida com 120 horas de processo devido ao comportamento da bomba de alimentação de base, para controle do pH, que já se apresentava estável.

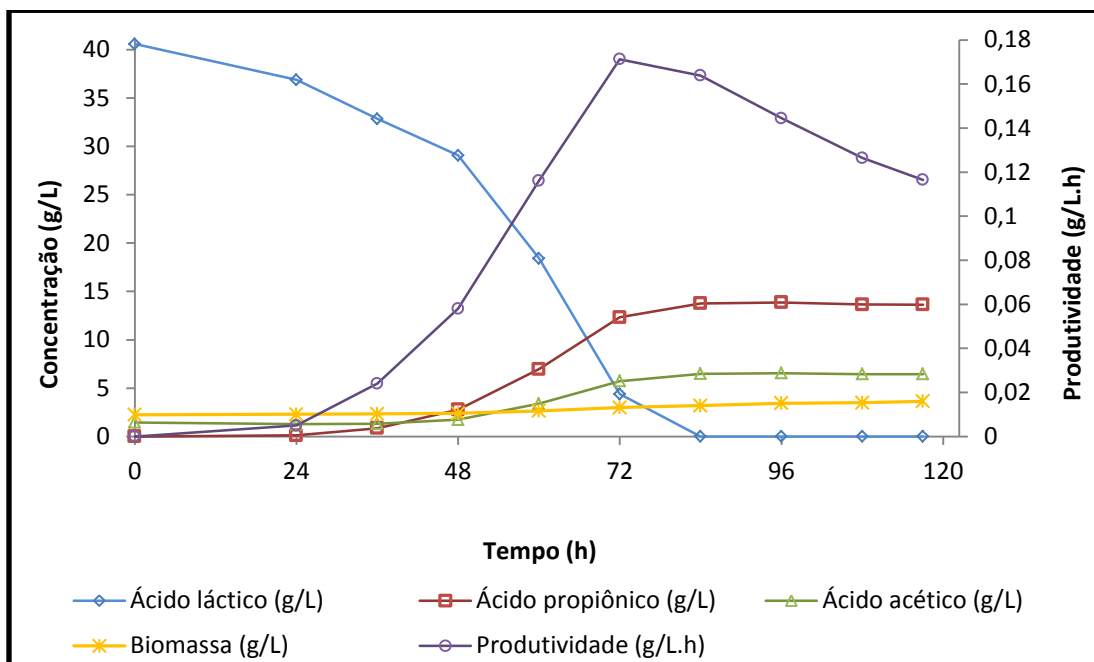


Figura 4.2. Comportamentos da degradação do substrato e da formação do produto, obtidos na segunda fermentação do ácido propiônico.

Na segunda fermentação, observou-se um comportamento muito parecido com a primeira, diferenciando-se pelo tempo de duração da fermentação, que foi interrompida com 117 horas, devido ao comportamento estável da bomba de base.

A bomba de alimentação de base do fermentador foi considerado um indicativo do esgotamento do substrato para fermentação, uma vez que quando essa bomba para, é porque a produção de ácido estagnou e não foi necessária a inserção de base para controle do pH.

Neste caso, houve a formação de uma quantidade máxima de 13,87 g/L de ácido propiônico, em 96 horas, com produtividade de 0,12 g/L.h.

Nas duas fermentações realizadas, nota-se que a formação de ácido acético foi baixa, apresentando um valor máximo de 6,9 g/L na primeira fermentação e 6,45 g/L na segunda. Na análise das amostras coletadas, observou-se que esse é o subproduto presente em maior quantidade durante a fermentação do ácido propiônico.

Entretanto, ao se analisar o balanço de massa da equação da transformação do ácido láctico em ácido propiônico, nota-se que a cada 3 mols de lactato conduzem à produção de

relação molar 2:1:1, ácido propiônico, ácido acético e dióxido de carbono, respectivamente, conforme a equação (4) apresentada no capítulo II. Desta forma, os rendimentos teóricos deveriam ser de 54,8% para o ácido propiônico, 22,2% de ácido acético, 16,3% de gás carbônico e 6,7% de oxigênio. Ao se considerar, então, a concentração de 40 g/L iniciais de ácido láctico disponível, têm-se que esses rendimentos teóricos corresponderiam a 22 g/L de ácido propiônico e 8,9 g/L de ácido acético.

Mas, de acordo como os resultados, foi obtido um rendimento de ácido propiônico de 64 % do teórico, ou seja, 14 g/L aproximadamente, e um rendimento de 77% do teórico para o ácido acético (7 g/L).

O baixo rendimento do ácido propiônico pode ter ocorrido, talvez, pelo fato de se ter usado uma concentração inicial de inóculo de apenas 1 % em relação ao volume total de fermentação.

Na maioria das vezes, as fermentações industriais acontecem com uma taxa de inóculo que varia na faixa de 10 a 14% (Aquarone *et al.*, 2001). No entanto, o comportamento do microrganismo e as condições devem ser estudados e considerados previamente à realização de um processo fermentativo.

CAPÍTULO V

Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

No capítulo V, serão apresentadas as conclusões do trabalho, bem como sugestões para trabalhos que venham a ser complementares à pesquisa.

5.1. CONCLUSÕES

Para a cepa de *Lactobacillus delbrueckii*, foi possível alcançar uma concentração final de 50,2 g/L de ácido láctico e produtividade de 1,26 g/L.h, com aproximadamente 40 horas de processo. No entanto, é tangível a redução do tempo da fermentação para 24 horas, onde se obteve uma produtividade de 1,89 g/L.h de ácido láctico. Todo o cenário sugere que, nas condições de trabalho, a *Lactobacillus delbrueckii* é capaz de metabolizar sacarose, glicose e frutose para ácido láctico.

Com uso da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* foi possível à produção de ácido láctico em concentração máxima de 15,8 g/L e produtividade final de 0,4 g/L.h. A avaliação das concentrações, durante a fermentação, permitiu notar a diminuição na concentração de sacarose e glicose e aumento na concentração de ácido láctico e frutose. Este fato sugere que, nas condições de trabalho, a *Leuconostoc mesenteroides* tem preferência para metabolizar a glicose para ácido láctico, já que se observa aumento na concentração de frutose à medida que a sacarose é metabolizada.

Já os resultados obtidos para a bactéria *Lactobacillus plantarum* mostraram que o processo, realizado em 46 horas, foi eficiente nas condições propostas, sendo capaz de atingir uma concentração final de 50,6 g/L de ácido láctico e produtividade de 1,1 g/L.h. As amostras retiradas permitiram o acompanhamento da degradação dos açúcares presentes no melaço da cana-de-açúcar em taxas proporcionais à formação do produto final de interesse.

O diferencial na proposta desta etapa foi a utilização de pulsos de solução de melaço de cana-de-açúcar, extremamente concentrada em sacarose, 173g/L, a fim de se chegar o mais próximo possível da condição inicial. Entretanto, devido ao volume destes pulsos dados, que correspondia ao volume de amostras retiradas até aquele momento, a concentração de sacarose no meio de fermentação ficava entre 5 e 10 g/L, dependendo do

processo. Mesmo em baixas concentrações, os pulsos proporcionaram um aumento na produtividade final para as 03 cepas estudadas.

No estudo da viabilidade da fermentação do ácido láctico fermentado para produção do ácido propiônico pela cepa *Propionibacterium acidipropionici*, constatou-se a capacidade desta bactéria converter o ácido láctico em ácido propiônico. As concentrações finais do ácido propiônico obtidas foram de 14 g/L no primeiro processo e 13,87 g/L no segundo. Esses valores fornecem uma produtividade de 0,144 e 0,12 g/L.h, respectivamente, com 96 horas de processo.

Essa etapa do trabalho é considerada diferenciada, uma vez que o substrato utilizado foi o ácido láctico proveniente da fermentação, e não sintético, conforme pesquisas apresentadas no capítulo IV para comparação dos resultados.

O trabalho apresentou a produção sucessiva de dois ácidos, láctico e propiônico, por vias totalmente biotecnológicas, ou seja, nenhuma etapa do processo fez uso de síntese química, apresentando uma solução viável e ecologicamente sustentável.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com vista nos resultados obtidos, as sugestões para a continuidade da pesquisa são:

- Estudo da viabilidade da substituição do extrato de levedura por outra fonte de nitrogênio alternativa, na produção do ácido láctico.
- Problemas com relação à inibição pela formação do produto final, o ácido propiônico, foram observados. Um ponto interessante de exploração seria o estudo de técnicas de separação do produto, juntamente com a fermentação, a fim de se reduzir a inibição pelo ácido propiônico.
- Estudo da otimização do processo, com variações no substrato e na biomassa.
- Execução, através de processos viáveis e biodegradáveis, da separação e purificação do ácido propiônico.

Referências Bibliográficas

ADSUL, M., KHIRE, J. BASTAWDE, K.; GOKHALE, D. Production of lactic acid from cellobiose and cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, p. 5055-5057, 2007.

ALMAZAN, O., GONZALEZ, L., GALVEZ, L. The sugar cane, its by-products and coproducts. **Food and Agricultural Research Council**, AMAS 1998.

ARASARATNAM, V.; GULLÓN, B.; YÁÑEZ, R.; PARAJÓ, J. C. L-lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, v. 12, p. 308-319, 2006.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. **Editora Blucher**, 1ª edição, São Paulo, 2001.

BERMÚDEZ J., J. H. Produção de ácido acrílico de fonte renovável a partir do ácido láctico por fermentação do melaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado**, Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

CAPELLARI, J. B. Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais. **Dissertação de Mestrado**, Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

CASSETTA, M. A.; CELLIGOI, P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S.. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 15, p. 2824–2828, 2007.

CHAUHAN, M. K.; CHAUDHARY, S.; KUMAR, S. Life cycle assessment of sugar industry: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, n. 7, p. 3445–3453, setembro, 2011.

COÊLHO, D. G. Modelagem e otimização do processo de síntese do ácido propanoico via fermentação do glicerol. **Dissertação de Mestrado**, Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

COELHO. L.; DE LIMA, J.; BERNARDO, M.; CONTIERO, J. D-(-)-Lactic Acid Production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.164, p.1160–1171, 2011.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, abril/2013 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2013.

CORAL, J.; KARP, S. G.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PARADA, J. L. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 151, p.333-341 2008.

DATTA, R., HENRY, M. Review Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 81, pgs 1119-1129, 2006.

DISHISHA, T., STAHL, A., LUNDMARK, S., HATTI-KAUL, R. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 504-512, 2013.

DJUKIC'-VUKOVIC', A. P.; MOJOVIC', L. V., JOKIC', B. M.; NIKOLOC', S. B.; PEJIN, J. D. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 454-458, 2013.

DUMBREPATIL, A. et al. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, p. 333-335, 2008.

FAO, WHO. Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and specifications. In *Seventeenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee*, v. 539, 1974.

FENG, X.; CHEN, F.; XU, H.; WU, B.; LI, H.; LI, S.; OUYANG, P. Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6141-6146, 2011.

GHORBANI, F.; YOUNESI, H.; SARI A. E.; NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, v. 36, n. 2, p. 503–509, Fevereiro, 2011.

GOSWAMI, V.; SRIVASTAVA, A. K..Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biochem. Eng. J.*, v., p. 121-128, 2000.

GU, Z.; GLATZ, A. B.; GLATZ, C. E. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. *Enzyme and Microbial Tecnology*, v. 22, p. 13-18, 1998.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p 738-747, 2009.

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, p. 435-440, 2000.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 87-107, 2000.

IHS Chemical. Lactic acid, Its Salts and Esters. Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/propionic-acid.aspx>. Acessado em 24 de julho de 2013, às 18:20 hrs.

IHS Chemical. Propionic acid. Março, 2013. Disponível em: <http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/propionic-acid.aspx>. Acessado em 24 de julho de 2013, às 18:45 hrs.

JAMES, G. *Sugarcane*. Editora Blackwell Science, 2ª edição, 2004.

JIN, Z.; YANG, S. T. Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol. Prog.*, v.14, p. 457-465, 1998.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. *Survival*, v. 24, p. 3105-3109, 2008).

KADAM, S. R.; PATIL, S. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*, v. 41, p.120-126, 2006.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; CARVALHO, J. C.; VANDENBERGUE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CORAL, J.; THOLOZAN, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from soybean vinasse at laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 1765-1772, 2011.

LI, L.; EOM, H. J.; PARK, J. M.; SEO, E.; AHN, J. E.; KIM, T. J.; KIM, J. H.; HAN, N. S. Characterization of the major dehydrogenase related to D-lactic acid synthesis in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* ATCC 8293. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 51, p. 274-279, 2012.

LUI, S.; HAN, Y.; ZHOU, Z. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, v. 44, n.3, p.643–651, 2011.

LUNELLI, B. H. Produção e controle da síntese do éster de ácido acrílico através da fermentação do ácido láctico. **Tese de Doutorado**, Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; SALGADO, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ, A. C.; OLIVEIRA, R. P. S. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in food Science & technology*, v. 30, p. 70-83, 2013.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. **Wiley-Blackwell**, cap.1, p.3-33, 2005.

MOHAMMED, A. A. R.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, In Press, 2011.

MONTEAGUDO, J. M.; RODRÍGUEZ, L.; RINCO, J.; FUERTES, J. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 68, p. 271-276, 1997.

NAKANO, S.; UGWU, C., U.; TOKIWA, Y. Efficient production of D-(-)lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as a neutralizing agent. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 791-794, 2012.

OKANO, K.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. A biotechnological production of enantiomeric pure acid lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 85, p. 413-423, 2010.

PASTEUR, L. *Studies on fermentation*. London, 1879.

QUEIRÓZ, J. Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarose por *Leuconostoc mesenteroides*. **Dissertação de Mestrado**, Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1987.

RAMSAY, J. A.; ALY HASSAN, M.-C.; RAMSAY, B. A.; Biological conversion of hemicelluloses to propionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 292-295, 1998.

RASHI, R. Optimization and modeling of lactic acid production from pineapple waste. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Química e Engenharia de Recursos Naturais, Universidade Tecnológica da Malásia, Malásia, 2008.

- REHM, H. J.; REED, G. *Biotechnology Vol.I – Microbial Fundamentals*, Verlag Chemie, 1981.
- ROJAN, J.; ANISHA, G.; NAMPOOTHIRI, M.; PANDEY, A. Direct lactic acid fermentation: Focus on Simultaneous Saccharification and Lactic Acid Production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 145–152, March 2009.
- SHERMAN, J. M.; SHAW, R. H. The propionic acid fermentation of lactose. United States Department of Agriculture, Washington, 1923.
- SILVEIRA, M. S. Utilização do suco de caju clarificado para produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442. **Dissertação de Mestrado**, Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 2009.
- STOYANOVA, L. G.; USTYUGOVA, E. A.; NETRUSOV, I. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry*, v. 48, p. 229-243, 2012.
- TANASHIRO, Y.; KANEKO, W.; SUN, Y.; SHIBATA, K.; INOKUMA, K.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* QU 41. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 89, p. 1741-1750, 2011.
- THOLOZAN, J. L.; TOUZEL, J. P.; SAMAIN, E.; GRIVET, J. P.; PRENSIER, G.; ALBAGNAC, G. *Clostridium neopropionicum* sp. nov., a strict anaerobic bacterium fermenting ethanol to propionate through acrylate pathway. *Archives of Microbiology*, v. 157, p. 249-257, 1992.
- TIMBUNTAN, W.; SRIROTH, K.; TOKIWA, Y. Lactic acid production from sugar cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp.. *Biotechnol. Lett.* v. 28, p. 811–814, 2006.
- TRINDADE, M. C. Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas surfactantes. **Dissertação de Mestrado**, Escola de Engenharia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- WAAK, R. S.; NEVES, M. F. Competitividade no agribusiness brasileiro. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, v. V, 1998.

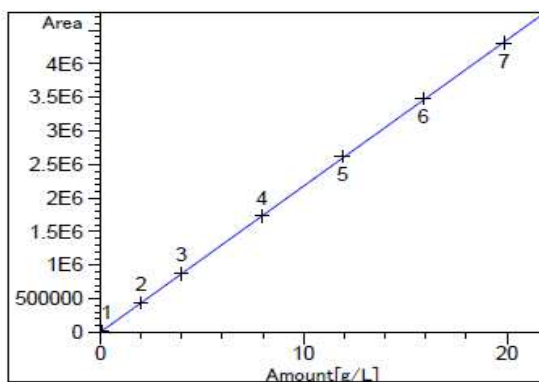
- WANG, L.; ZHAO, B.; LI, F.; XU, K.; MA, C.; TAO, F.; LI, Q.; XU, P. Highly Efficient Production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with Simultaneous Enzymatic Hydrolysis of Peanut Meal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 89, n. 4, p. 1009–1017, 2011.
- WANG, P.; WANG, Y.; SU, Z. Microbial production of propionic acid with *Propionibacterium freudenreichii* using an anion exchanger-based in situ product recovery (ISPR) process with direct and indirect contact of cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 166, p. 974-986, 2012.
- WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol. Bioetchnol.*, v. 44, n. 2, p. 163–172, 2006.
- WOSKOW, S. A., GLATZ, B. A. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation. *Appl. Env. Microbiol.*, p. 2821-2828, 1991.
- YOON, H. S.; SON, Y. J.; HAN, J. S.; LEE, J. S.; HAN, N. S. Comparison of D- and L-lactic acid contents in commercial kimchi and sauerkraut. *Food Science and Biotechnology*, v. 14, p. 64-67, 2005.
- ZÁRATE, G.; CHAIA, A. P. Influence of lactose and lactate on growth and β -galactosidase activity of potential probiotic *Propionibacterium acidipropionici*. *Anaerobe*, v. 18, p. 25-30, 2012.
- ZHANG, D.; FENG, X.; ZHOU, Z.; XU, H. Economical production of poly (γ -glutamic acid) using untreated cane molasses and monosodium glutamate waste liquor by *Bacillus subtilis* NX-2. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 583-588, 2012.
- ZHANG, Y.; VADLANI, P. V. D-lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2013.
- ZHU, Y.; LI, J.; TAN, M.; LIU, L.; JIANG, L.; SUN, J.; LEE, P.; DU, G.; CHEN, J. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8902-8906, 2010.

ANEXOS

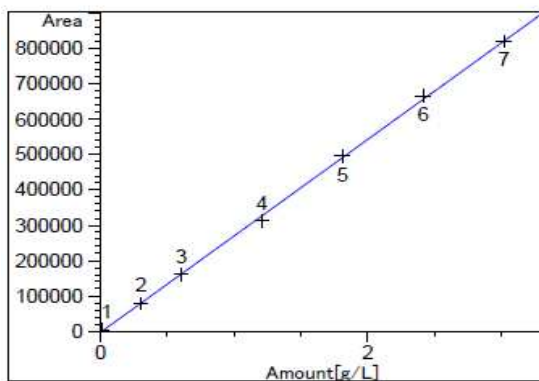
**ANEXO I – RÓTULO PARA IDENTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS
ORIGINADOS DURANTE O TRABALHO**

RESÍDUO QUÍMICO			
Substitua esta frase com o nome da sua Unidade por extenso			
Departamento:		Data ou período	
Laboratório:			
Responsável pelas informações:			
Resíduo gerado na análise de:		pH =	
PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO			
O RESÍDUO CONTEM (preencha SIM OU NÃO para cada item)			
HALOGENADOS		PRESENÇA DE ENXOFRE OU SUBSTÂNCIAS SULFURADAS	
ACETONITRILA		GERADOR DE CIANETOS	
METAIS PESADOS		AMINAS	
COMPOSTOS (Inclusive água)		PORCENTAGEM NO RESÍDUO	
ATENÇÃO: Utilize apenas 75% do volume do frasco			

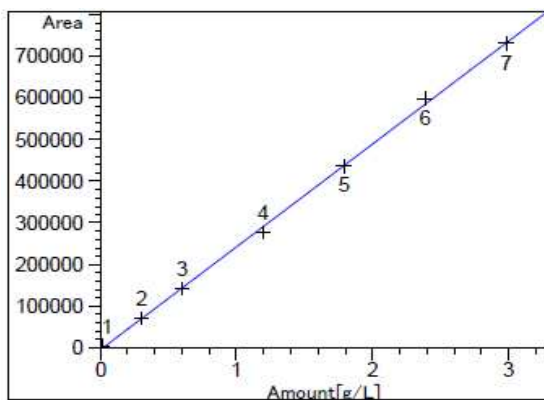
ANEXO II – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS AÇÚCARES E ÁCIDO LÁCTICO



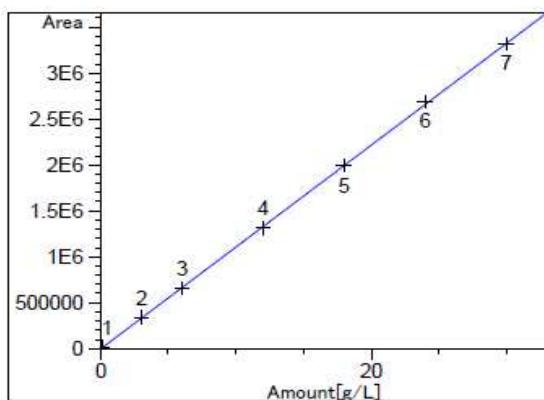
sacarose at exp. RT: 7.573
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99996
Residual Std. Dev.: 15699.13568
Formula: $y = mx + b$
m: 217899.09291
b: 5473.46825
x: Amount
y: Area



glicose at exp. RT: 8.924
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99973
Residual Std. Dev.: 7890.63139
Formula: $y = mx + b$
m: 273252.91532
b: -3551.54592
x: Amount
y: Area

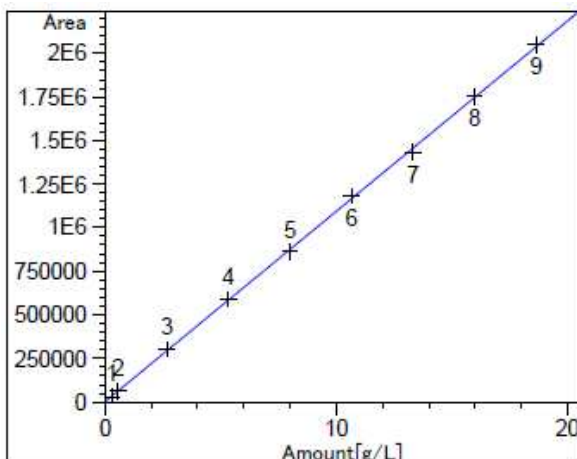


fructose at exp. RT: 9.821
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99963
Residual Std. Dev.: 8183.47936
Formula: $y = mx + b$
m: 247490.66907
b: -3614.65077
x: Amount
y: Area

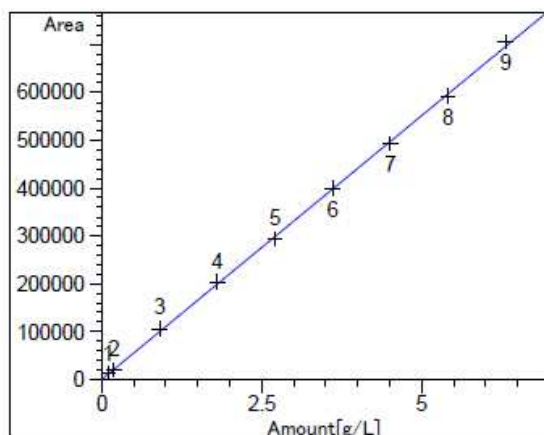


acido lactico at exp. RT: 12.914
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99994
Residual Std. Dev.: 15221.35506
Formula: $y = mx + b$
m: 111150.42092
b: -2241.46039
x: Amount
y: Area

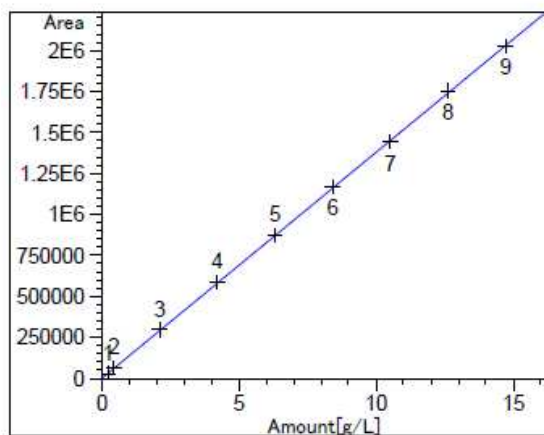
ANEXO III – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDOS LÁCTICO E PROPIÔNICO



acido lactico at exp. RT: 12.858
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99988
Residual Std. Dev.: 12431.33963
Formula: $y = mx + b$
m: 109430.08511
b: 783.15766
x: Amount
y: Area



acido acetico at exp. RT: 15.549
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99982
Residual Std. Dev.: 5217.43250
Formula: $y = mx + b$
m: 110274.83376
b: 1072.78514
x: Amount
y: Area



acido propanoico at exp. RT: 18.326
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99997
Residual Std. Dev.: 6340.10167
Formula: $y = mx + b$
m: 138069.22707
b: 2558.13956
x: Amount
y: Area

PUBLICAÇÕES

USO DA BACTÉRIA *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* CCT 3744 NA PRODUÇÃO DE L-ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

B. TORRES DA SILVA¹, J. H. BERMÚDEZ JAIMES¹, B. H. LUNELLI¹, M.R. WOLF MACIEL¹, R. MACIEL FILHO¹, A. T. MORITA² e P. L. A. COUTINHO²

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado-LOPCA

²BRASKEM

E-mail para contato: brunatorres@feq.unicamp.br

RESUMO – Ao se considerar o desenvolvimento de produtos químicos ecoamigáveis, que tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos, é importante ressaltar a demanda e a importância do ácido láctico na indústria. Junto com seus derivados químicos, como seus biopolímeros, esses produtos formam um grupo de compostos de alto valor agregado, quando provenientes de sínteses de fontes renováveis. Esse interesse levou ao estudo da produção do L-ácido láctico via fermentativa, a partir de melaço de cana-de-açúcar. No presente trabalho, melaço de cana-de-açúcar foi fermentado pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744 durante 39,7 horas em fermentador BioFlo 415 nas seguintes condições: concentração de sacarose de 32,8 g/L, concentração de levedura de 6 g/L, temperatura de 40 °C, pH igual a 5, agitação de 200 rpm e pulsos de melaço de cana-de-açúcar de 173 g/L de sacarose a 24,2 h e 29,7 h de fermentação. No final da fermentação as concentrações dos principais açúcares do melaço (sacarose, glicose e frutose) junto com o ácido láctico foram quantificadas por meio da técnica analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obtendo como resultado uma concentração final de 50,2 g/L de ácido láctico com produtividade de 1.26 g/L.h.

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico é um ácido carboxílico muito importante na indústria por ser de versátil aplicação, rentabilidade e poder ser obtido de fonte renovável. É usado na fabricação de alimentos, com uma demanda de aproximadamente 85%, sendo o restante distribuído em outros tipos de indústrias. De acordo com Rojanet *al.* (2009), nos últimos anos, o ácido láctico tem ganhado espaço na produção de produtos biodegradáveis, principalmente na síntese de polímeros para uso médico, como suturas, próteses e medicamentos controlados. Neste contexto é importante ressaltar que o uso do material polimérico, nessas aplicações, depende da isomeria do ácido láctico usado como monômero o que ressalta a importância da produção de ácido láctico via fermentativa. Isto se deve ao fato, de que em comparação com a síntese química deste ácido, a produção por meio da via fermentativa torna possível a obtenção do isômero selecionado ou de uma mistura racêmica a partir das bactérias do ácido láctico. Nesse sentido, no presente trabalho foi usada a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744, adquirida da Fundação André Tosello, uma

bactéria do ácido láctico homofermentativa que apresenta bons rendimentos na produção de *L*-ácido láctico a partir do caldo e do melaço de cana-de-açúcar com temperatura de trabalho de 42 °C e pH de 4-6 (Dumbrepatil et al., 2008; Kadam et al., 2006). Outro ponto a ser considerado é que o ácido láctico pode ser obtido a partir de matéria-prima vegetal como o melaço de cana-de-açúcar, considerado resíduo agroindustrial na produção de açúcar e álcool.

2. METODOLOGIA

O melaço de cana-de-açúcar utilizado durante todos os ensaios foi obtido da Usina Costa Pinto S.A. de Piracicaba – SP, safra 2012 e estudado em sua forma não hidrolisada.

A princípio, foram realizados estudos exploratórios, a fim de se analisar as condições que favorecessem a formação do produto final de interesse. Assim, a cepa obtida da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia foi reativada em meio MRS ágar por 48 horas à temperatura de crescimento, 37°C. Após esse período, uma alíquota foi retirada e transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio MRS líquido. As condições anteriores foram mantidas. Depois desse tempo, 5 mL foram retirados do tubo e adicionados à um erlenmeyer de 125 mL, com 45 mL de meio MRS líquido e, mais uma vez, mantido nas mesmas condições. 300 mL de solução de melaço de cana-de-açúcar foram preparados em erlenmeyer contendo 14% v/v de inóculo e concentrações conhecidas de sacarose (14 g/L, 23 g/L e 33 g/L) e extrato de levedura conhecido (2 g/L, 4 g/L e 6 g/L). Logo, a fermentação foi conduzida em Shaker, Marconi MA 832, nas temperaturas de 40°C, 43°C e 46°C durante 24 h a 200 rpm. Então, amostras de 4 mL foram coletadas nos tempos 6, 10 e 24 horas para acompanhar o processo.

A melhor condição encontrada nos estudos exploratórios foi aplicada no fermentador BioFlo 415. As primeiras três etapas foram realizadas da mesma forma do estudo prévio. Para substituir a última etapa, foi usado um erlenmeyer de 1000 mL com 450 mL de meio MRS líquido e os 50 mL totais provenientes da fase antecedente. Os 500 mL foram mantidos em shaker a 150 rpm, por 30 horas, para compor o inóculo da fermentação. Passado esse período, foram transferidos 420 mL de inóculo em 2580 mL de meio, composto pelas melhores condições. A rotação foi estabelecida em 200 rpm, o tempo foi de 30 horas e o pH foi controlado em 5 pela adição de NaOH 4M. Um pulso de 72 mL de melaço diluído foi dado com 24 horas e outro com aproximadamente 30 horas de processo com uma concentração de 173 g/L de sacarose, a fim de manter a produção do ácido. Amostras de 4 mL eram retiradas de 2 em 2 horas para acompanhar o processo.

As concentrações de sacarose, glicose, frutose e ácido láctico foram quantificadas através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência usando um cromatógrafo Agilent, modelo 1260 Infinity Quaternary LC System equipado com uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H e detector de índice de refração. A concentração de biomassa foi determinada pelo método gravimétrico. A pureza ótica do ácido láctico foi confirmada usando o kit *D*-Lacticacid/*L*-Lacticacid UV-method, Cat. No. 11 112 821 035, BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis/FoodAnalysis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos estudos exploratórios se observou que as melhores concentrações de ácido láctico foram para 40 °C e 46 °C com concentrações de sacarose e extrato de levedura de 33 g/L e 6 g/L, respectivamente (Tabela 1). No entanto, a fermentação em biorreator BioFlo 415 foi realizada a 40 °C por ser a menor temperatura. Durante a fermentação, a temperatura, a agitação, o pH e o funcionamento da bomba de alimentação da solução de NaOH foram monitorados. Assim, os pulsos de solução de melaço de cana-de-açúcar foram dados nos momentos em que se observou que a bomba de base não estava alimentando o reator.

Tabela 1. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
40	14	2	7,2	43	23	6	8,6
40	14	4	7,7	43	33	2	8,8
40	14	6	8,5	43	33	4	9,0
40	23	2	8,6	43	33	6	10,0
40	23	4	8,8	46	14	2	10,3
40	23	6	9,5	46	14	4	5,1
40	33	2	10,0	46	14	6	6,5
40	33	4	10,1	46	23	2	6,3
40	33	6	10,3	46	23	4	5,0
43	14	2	7,1	46	23	6	6,2
43	14	4	7,9	46	33	2	6,2
43	14	6	8,4	46	33	4	5,1
43	23	2	8,4	46	33	6	5,7
43	23	4	7,2	-	-	-	-

Já no início da fermentação no biorreator BioFlo 415 se observou um aumento na concentração inicial de sacarose para 43,3 g/L, erro que se apresentou devido ao projeto do biorreator 415, o qual tem perda de vapor durante a esterilização do meio fermentativo (Figura 1). Para acomodar esta característica do fermentador um procedimento operacional adequado deve ser realizado.

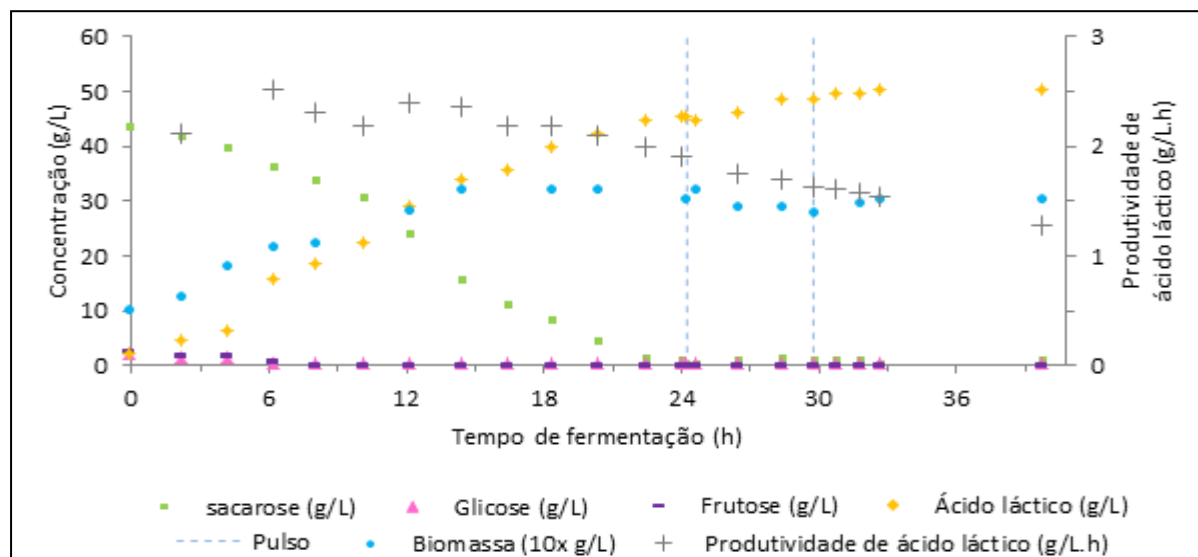


Figura 1. Comportamento da fermentação em função do tempo.

A análise das amostras tomadas durante a fermentação permitiram observar que durante as primeiras 6 horas de processo, as concentrações de glicose (0,24 g/L) e de frutose (0,71 g/L) já tinham diminuído à sua totalidade, enquanto que a concentração de sacarose (33 g/L) se mantinha constante. Isso mostra pouca preferência da bactéria pelos monômeros de açúcares. Logo após o esgotamento dos mesmos, o microrganismo começou a degradar o dímero mais rapidamente, justificado pela queda acentuada observada no gráfico, além dos dois picos máximos de produtividade observados. Portanto, é possível afirmar que o *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744 é capaz de metabolizar todos os açúcares presentes em produto de interesse, pois já com esse mesmo tempo de processo, analisa-se uma considerável concentração de ácido láctico (15,51 g/L) no meio. Antes do primeiro pulso, observa-se que a produtividade estava alta, em 1,75 g/L.h, com uma concentração de 42 g/L de ácido láctico. Após os dois pulsos, com uma concentração final de 50 g/L de produto, a produtividade caiu para 1,67 g/L.h e 39,7 horas de processo. Com valores tão próximos, é viável que um tempo reduzido de fermentação, 24 horas, seja aplicado para uma produção satisfatória de ácido láctico.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram identificadas as condições de operação para a produção de *L*-ácido láctico usando a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* CCT 3744 usando melaço de cana-de-açúcar como meio de fermentação. Foi obtida uma concentração final de 50,2 g/L e produtividade de 1,26 g/L.h. No entanto, é tangível a redução do tempo da fermentação para 24 horas, onde se obteve uma produtividade de 1,89 g/L.h de ácido láctico. Todo o cenário sugere que, nas condições de

trabalho, a *Lactobacillus delbrueckii* é capaz de metabolizar sacarose, glicose e frutose para ácido láctico.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq, BRASKEM e FAPESP (Processo 2008/03694-5) pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- DUMBREPATIL, A.; ADSUL, M.; CHAUDHARI, S.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 1, p. 333–335, 2008.
- KADAM, S.; PATIL, S.; BASTAWDE, K.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process. Biochem.*, v. 41, p. 120-126, 2006
- ROJAN, J.; ANISHA, G.; NAMPOOTHIRI, M.; PANDEY, A. Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p.145–152, 2009.

PRODUÇÃO DE *D*-ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* CCT 4357

J. H. BERMÚDEZ JAIMES¹, B. TORRES DA SILVA¹, B. H. LUNELLI¹, M.R. WOLF MACIEL¹, R. MACIEL FILHO¹, A. T. MORITA² e P. L. A. COUTINHO²

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado-LOPCA

²BRASKEM

E-mail para contato: johnhervinbermudez@gmail.com

RESUMO – Nos últimos anos, o ácido láctico tem ganhado importância na produção de biopolímeros com uso biomédico, o que tem elevado o interesse na produção de ácido láctico com características específicas sem a presença de solventes. Assim, esse trabalho teve como objetivo a produção do *D*-ácido láctico em fermentação batelada de melaço de cana-de-açúcar pela bactéria por *Leuconostoc mesenteroides* CCT 4357 durante 39,5 h em fermentador BioFlo 415, com 32,8 g/L de sacarose, 6 g/L de levedura, 32 °C, pH de 5, 200 rpm e dois pulsos de melaço de cana-de-açúcar de 221,6 g/L de sacarose à 21,6 h e 29,0 h de fermentação. No final da fermentação, obteve-se 15,8 g/L de ácido láctico com produtividade de 0,4 g/L.h.

1. INTRODUÇÃO

Por décadas, o ácido láctico tem apresentado excelente importância na indústria dos alimentos, têxtil, couros, farmacêutica e como matéria prima para produtos químicos renováveis, convertendo-se no ácido orgânico de maior concorrência nos últimos anos. Estima-se que a demanda do ácido láctico tem aumentado devido ao interesse nos produtos químicos eco-amigáveis e seu amplo espectro de utilização. Além disso, o ácido láctico ganha importância na síntese de bio-polímeros onde sua pureza isomérica é requerida. Neste sentido, o ácido é produzido por fermentação de matéria-prima vegetal com uso das bactérias do ácido láctico (LAB). Estas bactérias são descritas como organismos anaeróbicos facultativos, Gram (+), não esporogênicas, catalase negativa, citocromo ausente, exigentes quanto aos fatores nutricionais, tolerantes a ácido, estritamente fermentativas com a formação do ácido láctico como principal produto da degradação de açúcar, e aceitas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para o organismo humano (Lunelli, 2010; Mayoet *et al.*, 2010). Segundo o metabolismo fermentativo, são classificadas principalmente em LAB homofermentativas (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, e alguns *Lactobacillus*) e LAB heterofermentativas (*Leuconostoc*, *Oenococcus*, e alguns *Lactobacillus*); nomes que foram propostos por Orla-Jensen em 1919 (Mayoet *et al.*, 2010). Das LAB, a *Leuconostoc mesenteroides* é capaz de produzir *D*-ácido láctico a partir dos açúcares redutores do melaço de cana-de-açúcar (Coelho *et al.*, 2011), um substrato considerado resíduo

agroindustrial da indústria açucareira, barato, abundante na região de São Paulo, com aproximadamente 61% de açúcares redutores (sacarose, glicose e frutose) e nutrientes essenciais para o crescimento de LAB (Lunelli, 2010; Coelho et al., 2011). Coelho *et al.*, (2011) usaram a *Leuconostoc mesenteroides* B512 para avaliar o uso de substratos baratos (melaço, caldo de cana-de-açúcar e soro de queijo) e investigar o efeito da fonte carbono (extrato de levedura, levedura autolisada, milhocina, proteína de algodão) no meio na produção de *D*-ácido láctico.

Portanto, a pesquisa teve como objetivo principal produzir *D*-ácido láctico a partir da fermentação de melaço de cana-de-açúcar pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* CCT 4357.

2. METODOLOGIA

Para a produção de ácido láctico, foi usado o melaço de cana-de-açúcar, não hidrolisado, obtido da Usina Costa Pinto S.A. de Piracicaba – SP, safra 2012. A bactéria *Leuconostoc mesenteroides* CCT 4357 foi adquirida da Fundação André Tosello.

Estudos prévios em Shaker, Marconi MA 832, foram realizados para determinar a concentração de sacarose, extrato de levedura e temperatura de trabalho, antes da fermentação em biorreator BioFlo 415. Para tanto, a *Leuconostoc mesenteroides* foi reativada em meio MRS ágar por 48 h à 26 °C. Passado esse tempo, uma alíquota foi retirada e transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de meio MRS líquido e mantida por 48 h a temperatura de crescimento. Após esta etapa, 5 mL foram retirados do tubo e adicionados em erlenmeyer de 125 mL, com 45 mL de meio MRS líquido e, novamente, mantido nas mesmas condições durante 48 h. Na etapa final, 300 mL de solução de melaço de cana-de-açúcar foram preparados em erlenmeyer contendo 14% v/v de inóculo e concentrações conhecidas de sacarose (14 g/L, 23 g/L e 33 g/L) e extrato de levedura conhecido (2 g/L, 4 g/L e 6 g/L). O próximo passo consistiu das fermentações realizadas a 29 °C, 32 °C e 35 °C durante 24 h e 200 rpm. Então, amostras de 4 mL foram coletadas nos tempos 6 h, 10 h e 24 h para acompanhar o processo.

Após estudos prévios realizados em Shaker, a fermentação foi conduzida em biorreator BioFlo 415 de 7 L nas melhores condições de temperatura e concentrações de sacarose e de extrato de levedura encontradas. A etapa se iniciou com a preparação do cultivo nas condições usadas nos estudos prévios para os três primeiros passos. O conteúdo do Erlenmeyer (50 mL) foi adicionado em outro Erlenmeyer de 1000 mL contendo 450 mL de meio MRS líquido e mantido por 30 h em Shaker na temperatura ideal. Finalmente, 2580 mL de solução de melaço de cana-de-açúcar composto pelas melhores condições de concentração de sacarose e extrato de levedura foram adicionados no biorreator. O preparo do meio de fermentação se deu com a adição de 150 mL de água para evitar a concentração do substrato além da requerida, devido a perdas de vapor que ocorrem durante a esterilização. A seguir, a mistura anterior foi esterilizada a 121°C durante 30 minutos. Após resfriamento, 420 mL de inóculo foram adicionados no biorreator a temperatura de trabalho determinada nos estudos prévios e 200 rpm, dando início a fermentação. Durante a fermentação o pH foi mantido para 5 por adição de solução 4N NaOH, e houve a

adição de pulsos de 90 mL e 40 mL de solução de melaço de cana-de-açúcar (221,6 g/L de sacarose), dados à 21 h e 27 h, e amostras de 4 mL foram tomadas a cada 2 h, aproximadamente.

A concentração de sacarose, glicose, frutose e ácido láctico foram quantificados através de análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A concentração de biomassa foi determinada por método gravimétrico e a pureza ótica do ácido láctico foi confirmada usando o kit *D*-Lactic acid/*L*-Lactic acid UV-method, Cat. No. 11 112 821 035, BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM EnzymaticBioAnalysis/FoodAnalysis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos estudos prévios se determinou que as melhores condições de fermentação foram para 32 g/L de sacarose, 6 g/L de extrato de levedura e 32 °C com produção de 9,2 g/L de ácido láctico (Tabela 1). Assim, na fermentação em biorreator BioFlo 415 foram usadas essas condições. No entanto, na tentativa de evitar a concentração de substrato no biorreator além da requerida, pelas características de projeto do fermentador, na etapa de esterilização se operou com uma diminuição da concentração sacarose para 26,8 g/L. Durante a fermentação a temperatura, agitação, pH e o funcionamento da bomba de alimentação de NaOH foram monitoradas. Assim, os pulsos de solução de melaço de cana-de-açúcar foram dados em momentos em essa bomba de alimentação ficou em torno de uma hora sem funcionamento.

Tabela 1. Resultados obtidos nos estudos prévios a 24 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Temperatura (°C)	Sacarose (g/L)	Levedura (g/L)	Ácido láctico (g/L)
29	14	2	5,3	32	23	6	7,8
29	14	4	5,1	32	33	2	9,0
29	14	6	4,7	32	33	4	8,7
29	23	2	6,2	32	33	6	9,2
29	23	4	6,0	35	14	2	5,6
29	23	6	6,0	35	14	4	6,7
29	33	2	6,8	35	14	6	6,3
29	33	4	7,0	35	23	2	8,1
29	33	6	7,0	35	23	4	7,7
32	14	2	5,3	35	23	6	7,6
32	14	4	5,2	35	33	2	8,7
32	14	6	5,3	35	33	4	8,6
32	23	2	6,1	35	33	6	8,3
32	23	4	6,7	-	-	-	-

As análises das amostras da fermentação permitiram analisar o comportamento da sacarose, glicose, frutose, ácido láctico, biomassa e produtividade (Figura 1). Foi observado uma maior

produtividade do ácido láctico (1,34 g/L.h) nas primeiras 9 h de fermentação com concentração de 12,3 g/L. Nesse tempo, se observou diminuição na concentração de sacarose e glicose; as concentrações dos açúcares foram 1,1 g/L de sacarose, 0,4 g/L de glicose (1,1 g/L e 0,4 g/L, respectivamente), enquanto a concentração de frutose e biomassa aumentaram (13,0 g/L e 1,9 g/L, respectivamente). Em 28,5 h, após do primeiro pulso, a concentração de ácido láctico aumentou para 14,3 g/L e sua produtividade diminuiu para 0,5 g/L.h. Mesmo assim, a concentração de frutose aumentou para 15,0 g/L enquanto a sacarose e a glicose são metabolizadas. Um segundo pulso foi dado e a fermentação foi mantida até 39,5 h obtendo uma concentração final de 1,6 g/L de sacarose, 1,9 g/L de glicose, 15,6 g/L de frutose, 1,9 g/L de biomassa e 15,8 g/L do ácido láctico com produtividade de 0,4 g/L.h.

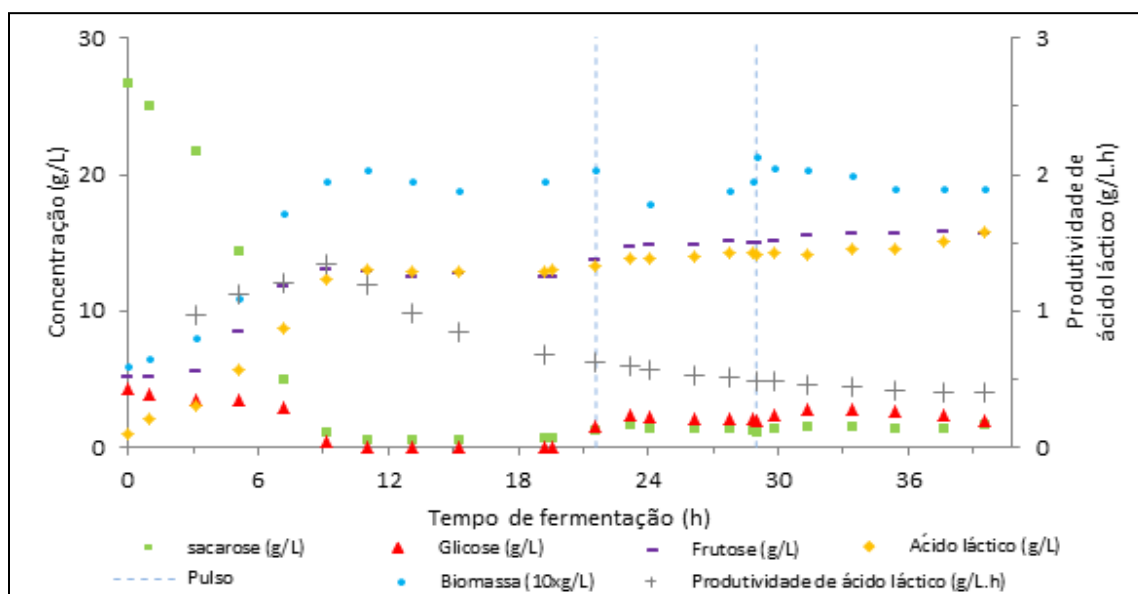


Figura 1. Comportamento da fermentação em função do tempo.

4. CONCLUSÕES

Com uso da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* foi possível à produção de *D*-ácido láctico em concentração máxima de 15,8 g/L e produtividade final de 0,4 g/L.h. A avaliação das concentrações, durante a fermentação, permitiu notar a diminuição na concentração de sacarose e glicose e aumento na concentração de ácido láctico e frutose. Este fato sugere que, nas condições de trabalho, a *Leuconostoc mesenteroides* tem preferência para metabolizar a glicose para ácido láctico, já que se observa aumento na concentração de frutose à medida que a sacarose é metabolizada.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq e BRASKEM e FAPESP (Processo 2008/03694-5) pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- COELHO, L. F.; LIMA C. J. B.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. D(-)-Lactic acid production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 164, pp. 1160–1171, 2011.
- LUNELLI, B. Produção e controle da síntese do éster de ácido acrílico através da fermentação do ácido láctico. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, T.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, 1st ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, p. 3-33, 2010.

