DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR *Actinobacillus succinogenes*

ELCIO RIBEIRO BORGES

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para Obtenção do Grau de Doutor em Ciências (*DS*c)

ORIENTADOR:

Prof. Nei Pereira Jr, *PhD*

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

2011

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR *Actinobacillus Succinogenes*

ELCIO RIBEIRO BORGES

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Doutor em Ciências (*DS*c)

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
2011

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR *Actinobacillus Succinogenes*

Elcio Ribeiro Borges

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, sob orientação do Prof. Nei Pereira Jr.

Banca examinadora:

Prof. Nei Pereira Junior, *PhD* (EQ/UFRJ)
(Orientador-Presidente)

Prof[a]. Gisella Maria Zanin, *DSc* (DEQ/UEM)

Prof. Paulo Luiz de Andrade Coutinho, *DSc* (BRASKEN)

Prof[a]. Inês Conceição Roberto, *DSc* (EEL/USP)

Prof. Donato Alexandre Gomes, *DSc* (EQ/UFRJ)

Prof[a]. Lídia Maria Melo Santa Anna, *DSc* (PETROBRAS)

EQ/UFRJ 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Elcio Ribeiro.

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR *Actinobacillus Succinogenes* / Elcio Ribeiro Borges – Rio de Janeiro, 2011.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2011.

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD*.

1. Ácido succínico
2. Fermentação
3. Bagaço de cana-de-açucar
4. Gás carbônico

I. Pereira Jr., Nei (Orient.)
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.
III. Título.

À memória de minha mãe, Lucia Helena Ribeiro Borges

À memória de meu irmão, Erick Anderson Ribeiro Borges

Família e entes queridos

Saudosamente,

Dedico

"A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca."

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

- Ao meu querido orientador, Professor Nei Pereira Jr, pelo presente concedido através da possibilidade de fazer parte de uma jornada de conhecimentos e vivenciar experiências, bastante sustentadoras, no âmbito profissional e pessoal. Saber enxergar, sem ressalvas, a potencialidade de cada aluno e acrescentá-los em sua rotina de trabalho, de forma enriquecedora, é um privilégio daqueles que possuem uma racionalidade intuitiva, contribuindo imensamente para elevar o potencial de nossa Universidade. Diante de tanto talento e contribuição, palavras a mais se tornam mera redundância. Não obstante, qualquer tentativa de registrar minha gratidão, em algumas linhas, não é suficiente para estimar a imensidão de minha admiração, respeito e inspiração. Porém, cada página traz consigo a presença sensível de uma felicidade invisível, silenciosa, sempre motivada e direcionada por uma orientação de notável qualidade, excelência e singularidade;
- Ao Departamento de Engenharia Bioquímica e seus funcionários, especialmente ao técnico Luiz Cláudio, pelo fundamental apoio no ambiente de trabalho e pela indispensável atuação administrativa. Além do convívio, amizade e confiança conquistados ao longo dos últimos anos, de forma incisiva e verdadeira;
- À minha família, pela gratificante oportunidade de solidificar diversos valores pessoais de caráter, envolvendo acertos e erros no educantário terrestre, contribuindo para o meu crescimento e amadurecimento;
- À minha querida e saudosa mãe, Lucia Helena Ribeiro Borges, pela constância de seus ensinamentos repletos de amor, carinho e incentivos. Mesmo ausente, fisicamente neste plano, conforta e emana a vibração que alimenta a minha fé e esperança, ajudando a superar de forma obstinada toda e qualquer provação;
- Aos companheiros de trabalho, Patrícia, Flávia, Verônica, Eleandro, Liliana, Mariana, Ludmylla, Fabio, Diogo, Carolina, Paulo, Vanessa, Roberto, Gabriel, Jorge, Graziela e a todos aqueles que fizeram parte de gratas recordações;
- À Danielle Silveira dos Santos, particularmente, pela presença inevitavelmente sustentadora em todos os momentos aparentemente difíceis, contribuindo efetivamente para formulação e definição do real significado das palavras amizade e confiança;
- Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da UFRJ, pela agradável recepção e convivência diária;
- Ao CNPq, FAPERJ e PETROBRAS pelo apoio financeiro.

RESUMO

BORGES, Elcio Ribeiro. **Desenvolvimento de um processo para produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes***. Orientador: Nei Pereira Jr. Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

Atualmente, a maioria do ácido succínico produzido comercialmente é feito por síntese química. Entretanto, recentemente a atenção tem sido focalizada na produção microbiana de ácido succínico por microrganismos como uma alternativa para a síntese química. Neste trabalho objetivou-se definir uma estratégia de produção de ácido succínico, por *Actinobacillus succinogenes* CIP 106512, em fermentações com hidrolisado hemicelullósico de bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente, três estratégias de planejamentos experimentais sequenciais foram adotadas para a otimização do processo. Adicionalmente, o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), também foi realizado. Em uma primeira etapa, foi desenvolvido um Planejamento Fatorial Fracionado PFF 2^{4-1}, seguido de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), para se estimar o efeito de cada variável. As melhores concentrações de nutrientes para formulação do meio de cultivo, segundo o resultado predito pelo modelo foram: $NaHCO_3$, 10,0 g/L; $MgSO_4$, 3,0 g/L; Extrato de levedura, 2,0 g/L e KH_2PO_4, 5,0 g/L. Posteriormente, um Planejamento Fatorial Fracionado PFF 2^{5-1} foi delineado para a avaliação das seguintes condições: concentração de substrato, extrato de levedura, temperatura, agitação e pH. A validação das condições ótimas, em biorreator instrumentado, para produção de ácido succínico a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, resultou em uma concentração final de produto igual a 40,3 g/L, com 80,0 g/L de concentração inicial de xilose, sob agitação de 150 rpm a 37ºC. Finalmente, um modelo cinético simples para a produção de ácido succínico a partir de glicose, incluindo os termos de inibição pelo substrato e pelo produto, foi proposto baseando-se em modelos encontrados na literatura. O perfil de crescimento celular da bactéria *A. succinogenes* pode ser expresso por um modelo de Monod expandido, incorporando a inibição causada pela concentração de glicose e pelos ácidos orgânicos (metabólitos secundários) acumulados durante a fermentação. Com outros modelos elaborados, como o de Andrews, Levenspiel e Luedeking-Piret foi obter condições para descrever a formação do produto e o perfil de subprodutos. Em todos os casos, as simulações do modelo mostraram-se satisfatórias e de acordo com os dados experimentais, sendo possível facilitar a compreensão do aspecto cinético da fermentação durante a conversão em ácido succínico. O modelo proposto pode ser útil para o desenvolvimento e o aperfeiçoamento dos processos para a produção de ácido succínico a partir de fontes renováveis.

ABSTRACT

BORGES, Elcio Ribeiro. **Development of a process for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes***. Supervisor: Nei Pereira Jr. High School of Federal University of Rio de Janeiro – Brazil , 2011.

Nowadays the majority of succinic acid produced commercially is made by chemical synthesis. However, attention has been focused on microbial succinic acid production as an alternative to chemical synthesis. This work aims at defining a strategy for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from the hemicellulose hydrolysate of sugarcane bagasse. Additionally, the *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) has been processed. In a first approach, three sequencial experimental designs were performed for optimizing the succinic acid production. The first experiment consisted of a 2^{4-1} fractional factorial design, and the second entailed a Central Composite Rotational Design so as to achieve optimal conditions. The optimal concentrations of nutrients predicted by the model were: $NaHCO_3$, 10,0 g/L; $MgSO_4$, 3,0 g/L; yeast extract, 2,0 g/L; KH_2PO_4. 5,0 g/L; wich these were experimentally validated. In the third experiment, the fermentation was carried out using a two-level fractional factorial design 2^{5-1}. The variables analyzed and their levels were: concentration of substrate; yeast extract, temperature, pH and agitation. Under the best conversion conditions, as determined by statistical analysis, the production of succinic acid was carried out bachwise in an instrumented bioreactor using sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate, yielding a concentration of 40,3 g/L, with 80,0 g/L of initial concentration, at temperature 37ºC and orbital agitation at 150rpm. Finally, the kinetic model was performed for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*, based on models told in the researches, that use conditions for substrate and product inhibitions. The growth of *Actinobacillus succinogenes* strain could be showed by a modified Monod model incorporating inhibitions effects of substrate and products in the fermentation. In agreement with the literature, several models were able to describe the formation of organic acids presents during fermentation process. In all analyse, the kinetic model simulation showed a great adjustment with the experimental observations. The proposed model can be useful for the development and optimization of succinic acid production process, contributing to the subsequent studies.

SÚMARIO

AGRADECIMENTOS VII
RESUMO VIII
ABSTRACT IX
SÚMARIO X
CAPÍTULO 1 1
APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE 1
CAPÍTULO 2 6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
2.1. Ácidos orgânicos 7
2.1.1. Aspectos históricos 8
2.1.2. Comercialização 8
2.1.3. Ácidos orgânicos como blocos de construção 12
2.2. Ácido succínico 15
2.2.1. Aplicações do ácido succínico 16
2.2.2. Biopolímeros, bioplásticos e plásticos biodegradáveis 20
2.2.2.1. O Potencial das inovações de base biotecnológica em biopolímeros 23
2.3. Aspectos mercadológicos da produção mundial de ácido succínico 24
2.4. Processos de produção de ácido succínico 26
2.4.1. Rota química 26
2.4.2. Rota fermentativa 27
2.4.2.1. Matérias-primas utilizadas na produção de ácido succínico 28
2.4.3. Materiais lignocelulósicos 30
2.4.3.1. Celulose 32
2.4.3.2. A Lignina 33
2.4.3.3. A Fração Hemicelulósica 33
2.4.4. Materiais lignocelulósicos e o contexto de biorrefinaria 34
2.4.5. Bagaço de cana-de-açúcar 35
2.4.6. Tipos de Pré-Tratamento 36
2.4.6.1. Pré-tratamento ácido 38
2.4.6.1.1. Inibidores do processo de fermentação 39
2.4.6.1.2. Processos de Destoxificação 40
2.4.6.1.3. Pré-tratamento alcalino 41
2.4.6.1.4. Hidrólise enzimática da celulose 41
2.4.7. Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) 44
2.4.8. Sacarificação com co-fermentação simultâneas (SSCF) 45
2.4.9. Microrganismos produtores de ácido succínico 46
2.4.9.1. Metabolismo na produção de ácido succínico 49

2.5. Processos de recuperação e purificação de ácidos orgânicos 52
2.5.1. Processos de separação e recuperação de ácido succínico 53
2.6. Modelagem e Simulação de Processos 56
2.6.1. Modelagem de Processos Biotecnológicos 57
2.6.2. Modelos cinéticos de crescimento microbiano 61
2.6.3. Métodos matemáticos utilizados para a resolução dos modelos 65
2.6.3.1. Método dos resíduos ponderados 65
2.6.3.2. Método de Colocação Ortogonal 65
2.6.3.3. Método das Linhas 65
2.6.3.4. Método de Runge-Kutta 65
2.6.3.5. Planejamento Experimental 66
2.7. Estratégias de fermentação para a produção de ácido succínico 67
2.8. Considerações gerais 72
CAPÍTULO 3 74
JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS 74
3.1. Justificativa 74
3.2. Objetivo geral 75
3.2.1. Objetivos específicos 76
CAPÍTULO 4 77
MATERIAIS E MÉTODOS 77
4.1. Esterilização das vidrarias e do meio de cultivo 78
4.2. Material microbiológico 78
4.2.1. Microrganismo utilizado 78
4.2.2. Manutenção do microrganismo 78
4.2.3. Observação microscópica 79
4.3. Meios empregados para ativação, propagação e fermentação 79
4.3.1. Meio de ativação para obtenção do pré-inóculo 79
4.3.2. Inóculo 80
4.3.3. Meios de Fermentação 82
4.3.4. Processo de propagação mediante aclimatação celular 83
4.4. Processos de fermentação em frascos agitados 84
4.4.1. Fermentação em presença de CO_2 na fase gasosa 86
4.5. Avaliação da influência da relação C:N no crescimento celular 87
4.5.1 Análise estatística 88
4.6. Planejamentos experimentais sequenciais para a otimização 88
4.6.1 Avaliação da influência dos componentes do meio de fermentação (PFF) 88
4.6.2. Delineamento Composto Central Rotacional 89
4.6.3. Otimização das condições de cultivo do processo através de PFF 90

4.6.4. Análise estatística *90*
4.7. Fermentação em biorreator instrumentado a partir de meio sintético 91
4.8. Fermentação em biorreator a partir da fração hemicelulósica 92
4.8.1. Pré-tratamento ácido *92*
4.8.2. Fermentação em biorreator instrumentado *92*
4.9. Experimentos empregando a estratégia *SSF* 93
4.9.1. Pré-tratamento alcalino *93*
4.9.2. Pré-hidrólise enzimática *94*
4.9.3. Processo SSF em biorreator *95*
4.10. Desenvolvimento de um modelo para produção de ácido succínico 95
4.10.1. Avaliação e estimação dos parâmetros cinéticos *96*
4.10.2. Modelo para estimação dos parâmetros *98*
4.11. Amostragem 98
4.12. Métodos Analíticos 99
4.12.1. Determinação de biomassa *99*
4.12.2. Determinações quantitativas *100*
4.12.3. Medida do pH *101*
4.13. Avaliação de resultados 101
4.13.1. Cálculo de eficiência do processo *101*
4.13.2. Taxa instantânea específica de crescimento microbiano *101*
4.13.3. Tempo de duplicação *102*
4.13.4. Variáveis de Resposta *103*
CAPÍTULO 5 104
RESULTADOS E DISCUSSÃO 104
5.1. Levantamento de informações e panorama geral das pesquisas sobre AS 105
5.2. Morfologia da linhagem *Actinobacillus succinogenes* 107
5.3. Padronização da metodologia para ativação celular e preparo de inóculo 108
5.3.1. Cultivo de ativação em meio sintético *108*
5.3.2. Cultivo de crescimento para obtenção de inóculo 109
5.4. Processo de fermentação mediante estratégias de aclimatação celular 112
5.5. Avaliação do efeito da fonte de carbono e influência da relação C:N 115
5.6. Planejamentos experimentais seqüenciais para otimização do processo 119
5.6.1. Planejamento Experimental Fatorial Fracionado PFF 2^{4-1} *119*
5.6.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) *125*
5.7. Planejamento Experimental Fatorial Fracionado *PFF2*$^{5-1}$ 134
5.8. Ensaios experimentais em biorreator 142
5.8.1. Formação de Subprodutos *158*
5.9. Avaliação da produção de ácido succínico pelo processo *SSF* 160

5.10. Evolução dos experimentos desenvolvidos na produção de ácido succínico 166
5.11. Comparação entre os processos a partir do hidrolisado hemicelulósico e *SSF* . 168
5.12. Desenvolvimento de um modelo para produção de ácido succínico 170
5.12.1. Classificação do perfil para o crescimento celular 170
5.12.2. Classificação para o perfil de formação de produto e subprodutos 175
5.12.3. Classificação do perfil de consumo de substrato..... 175
5.13. Considerações finais 176
CAPÍTULO 6 178
CONCLUSÕES 178
6.1. Conclusões 178
6.2. Sugestões 181
CAPÍTULO 7 182
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 182

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura química do ácido succínico..... 16
Figura 2.2. Produtos obtidos a partir do ácido succínico 19
Figura 2.3. Poliésteres alifáticos e aromáticos. 21
Figura 2.4. Estruturas possíveis para os copolímeros PET-*co*-PES..... 23
Figura 2.6. Principais matérias-primas glicídicas e seus substratos correspondentes. 30
Figura 2.7. Polímeros constituintes do material lignoceulósico..... 30
Figura 2.8. Disposição das moléculas de glicose..... 32
Figura 2.9. Álcoois precursores da lignina 33
Figura 2.11. Esquema simplificado das rotas tecnológicas (Biorrefinarias)..... 35
Figura 2.12. Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose. 42
Figura 2.13. Diagrama de blocos do processo SSF. 44
Figura 2.14. Diagrama de blocos do processo SSCF. 45
Figura 2.15. Via bioquímica para síntese de succinato, por *E. coli*..... 50
Figura 2.16. Metabolismo de *A. succiniciproducens* e *A. succinogenes*..... 51
Figura 2.17. Transporte de diferentes espécies através de uma membrana..... 53
Figura 2.18. Processo de separação e purificação de ácido succínico 54
Figura 2.19. Esquema de funcionamento de membranas bipolares de eletrodiálise..... 55
Figura 2.20. Diagrama de blocos da produção de ácidos orgânicos por fermentação. 55
Figura 2.21. Resumo de alguns parâmetros, fenômenos e interações dos estudos cinéticos..... 58
Figura 2.22. Classificação dos modelos matemáticos 59
Figura 2.23. Padrões cinéticos de crescimento celular e formação de produtos. 64
Figura 4.1. Esquema representativo das estratégias para a padronização do inóculo 81
Figura 4.2. Metodologia para propagação celular.. 83
Figura 4.3. Esquema ilustrativo geral para crescimento celular e produção de ácido succínico..... 85
Figura 4.4. Esquema ilustrativo do sistema de adição de CO_2 86
Figura 4.5. Biorreator BIOFLO III (*New .Brunswick*) utilizado na produção de ácido succínico 91
Figura 4.6. Etapas do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar 92
Figura 4.7. Etapas do pré-tratamento alcalino 93
Figura 4.8. Aspecto da celulignina após a pré-hidrólise enzimática, em frascos agitados 94
Figura 4.9. Celulignina após a pré-hidrólise enzimática, em biorreator 94
Figura 4.10. Diagrama de blocos para o tratamento das amostras. 99
Figura 4.11. Cromatograma típico com identificação dos ácidos orgânicos..... 101
Figura 5.1. Número de patentes e trabalhos publicados, até 2010..... 105
Figura 5.2. Periódicos com maior número de publicações e os temas mais estudados, até 2010 . 106
Figura 5.3. Observação microscópica das linhagens *Actinobacillus succinogenes* 107
Figura 5.4. Cinética de crescimento do cultivo de ativação da bactéria *A. succinogenes* 109
Figura 5.5. Cinética de crescimento do inóculo em meio sintético (xilose)..... 110
Figura 5.6. Cinética de crescimento do inóculo em meio sintético (glicose)..... 110

Figura 5.7. Cinética de crescimento do inóculo contendo hidrolisado hemicelulósico diluído..... 111
Figura 5.8. Cinética de fermentação de em meio sintético 112
Figura 5.9. Perfil de crescimento celular a partir das estratégias de propagação celular..... 113
Figura 5.10. Efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa 115
Figura 5.11. Produção de biomassa em meio, com xilose, em diferentes razões C:N..... 116
Figura 5.12. Produção de biomassa em meio, com glicose, em diferentes razões C:N..... 116
Figura 5.13. Efeitos de diferentes fontes de carbono na concentração de AS 118
Figura 5.14. Efeitos de diferentes fontes de carbono na concentração de AS (histograma)..... 118
Figura 5.15. Histograma de influência das variáveis e suas interações, do PFF 2^{4-1} 123
Figura 5.16. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis 124
Figura 5.17. Superfície de resposta mostrando o efeito da interação entre as variáveis. 125
Figura 5.18. Histograma de influência das variáveis e suas interações, para o DCCR..... 131
Figura 5.19.Superfície de resposta dos efeitos combinados (DCCR) para xilose 132
Figura 5.20.Superfície de resposta dos efeitos combinados (DCCR) para glicose.. 133
Figura 5.21. Diagrama de Pareto para os efeitos estimados pelo PFF 2^{5-1} (24h) 139
Figura 5.22. Diagrama de Pareto para os efeitos estimados pelo PFF 2^{5-1} (48h) 140
Figura 5.23. Superfície de resposta da concentração de ácido succínico a partir de glicose 141
Figura 5.24. Superfície de resposta da concentração de ácido succínico a partir de xilose 141
Figura 5.25. Fermentação em meio sintético, com 22,0 $g.L^{-1}$ de xilose..... 143
Figura 5.26. Fermentação em meio sintético de composição definida após otimização. 145
Figura 5.27. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico, com 22,0 $g.L^{-1}$ de xilose..... 146
Figura 5.28. Fermentação em meio sintético, com 52,0 $g.L^{-1}$ de xilose..... 148
Figura 5.29. Fermentação em meio sintético de composição definida após otimização 149
Figura 5.30. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico, com 52,0 $g.L^{-1}$ de xilose..... 151
Figura 5.31. Fermentação em meio sintético, com 80,0 $g.L^{-1}$ de xilose..... 152
Figura 5.32. Fermentação em meio sintético de composição definida após otimização 154
Figura 5.33. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico, com 80,0 $g.L^{-1}$ de xilose 155
Figura 5.34. Concentração final de produto e subprodutos do processo SSF 161
Figura 5.35. Perfil cinético do processo SSF, em frascos agitados. 162
Figura 5.36. Perfil cinético do processo de fermentação, em biorreator..... 163
Figura 5.37. Perfil cinético do processo SSF com concentração de glicose igual a 81,0 $g.L^{-1}$..... 164
Figura 5.38. Evolução da produção de ácido succínico com o decorrer do trabalho 168
Figura 5.39. Avaliação dos efeitos da concentração inicial de glicose sob a tx de cresc 172
Figura 5.40. Perfil cinético de formação de ácido succínico, crescimento celular e consumo de substrato (glicose). 173
Figura 5.41. Perfil cinético da formação dos ácidos acético, fórmico e lático 174

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Pontos de ebulição, fórmulas moleculares e constantes (Ka) 7
Tabela 2.2. Ano de descoberta e/ou isolamento de alguns ácidos orgânicos 8
Tabela 2.3. Blocos primários produzidos por rota fermentativa ou química 13
Tabela 2.4. Candidatos em potencial como blocos de construção 13
Tabela 2.5. Valores de produtividade e rendimento de alguns ácidos orgânicos 14
Tabela 2.6 . Características do ácido succínico 16
Tabela 2.7. Composição de resíduos agro-industriais 31
Tabela 2.8. Constituintes básicos de alguns materiais lignocelulósicos 31
Tabela 2.9. Parâmetros para aplicação de processos de separação 53
Tabela 2.10. Tipos de modelos usados em processos microbianos 59
Tabela 2.11. Modelos cinéticos não estruturados 62
Tabela 2.12. Modelos para formação de produto metabólico inibitório 64
Tabela 2.13. Valores encontrados e calculados para diferentes estratégias de fermentação 68
Tabela 4.1. Meio de manutenção (TSA) 79
Tabela 4.2. Composição do meio utilizado para pré-inóculo 79
Tabela 4 3. Composição do meio de crescimento utilizado para inóculo 82
Tabela 4.4. Composição do meio sintético para fermentação 82
Tabela 4.5. Composição química do meio líquido com diferentes razões C:N 87
Tabela 4.6. Parâmetros e níveis usados no PFF 2^{4-1} 89
Tabela 4.7. Parâmetros e níveis usados no DCCR 90
Tabela 4.8. Variáveis analisadas no PFF e níveis codificados e reais. 90
Tabela 4.9. Composição do meio de fermentação, após estudos de otimização 91
Tabela 4.10. Condições operacionais do cromatógrafo 100
Tabela 4.11. Condições operacionais do cromatógrafo (ácidos orgânicos) 101
Tabela 5.1. Parâmetros relevantes nos processos de propagação de células de *A. succinogenes*. ... 111
Tabela 5. 2. Variáveis de Resposta na Avaliação do Efeito da Aclimatação 114
Tabela 5.3. Influência da concentração inicial de substrato e da razão C:N no crescimento celular. .. 117
Tabela 5.4. Matriz experimental do PFF 2^{4-1} e concentração final de ácido succínico, para xilose 119
Tabela 5.5. Matriz experimental do PFF 2^{4-1} e concentração final de ácido succínico, para glicose 120
Tabela 5.6. Análise de variância (ANOVA), no PFF 2^{4-1} para xilose como fonte de carbono 122
Tabela 5.7. Análise de variância (ANOVA), no PFF 2^{4-1} para glicose como fonte de carbono 122
Tabela 5.8. Matriz experimental do DCCR investigando os efeitos dos nutrientes do meio (xilose) 127
Tabela 5.9. Matriz experimental do DCCR investigando os efeitos dos nutrientes do meio (glicose) .. 128
Tabela 5.10. Análise de variância (ANOVA) para xilose como fonte de carbono 129
Tabela 5.11. Análise de variância (ANOVA) para glicose como fonte de carbono 130
Tabela 5.12. Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado PFF 2^{5-1} para glicose 135
Tabela 5.13. Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado PFF 2^{5-1} para xilose 135
Tabela 5.14. Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} glicose (24h) 136

Tabela 5.15. Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} xilose(24h). 137
Tabela 5.16. Efeitos estimados do p lanejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} para glicose (48h) 138
Tabela 5.17. Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} para xilose (48h)..... 138
Tabela 5.18. Variáveis de resposta obtidos para meio sintético e hidrolisado hemicelulósico..... 157
Tabela 5.19. Concentração final de produto e subprodutos dos processos de fermentação 159
Tabela 5.20. Variáveis de resposta e concentração de produto e subprodutos pelo processo SSF. .. 165
Tabela 5.21. Resultados finais e evolução do processo para a produção de ácido succínico 167
Tabela 5.22. Produção de ácido succínico a partir dos hidrolisados hemicelulósico e celulósico 169
Tabela 5.23. Valores obtidos dos parâmetros cinéticos de fermentação..... 171

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLAS

ABS: Absorvância;

AIE: Agência Internacional de Energia;

ANOVA: Análise de variância;

ARD: Agro-industrie Recherches e Développements;

AS: Ácido succínico;

AA: Ácido acético;

AS: Ácido fórmico;

AL: Ácido lático;

ATP: Adenosina trifosfato;

ATP: Adenosina trifosfato;

ATP: Adenosina trifosfato;

BHT: Butirolactona;

CBH: Celobiohidrolases;

CIP: Institut Pasteur Collection;

CM: Concentração máxima;

CTA: Triacetato de celulose;

DCCCF: Delineamento composto Central de Faces-centradas;

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional;

DNP: Diversified Natural Products;

DOE: Departamento de Energias do EUA**;**

DSP: Processo de Separação e Purificação;

EBMP: Membranas bipolares de eletrodiálise;

ED: Eletrodiálise;

EDO: Equações diferenciais ordinárias;

EDP: Equações diferenciais parciais;

EL: Extrato de levedura;

ELL: Extração líquido-líquido;

EMP: Embden-Meyerhof Pathway;

EVOH: Copolímero de etileno e álcool vinílico;

GL: Graus de Liberdade;

GT: Grupo de trabalho;

GT-6: Grupo de trabalho;

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência;

IBGE: Instituto brasileiro de geografia e estatística;

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada;

IV: Infravermelho;

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**;**

LADEBIO: Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos-Departamento de Engenharia Química-Escola de Química/UFRJ;

MAPA: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

MBI: International, Myriant Technologies;

MCG: Meio de Crescimento Guetler;

MCL: Meio de Crescimento LADEBIO;

MCT: Meio de Crescimento Triptona;

MF: Microfiltração;

MQ: Média Quadrática;

NF: Nanofiltração;

OI: Osmose Inversa;

P.E: Ponto de ebulição;

P.F: Ponto de fusão;

PA: Poliamida;

PB: Plackett-Burman;

PBS: Polibutilenosuccinato;

PBT: Polibutilenotereftalado;

PC: Pontos centrais;

PC*Cell*: Modelo e marca de membrana de eletrodiálise(Electrodialysis Cell);

PEP: Fosfoenolpiruvato;

PES:Polisuccinato de etileno;

PET: Polietileno tereftalato;

PFF: Planejamento Experimental Fatorial Fracionário;

PFF: Planejamento Experimental Fatorial;

PFF: Planejamento Fatorial Fracionário;

PHA: Polihidroxialcanoato;

PIM: Polymer inclusion membranes;

PROALCOOL: Programa Nacional do Álcool;

PST: Polisuccinato tereftalato;

PVC: Poli (cloreto) de vinila;

PVDC: Copolímero de cloreto de vinilideno;

RSM: Superfície de Resposta;

SES: Succinato etileno succinato;

SQ: Soma Quadrática;

TCA: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos;

TCA: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos;

TES: Tereftalato etileno succinato;

TET: Tereftalato etileno tereftalato;

THF: Tetrahidrofurano;

TSA: Agar Triptona de Soja – 500gr M/Difco

TSA: Agar Triptona de Soja – 500gr M/Difco;

TSB: Caldo de Triptona de Soja - 500gr M/Difco;

TSB: Caldo de Triptona de Soja - 500gr M/Difco;

UF: Ultrafiltração;

UNICA: União de Agroindústria Canavieira de São Paulo

NOMENCLATURA MATEMÁTICA

E_f: eficiência, expressa em porcentagem;

f_d: fator de diluição empregado na solução;

g: gramas;

h: hora;

Ka: constantes de dissociação ácida;

Kd: taxa de mortalidade específica (h^{-1});

K_i : constante de inibição do substrato (g/L);

K_S: constante de saturação do substrato (g/L);

L: litro;

mg: miligrama;

MM_{AS}: massa molecular do ácido succínico;

MM_{Gl}: massa molecular da glicose;

mmol/L: milimol por litro;

m_s: coeficiente de manutenção energétic (g/g.h);

P: concentração de produto (g/L);

P: concentração final de ácido succínico, g/L;

P_{CRIT}: concentração crítica de produto (g/L);

pH: potencial hidrogeniônico;

P_o: concentração inicial de ácido succínico, g/L;

Q_P: produtividade volumétrica em ácido succínico, g/L.h;

r_X *:* taxa de formação de biomassa (g/L.h);

r_{SA} : taxas de formação dos ácidos succínico (g/L.h);

S: concentração final de substrato, g/L;

S_o: concentração inicial de substrato, g/L;

T: temperatura, ^oC;

t_d: tempo de duplicação, horas;

t_f: tempo de fermentação, horas;

v/v: relação volume/volume;

vvm: vazão de ar por volume de meio por minuto, min^{-1};

X: concentração final de biomassa, g/L;

X_o: concentração inicial de biomassa, g/L;

Y_{AA}: fator de rendimento estequiométrico para ácido acético g/g;

Y_{AF}: fator de rendimento estequiométrico para ácido fórmico g/g;

Y_{AL}: fator de rendimento estequiométrico para ácido lático g/g;

$\mathbf{Y_{P/S}}$: fator de rendimento em produto por substrato consumido, g/g;

$\mathbf{Y_{X/S}}$: fator de rendimento em biomassa por substrato consumido, g/g;

Z: Discrepâncias quadráticas entre os dados experimentais e simulados

Letras gregas

μ_{max}: taxa específica máxima de crescimento (h^{-1});

μ: taxa de crescimento específico (h^{-1});

α_{AA}: parâmetro de formação de ácido acético associado ao crescimento (g/g);

α_{FA}: parâmetro de formação de ácido fórmico associado ao crescimento (g/g);

α_{LA}: parâmetro de formação de ácido lático associado ao crescimento (g/g);

α_{SA}: parâmetro de formação de ácido succínico associado ao crescimento (g/g);

β_{AA}: parâmetro de formação de ácido acético não associado ao crescimento (g/g);

β_{FA}: parâmetro de formação de ácido fórmico não associado ao crescimento (g/g);

β_{LA}: parâmetro de formação de ácido lático não associado ao crescimento (g/g);

β_{AS}: parâmetro de formação de ácido succínico não associado ao crescimento (g/g)

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE

Uma etapa fundamental para o desenvolvimento sustentável de uma Sociedade é a mudança da realidade dependente do petróleo para o uso abundante de recursos renováveis. Os impactos ambientais, decorrentes da queima de combustíveis fósseis, representam uma realidade com a qual a Sociedade tem que conviver, controlar e se adaptar, necessitando de uma tomada de consciência da importância da questão e exigindo mudanças em muitos hábitos de consumo e comportamento (PEREIRA JR, 2010).

Grande parte dos especialistas sugere que, nos próximos anos, o petróleo se tornará mais escasso e consideravelmente mais caro do que nos dias atuais. Segundo o anuário Perspectiva de Energia Mundial (2010), as observações descritas pela Agência Internacional de Energia (AIE) indicam que sem a alteração da matriz energética, os combustíveis fósseis responderiam por 90% do aumento projetado na demanda mundial, até 2035. O crescimento da população associado à demanda por combustíveis e produtos químicos, tem aumentado a busca e o desenvolvimento para o uso mais diversificado de matéria-prima renovável (EMBREE *et al*., 2001; WILLKE & VORLOPO, 2004).

Neste contexto, a indústria química do século XXI será obrigada a passar por uma completa reestruturação, recorrendo ao uso de recursos renováveis como matéria-prima básica e à Biotecnologia para realização de muitas transformações químicas (BRDTAC, 2002; NRC, 2000; WILKE, 2000).

A maior parte dos esquemas relacionados a uma indústria química a base de biomassa envolve um pequeno número de moléculas intermediárias versáteis, normalmente de baixa massa molar. Cada um destes intermediários-base dá origem a uma

família de substâncias químicas derivadas, obtidas por meio de conversões biológicas ou, mais freqüentemente, por reações químicas tradicionais, em um esquema muito similar ao que ocorre na indústria petroquímica atual (LYND *et al*., 1999). Nestes termos, um exemplo de intermediário-base que tem sido bastante reportado na literatura é o ácido butanodióico, conhecido como ácido succínico (WERPY & PETERSON, 2004). Sendo passível de obtenção por rota fermentativa, este ácido tem o potencial para se tornar uma comoditie, produzido em larga escala, podendo se constituir na base para o fornecimento de uma série de substâncias intermediárias e produtos finais importantes na indústria química, principalmente de biopolímeros a partir de succinato, além de ser um componente chave na produção de mais de 30 produtos comercialmete importantes, na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (MCKINLAY *et al*., 2007; ZEIKUS & JAIN, 1999; SONG & LEE, 2005).

Cabe ressaltar que o ácido succínico pode substituir mais de 250 produtos químicos derivados do benzeno, que é conhecidamente carcinogênico por todas as rotas de exposição (KERMANSHAHI *et al.*, 2005). Somado a sua importância como bloco de construção para o segmento industrial, uma vantagem adicional desta substância química reside na sua produção por fermentação, a qual ocorre com consumo de CO_2, fornecendo uma alternativa interessante para o problema de seqüestro do carbono (VAN DER WERF & GUETLER, 1997).

A maioria dos ácidos orgânicos existentes no mercado é produzida via síntese química, gerando altos níveis de poluição. A evolução do mercado mundial dos produtos derivados de matérias-primas agro-industriais está obrigando as empresas do Setor Químico a incorporar novas tecnologias para alcançar maiores índices de qualidade e eficiência. Na busca por produtos finais mais competitivos e rentáveis, como por exemplo, ácidos orgânicos e plásticos biodegradáveis, o setor industrial vem sendo compelido a incorporar inovações tecnológicas, desenvolvimentos de novos sistemas produtivos e de equipamentos para processos que protejem o meio ambiente e gerem menor quantidade de poluentes (CORDOBA, 2001).

O Fórum de Competitividade em Biotecnologia foi constituído para definir as ações necessárias à inscrição da área de Biotecnologia entre as várias opções estratégicas da Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior. O GT-6 vem avaliando o segmento da “Biotecnologia Industrial e Outras Aplicações”, que tem como referência a classificação de Biotecnologia Branca (*White Biotechnology*), como o setor que aplica recursos naturais para a produção industrial de bioprodutos de interesse comercial. As profundas alterações ocorridas no setor agroindustrial com apropriação de novas tecnologias e a formação de grandes *clusters* de cadeia produtiva das culturas extensivas de soja, cana-de-açúcar e milho (produção de sementes ou mudas, plantio, colheita e beneficiamento) têm

impulsionado a discussão sobre um novo modelo de indústria de transformação destas matérias-primas renováveis em produtos químicos intermediários e finais, através de modificações físicas, químicas e biológicas (PRADELLA, 2006).

Esse modelo pressupõe integração de processos e de fluxos de insumos, otimização das utilidades industriais e da logística de transporte, alto rendimento de conversão, alta produtividade e ampla escala de produção, com a finalidade de reduzir custos, diversificar e flexibilizar a produção, para responder às demandas de mercado, modelo similar ao praticado pela indústria petroquímica. Por fazerem uso de matérias-primas de origem biológica e possuírem um forte componente de transformação bioquímica, propõe-se o termo “Biorrefinaria” para designar os processos ou os arranjos industriais dessa natureza (PEREIRA JR, 2006).

As Biorrefinarias pertencem à categoria dos agronegócios, devendo ser consideradas uma extensão da cadeia produtiva agrícola e, portanto, integradas fisicamente no processo de plantio, colheita, beneficiamento e transformação desses plantios. Dentro desta perspectiva, várias categorias de produtos devem ser destacadas como candidatas potenciais para desenvolvimento do chamado comoditie de larga utilização (RODRIGUEZ, 2006).

Do ponto de vista do balanço energético, as Biorrefinarias podem ser extremamente eficientes, uma vez que os resíduos lignocelulósicos podem ser aproveitados para produção de energia, que será consumida na unidade industrial, gerando também créditos de carbono, passíveis de comercialização (PRADELLA *et al*., 2006). A cana-de-açúcar e seus residuos constituem-se em fontes de carbono de baixo custo que podem minimizar os custos de produção em relação aos seus sucedâneos advindos de petróleo.

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta-se como um dos materiais lignocelulósicos com maior potencial para a obtenção de diversos produtos de interesse comercial. A separação seletiva das frações do material lignocelulósico de acordo com suas características químicas e/ou dos produtos a serem obtidos, representa uma das estratégias a serem adotadas no campo da Biotecnologia.

Sendo a hemicelulose e a celulose, as principais frações estruturais do bagaço de cana, representando uma fonte potencial de xilose e glicose, respectivamente, o presente trabalho investiga o desenvolvimento de um processo para a produção de ácido succínico, por uma linhagem de *Actinobacillus succinogenes*. Porém, a obtenção desses açúcares requer a aplicação de técnicas que permitam a sua extração seletiva. No caso da extração de xilose, são utilizadas diferentes metodologias de solubilização e hidrólise, dentre as quais o pré-tratamento ácido é normalmente empregado (BETANCUR & PEREIRA JR, 2010).

Este trabalho faz parte de uma das linhas de pesquisas desenvolvidas nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos – Escola de Química/ UFRJ, sob a coordenação do Prof. Dr. Nei Pereira Jr., intitulada Valorização de Resíduos Lignocelulósicos para o Aproveitamento Integral de Biomassas Residuais por Via Biotecnológica.

No que se refere à produção internacional, o número de pesquisas vêm se destacando, de forma gradativa, ao longo dos últimos anos, com diferentes tipos de microrganismos. Em relação ao cenário nacional, é possível constatar alguns trabalhos em andamento acerca da produção de ácido succínico nas universidades de grande potencial.

Organização do trabalho

O presente trabalho encontra-se estruturado em 7 capítulos e uma seção final, intitulada Anexos, incluindo os artigos publicados em periódicos internacionais. O capítulo dois apresenta a **Revisão Bibliográfica** dos aspectos relevantes ao assunto tratado, ressaltando a importância da produção de ácido succínico e suas potenciais utilizações, além de abordar aspectos científicos, tecnológicos e econômicos. Neste capítulo, também são descritos, de forma sucinta, alguns fundamentos da modelagem matemática de processos biotecnológicos, incluindo métodos matemáticos freqüentemente utilizados para resolução destes modelos, além de técnicas para otimização e controle de processos.

No capítulo três, intitulado **Justificativas e Objetivos**, são apresentados os motivos que levaram ao desenvolvimento desta tese, bem como os objetivos específicos desenvolvidos.

O capítulo quatro refere-se à descrição dos **Materiais e Métodos** utilizados para a execução deste trabalho, como por exemplo, detalhamento das metodologias experimental e analítica adotadas, bem como das técnicas de planejamento experimental para a análise dos resultados.

Os **Resultados e Discussão** relativos às principais análises conduzidas encontram-se no quinto capítulo. Para a otimização dos parâmetros e condições de processo, foram desenvolvidos planejamentos seqüenciais para a realização dos experimentos com maior grau de confiabilidade. Foi avaliada a hierarquia de efeitos estimados sobre a variável de resposta do processo, bem como apresentados os estudos iniciais dos parâmetros cinéticos para a modelagem do processo visando à produção de ácido succínico, mediante o estudo do comportamento microbiano durante a fermentação. No capítulo seis são registradas as **Conclusões e Sugestões** do presente trabalho.

Por fim, as **Referências Bibliográficas** são apresentadas no sétimo capítulo, através das quais todas as informações contidas nesse texto poderão ser localizadas e, obtidos mais detalhes sobre seus registros.

Com o desenvolvimento da presente pesquisa, foram publicados (ANEXO) os seguintes trabalhos**:**

Lista de trabalhos publicados em peródicos indexados:

1. **Borges, E.R.** & Pereira Jr., N. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 13, p. 1-11, 2010.
2. **Borges, E.R.**; Souza, L.B.R & Pereira Jr, N. Study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. Jornal of Life Sciences, v. 4, p. 5-12, 2010.

Trabalhos completos em congressos nacionais:

1. **Borges, E.R.**; Souza, L.B.R & Pereira Jr., N. Uso de biomassas para produção de ácio succínico por *Actinobacillus succinogenes*. IX SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática e Biomassas, Maringá-PR, 23 -27/11/2009.
2. **Borges, E.R.**; Souza, L.B.R. & Pereira Jr, N. Recuperação e purificação de ácido succínico obtido por um processo biotecnológico. XXXIV ENEMP - Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, Campinas – SP, 18 a 21/10/09.
3. **Borges, E.R.**; Souza, L.B.R & Pereira Jr, N. Estudo das variáveis de processo na produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*. XVII SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal – RN.
4. **Borges, E.R.**; Souza, L.B.R. & Pereira Jr, N. Produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* a partir do hidrolisado da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar. XVIII SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul – RS. 24 a 27/07/2011. Situação: Aceito

Participação em eventos

1. **Borges, E.R.**; Souza, L.B.R. & Pereira Jr, N. Influências das Variáveis de Processo na Produção de Ácido Succínico por *Actinobacillus succinogenes.* XXXI Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, Rio de Janeiro.
2. **Borges, E.R.**; Souza, L.B.R. & Pereira Jr, N. Influência da Razão C:N no Crescimento Celular e Biossíntese de Metabólitos Durante a Produção de Ácido Orgânico. XXX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, Rio de Janeiro.
3. **Borges, E.R.** & Pereira Jr, N. Succinic Acid Production from Sugarcane Bagasse by *Actinobacilus succinogene*. 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 2010. Orlando/Flórida.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os diferentes aspectos teóricos referentes à temática abordada: ácidos orgânicos de interesse industrial; o ácido succínico e suas aplicações no mercado; microrganismos produtores e aspectos de metabolismo; o bagaço de cana como matéria-prima para a produção do ácido succínico; algumas características relevantes ao processo de aproveitamento do material lignocelulósico e considerações importantes sobre o uso dos ácidos orgânicos como intermediários na produção de plásticos biodegradáveis e como blocos de construção para a produção de substâncias químicas de interesse comercial.

2.1. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são importantes para a indústria de transformação, principalmente a química, farmacêutica e de alimentos. Podem ser comercializados, tanto como ácidos (com relativo grau de pureza), ou na forma de sais deles derivados.

Ao contrário das principais fermentações de alimentos e de bebidas cujas origens remontam à antiguidade, os processos de produção desses ácidos só começaram a ser desenvolvidos nos últimos cem anos. A primeira fábrica, para produção em larga escala de uma substância química por fermentação, começou a operar em 1881 em Massachusetts (EUA) para produção de lactato de cálcio, empregando bactérias.

Com exceção do ácido clorídrico presente no suco gástrico, os ácidos mais comuns com os quais convivemos são orgânicos, ou seja, àqueles contendo átomos de carbono. Destes, o maior grupo é o dos *ácidos carboxílicos*, que são os ácidos caracterizados pela presença do grupo funcional (COOH), a carboxila (SNYDER, 1995). As propriedades, para alguns ácidos carboxílicos, classificados como mono e dicarboxílicos, de acordo com o número de carboxila presente em sua estrutura químicas, são apresentadas na Tabela 2.1 (SOLOMONS, 1996; HARRIS, 1999).

Tabela 2.1. Pontos de ebulição, fórmulas moleculares e constantes de dissociação ácida (Ka) de alguns ácidos carboxílicos.

Ácidos monocarboxílicos			
Nome do ácido (IUPAC/nome usual)	**Fórmula molecular**	**P.E/ºC**	**K_a**
Metanóico (fórmico)	HCOOH	100,5	$1,80X10^{-4}$
Etanóico (acético)	CH_3COOH	118	$1,75x10^{-5}$
Propaníco (propiônico)	CH_3CH_2COOH	141	$1,34\ x10^{-5}$
Butanóico (butírico)	$CH_3CH_2CH_2COOH$	164	$1,52\ x10^{-5}$
Pentanóico (valérico)	$CH_3(CH_2)_3COOH$	187	$1,44\ x10^{-5}$
Hexanóico (capróico)	$CH_3(CH_2)_4COOH$	205	-
Octanóico (caprílico)	$CH_3(CH_2)_6COOH$	239	-
Decanóico (cáprico, P.F. 31º)	$CH_3(CH_2)_8COOH$	269	-
Ácidos dicarboxólicos			
Butanodióico (succínico,P.F.187ºC)	$HOOC(CH_2)_2COOH$	235	$K = 6,2\ x\ 10^{-5}$ $K = 2,3\ x\ 10^{-6}$
Pentanodióico (glutárico, P.F. 98 ℃)	$HOOC(CH_2)_3COOH$	303	$K = 4,6\ x\ 10^{-5}$ $K = 3,7\ x\ 10^{-6}$
Hexanodióico (adípico, P.F. 153 ℃)	$HOOC(CH_2)_4COOH$	340	$K = 3,8\ x\ 10^{-5}$ $K = 3,8\ x\ 10^{-6}$

Fonte: (SOLOMONS, 1996; HARRIS, 1999).

A presença do grupo COOH confere aos ácidos carboxílicos, entre outras propriedades, a de serem *ácidos fracos* em meio aquoso e de apresentarem elevados pontos de ebulição devido à facilidade com que formam interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio (LINTOMEN *et al*., 1990).

2.1.1. Aspectos históricos

A descoberta dos ácidos orgânicos está intimamente relacionada ao desenvolvimento da química experimental. Neste contexto, Carl Wilhelm Scheele (1742-1786), um notável químico experimental sueco, desempenhou um papel primordial. Dentre os 15 a 20 mil experimentos atribuídos a ele, estão as descobertas de compostos orgânicos de natureza ácida (ácidos carboxílicos e fenóis), como os ácidos tartárico (2,3–dihidroxibutanodióico), málico (2-hidroxibutanodióico), láctico (2-hidroxipropanóico), oxálico (etanodióico), úrico, gálico (3,4,5-trihidroxibenzóico) e cítrico (2-hidroxipropan-1,2,3-tricarboxílico) (FIORUCCI *et al*., 2002). Scheele fez uso de reações e técnicas que até então estavam intimamente relacionadas com a Química Inorgânica (extrações por solventes, formações de sais, diferenças de solubilidade). Uma atribuição destas descobertas e seus respectivos autores estão descritas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Ano de descoberta e/ou isolamento de alguns ácidos orgânicos e seus respectivo “descobridores”.

Ácido	Data	Pesquisador	Fonte descoberta
Fórmico	1500	H. Brunschwigk	Destilação por arraste de vapor de soluções contendo formigas
Benzóico	1556	M. Nostredame	Sublimação da goma do benjoim (resina extraída do “benjoeiro”)
Succínico	1600	Oswald Croll	Sublimação do âmbar (resina vegetal fóssil)
Tartárico	1770	C.W. Scheele	Do resíduo de fermentação do vinho
Pícrico	1771	Peter Woulfe	Do tratamento do índigo com ácido nítrico
Oxálico	1760	J.C. Wiegleb	Isolado do trevo azedo (*oxalis*)
Oxálico	1776	C.W. Scheele	Oxidação do açúcar com ácido nítrico
Lático	1780	C.W. Scheele	Fermentação do leite azedo
Úrico	1780	C.W. Scheele	Dos resíduos da urina
Cítrico	1784	C.W. Scheele	Dos sucos de frutas cítricas
Málico	1785	C.W. Scheele	Extraído do suco de maçã
Gálico	1786	C.W. Scheele	Das nozes da Gala

Fonte: (FIORUCCI *et al*., 2002)

2.1.2. Comercialização

Os ácidos orgânicos apresentam muitas aplicações nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia, com propriedades organolépticas importantes, tanto que o

sabor azedo característico foi o primeiro critério para classificação destes compostos. Na indústria alimentícia, os ácidos são adicionados por diferentes propósitos, aos alimentos. As funções mais importantes dessa adição são: conservantes devido à participação em sistemas tampão, a habilidade de produzir um sabor azedo (onde o gerador é o íon hidrogênio ou hidrônio - H_3O^+) e também, como acidulante, devido à capacidade de modificar e intensificar o sabor de outros condimentos.

Como conservantes, atuam como sequestrantes de íons metálicos através do íon carboxila, evitando a catálise de reações de oxidação nos alimentos (GITIRANA, 2007). A adição de acidulantes é comumente destinada às bebidas gasosas, principalmente aquelas às quais se procura dar sabor parecido ao das frutas; estas bebidas já apresentam leve teor ácido, pelo CO_2 que encerram em forma de ácido carbônico (H_2CO_3). O pequeno grau de acidez dado pelos acidulantes faz com que estes sejam empregados como recursos de melhoria de sabores. Entre outros produtos em que os acidulantes são empregados, pode-se destacar: geléias artificiais, sorvetes, balas, pós para coberturas, produtos de confeitaria, etc. Os ácidos orgânicos comumente usados na indústria de alimentos são os ácidos: acético, lático, cítrico, málico, fumárico, succínico e tartárico (FENNEMA, 1985). Os ácidos, fórmico e acético têm cheiro intenso, irritante e paladar azedo. O ácido fosfórico (H_3PO_4) é o único ácido inorgânico empregado extensivamente como acidulante alimentar.

Os ácidos de quatro a oito átomos de carbono têm odores desagradáveis, como os ácidos capróico (hexanóico), caprílico (octanóico) e cáprico (decanóico). Entretanto, em pequenas concentrações, os ácidos carboxílicos são responsáveis por muitas fragrâncias. Os ácidos, benzóico, cinâmico (3-fenil-2-propenóico), mirístico (tetradecanóico) e isovalérico (3-metilbutanóico) estão presentes em óleos essenciais, que são óleos voláteis, odoríferos, de origem vegetal (SHREVE & BRINK, 1980).

Uma grande parte dos ácidos orgânicos, oriundos de microrganismos, ou como intermediários naturais em caminhos metabólicos principais podem contribuir para o avanço nas produções biotecnológicas a partir de fontes renováveis. Por causa dos grupos funcionais dos ácidos orgânicos, estas moléculas são extremamente úteis para a indústria química. Por exemplo, ácido succinico poderia susbtituir o anidrido maleico, que possui um mercado bastante amplo na petroquímica (WERPY & PETERSEN, 2004).

Os ácidos orgânicos são amplamente usados na indústria de alimentos como aditivos. Como agentes de processamento, são adicionados para controlar a alcalinidade de muitos produtos podendo agir como tampões ou simplesmente como agentes neutralizantes. Como conservantes, podem atuar desde agentes antimicrobianos até antioxidantes. Algumas características desses ácidos orgânicos são abordadas a seguir:

Ácido Metanóico (fórmico): causa do ardor das picadas de formiga, é o mais simples dos ácidos carboxílicos. Seu nome origina-se da palavra em Latim para formiga, *formica*.

Ácido Etanóico (acético): é o principal ingrediente do vinagre. Seu nome deriva do Latim *acetum*, que significa azedo. Conhecido e usado há tempos pela humanidade, é usado como condimento e conservante de alimentos. A oxidação aeróbica, por bactérias do gênero *Acetobacter,* do álcool a ácido acético diluído (8%) é um processo antigo, que produz o vinagre, uma solução de ácido acético aromatizada, obtida pela fermentação do vinho, da cidra, do malte ou do álcool diluído (SHREVE & BRINK, 1980). O ácido acético para uso industrial e em laboratórios é comercializado na forma de ácido acético glacial (~99,5%), assim chamado porque em dias frios se solidifica com aspecto de gelo (P.F. 17 ℃). O ácido acético é o ácido orgânico mais abunda nte, freqüentemente utilizado como matéria prima para se preparar outros produtos como ésteres acéticos. Outra importante aplicação do ácido acético é como solvente para muitos processos industriais, como na fabricação de acetato de celulose e de produtos farmacêuticos (SHI *et al*., 2005). Recentemente, muitos pesquisadores têm se esforçado para determinar por que ácidos orgânicos, como o ácido acético funcionam como inibidores de crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (JENSEN *et al*., 2003).

Ácido 2-acetoxibenzóico (acetilsalicílico): conhecido como aspirina e empregado como antipirético e analgésico, é produzido pela reação de esterificação do ácido salicílico (2-hidróxibenzóico) com o anidrido acético (SHREVE e BRINK, 1980). O nome ácido salicílico deriva do Latim e designa a árvore do salgueiro, *salix*. Os médicos da Grécia Antiga conheciam as propriedades antipiréticas e redutoras da febre, da casca desta árvore. Em 1829, o químico francês Henri Leroux isolou da casca do salgueiro, o composto ativo na forma pura, a salicina, que é uma molécula estruturalmente semelhante à aspirina (SNYDER, 1995).

Ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico (cítrico): é o responsável pela acidez de frutas cítricas. Para emprego industrial, o ácido cítrico é fabricado pela fermentação aeróbica do açúcar bruto (sacarose) ou açúcar de milho (dextrose) por uma linhagens especiais de *Aspergillus niger*. Seu maior emprego é como acidulante em bebidas carbonatadas e alimentos. No campo médico, é empregado na fabricação de citratos e de sais efervescentes (SHREVE & BRINK, 1980).

Ácido etanodióico (oxálico): é um ácido dicarboxílico tóxico e presente em plantas, como espinafre e azedinhas. Embora a ingestão de ácido oxálico puro seja fatal, seu teor na maioria das plantas comestíveis é muito baixo para apresentar um risco sério (SNYDER, 1995). É um bom removedor de manchas e ferrugem, sendo usado em várias preparações comerciais de limpeza. Além disso, a grande maioria dos cálculos renais é

constituída pelo oxalato de cálcio monohidratado, um sal de baixa solubilidade derivado deste ácido. Seu nome (do Latim*oxalis*) resulta do seu primeiro isolamento do trevo azedo (*Oxalis acetosella*).

Ácido propanóico (propiônico): é um ácido monocarboxílico, saturado, de cadeia aberta, que apresenta um odor pungente, aroma e sabor suave, podendo ser usado como aromatizante (HEATH, 1978). O ácido propanóico é o responsável pelo cheiro característico do queijo suíço (SNYDER, 1995). Durante o período principal de maturação deste tipo de queijo, *Propionibacterium shermanii* e microrganismos similares, convertem ácido lático e lactatos aos ácidos propiônico e acético e a dióxido de carbono. O gás CO_2 gerado é responsável pela formação dos "buracos" característicos do queijo suíço. Suas moléculas se atraem por pontes de hidrogênio e, é solúvel em água, em qualquer proporção. O ácido propiônico e seus sais são amplamente usados como matéria-prima em diferentes indústrias. Os ésteres do ácido propiônico são usados na indústria de perfumes e propionato de celulose é utilizado na indústria de plásticos (GOSWAMI & SRIVASTAVA, 2000).

Ácido butanóico (butírico): seu nome deriva do Latim *butyrum,* que significa manteiga; fornece um odor peculiar à rancidez da manteiga. É usado na síntese de aromas, em fármacos e em agentes emulsificantes (PARKER, 1997).

Ácido 2-hidroxipropanóico (lático): é um hidróxiácido carboxílico que contribui para o sabor de manteiga, e sua estrutura é altamente polar com limitada volatilidade (FORSS & SUGISAWA, 1981). É largamente distribuído na natureza, e comercialmente disponível, sob a forma de solução aquosa que é incolor, inodora, viscosa e não volátil. É usado na indústria de alimentos para inibir a deterioração de azeitonas curadas e para ajustar acidez na produção de queijos (ANTUNES & CANHOS, 1983). Pode ser produzido por meio da fermentação bacteriana da lactose, açúcar do leite, por *Streptococcus lactis*. Fabricado industrialmente pela fermentação controlada de hexoses de melaço, milho e leite, é empregado no curtimento de couros, e na indústria alimentícia, como acidulante. O ácido lático também é produzido pelo corpo humano. Quando a glicose é metabolizada pela atividade muscular anaeróbica, o ácido lático é gerado nos músculos e, então, decomposto (oxidado totalmente) a CO_2 e H_2O (LEHNINGER *et al.*, 1995). Com o exercício intenso, o ácido lático é formado mais rapidamente do que pode ser eliminado. Esta acumulação transiente do ácido lático é responsável pela sensação de cansaço e de dor muscular.

Ácido 2,4-hexadienóico (sórbico)*:* é encontrado em muitas plantas, e empregado como fungicida, conservante em alimentos e na manufatura de plásticos e lubrificantes (PARKER, 1997).

Ácido pentanóico (valérico): é o responsável pelo aroma do queijo *Roquefort.* Foi isolado pela primeira vez da raiz de uma valeriana (do Latim *valere*).

Ácido hexanodióico (adípico): é um ácido dicarboxílico. Seu nome vem do Latim *adipem,* que significa "uma gordura", e reflete a observação de que o ácido adípico é uma das substâncias formadas quando gorduras são oxidadas com ácido nítrico. Sua importância industrial está relacionada com a descoberta do *nylon*, um polímero de condensação, por Wallace H. Carothers e seus colaboradores, pesquisadores da empresa americana Du Pont. Eles descobriram que pela reação de polimerização de uma mistura do ácido adípico e 1,6-diaminohexano poderiam produzir o *nylon* (SNYDER, 1995; SHREVE & BRINK, 1980).

Ácido 3-oxo-L-gulofuranolactona (ascórbico): conhecido como vitamina C, tem seu nome químico representando duas de suas propriedades: uma química e outra biológica. Em relação à primeira, é um ácido, embora este não pertença claramente à classe dos ácidos carboxílicos. Sua natureza ácida em solução aquosa deriva da ionização de uma hidroxila de um dos grupos enólicos (p*K*a = 4,25) (DAVIES *et al.*, 1991). Adicionalmente, o termo ascórbico representa seu valor biológico na proteção contra a doença *escorbuto,* do Latim *scorbutus* (LEHNINGER *et al.*, 1995).

2.1.3. Ácidos orgânicos como blocos de construção

Segundo o Departamento de Energia dos EUA (DOE) e a Comissão Européia, o ácido succínico têm sido apontado como o ácido orgânico de maior potencialidade acerca de uma variedade de aplicações industriais. O mercado para este ácido é de aproximadamente 20.000 – 30.000 toneladas por ano, considerando a sua produção por rota química, a partir do anidrido maleico (KIDWELL, 2008). Compostos que apresentam uma ampla aplicação industrial, a partir dos quais se obtém uma série de subprodutos, estão inseridos no conceito de "blocos de construção", os quais constituem a base para o fornecimento de uma série de substâncias intermediárias e produtos finais, importantes na indústria química. (DELHOMME *et al*., 2009; WERPY *et al*., 2004).

As Tabelas 2.3 e 2.4, mostram a posição de destaque do ácido succínico, em comparação com outros onze blocos de construção, obtidos por rota química ou biotecnológica e os trinta candidatos que podem ser classificados e apresentados, de acordo com o número de carbono em sua estrutura e interesse industrial (PATEL *et al*., 2006). O interesse em processos de produção biotecnológica vem sendo considerado uma alternativa viável do ponto de vista ambiental, dentro do contexto de "biorrefinaria". Com o crescente avanço de processos acerca de produtos derivados de matérias-primas agro-industriais, vários setores industriais se propõem a alcançar maiores índices de qualidade,

com produtos finais mais competitivos e rentáveis, como o ácido succínico (DELHOMME *et al*., 2009) A produção de ácidos orgânicos é amplamente utilizada em escala industrial, sendo limitada a produção de ácidos de origem microbiana, a qual vem apresentando vantagens econômicas sobre a síntese química destes compostos (MATTEY, 1992).

Tabela 2.3. Blocos primários produzidos por rota fermentativa ou química

Blocos de construção
Ácido succínico, fumárico e málico
Ácido 2,5 furanodicarboxílico
Ácido 3 hidróxipropiônico
Ácido aspártico
Ácido glucárico
Ácido glutâmico
Ácido itacônico
Ácido levulínico
3-hidróxibutirolactona
glicerol
sorbitol
Xilitol/ arabinitol

Fonte: *Top Value Added Chemicals from Biomass* (DOE/GO-2006). U.S. Department of Energy

Tabela 2.4. Candidatos em potencial como blocos de construção

Nº de Carbono	**Candidatos em potencial**
1	Monóxido de carbono & Hidrogênio (gás de síntese)
2	nenhum
3	Glicerol, ácido 3-hidróxipropiônico, ácido propiônico, ácido lático
4	Acetoína, ácido aspártico, ácido fumárico, 3-hidroxibutirolactona, ácido malônico, **ácido succínico**, treonina
5	Arabinotil, furfural, ácido glutâmico, ácido itacônico, ácido levulínico, prolina, xilitol,ácido xilônico
6	Ácido 2,5 furanodicarboxílico, ácido glucárico, lisina, sorbitol

Fonte: *Top Value Added Chemicals from Biomass* (DOE/GO-2006). U.S. Department of Energy

.

O campo que investiga produção microbiana de ácidos orgânicos é atualmente, um dos setores de pesquisas que mais vêm avançando, na área biotecnológica. O processo de fermentação aeróbica é o principal processo industrial para a formação de ácidos orgânicos. A glicólise (EMP – *Embden-Meyerhof Pathway*) é o caminho mais comum para a conversão fermentativa da glicose, no qual o ácido pirúvico é o intermediário metabólico-chave. Esse ácido é oxidado de uma maneira cíclica, em um ciclo conhecido como TCA (*tricarboxylic acid cycle*). Algumas modificações no ciclo metabólico podem fornecer os ácidos de interesse com um rendimento maior (THAYSEN, 2005).

Na última década, diversos processos contínuos de fermentação foram descritos e revisados; entretanto, ainda mencionam-se diversos requisitos para que os processos de fermentação sejam atraentes economicamente. Na Tabela 2.5 estão reunidos resultados obtidos com três produtos: ácido cítrico, o qual já se encontra no mercado há algum tempo, ácido láctico, de comercialização ampla e, ácido succínico, com grande potencial para uma variedade de aplicações.

Tabela 2.5. Valores de produtividade e rendimento na produção de ácidos orgânicos em destaque no mercado, por rota fermentativa ou química

P (g/L)	Q_p (g/L.h)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Fonte de Carbono	Microrganismo	Estratégias de condução	Referências
Ácido cítrico						
150	----	----	Glicose	*Aspergillus niger*	Frascos agitados	(REHM *et al*., 2001)
113.5	----	0,71	Beterraba, melaço	*Aspergillus niger*		(LOTFY *et al*., 2007)
114	0,61	0,76	Melaço de cana	*Aspergillus niger*		(IKRAM *et al*., 2004)
40	0,1	0,99	n-Parafina	*Yarrowia lipolytica*		(CROLLA, 2004)
42,9	----	0,56	Glicose	*Yarrowia lipolytica*		(PAPANIKOLAOU, 2006)
140	0,73	0,82	Sacarose	*Yarrowia lipolytica*		(FORSTER, 2007)
Ácido lático						
67,1	5,4	----	----	*Lactobacillus rhamnosus*	Extração em processo contínuo	(HOFVENDAHL & HAN, 2000)
	52/144	----	----	*Lactobacillus spp.*	Batelada e Reciclo de células	
	----	3,1	Proteína	*Lactobacillus spp.*	Eletrodiálise	

P (g/L)	Q_p (g/L.h)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Fonte de Carbono	Microrganismo	Estratégias de condução	Referências
29	----	0,78	Farinha de lentilha	*Lactobacillus amylophilus*	-----	(ALTAF *et al.*, 2007)
40	0,63	0,95	Bagaço de mandioca	*Lactobacillus delbrueckii*	Imobilização	JHON *et al.*, 2007)
58	0,6	0,58	Xilose	*Pichia stipitis*	Hemicelulose de bagaço de cana	(ILMEN *et al.*, 2007)
51.7	----	0,68	Aveia	*Rhizopus oryzae*	Estratégia de biorrefinaria	(KOUTINAS *et al.*, 2007)
95	2,2	0,80	Glicose	*Rhizopus spp.*	Airlift (escala industrial)	(LIU *et al.,* 2006)
122	----	0,61	Caldo de cana	*Saccharomyces cerevisiae*	Cultura neutralizada	(SAITOH *et al.*, 2005)
70	----	0,93	Glicose	*Saccharomyces cerevisiae*	pH baixo	(VALLI *et al.,* 2006)
Ácido succínico						
35.6	1,01	0,82	Trigo	*Actinobacillus succinogenes*	Hidrólise/ Batelada	(DU *et al.,* 2007)
52	1,8	0,76	Glicose	*Mannheimia succiniciproducens*	----	(LEE *et al.,* 2006)
43	0,72	0,53	Glicose	*Escherichia coli*	Batelada	(LIN *et al.,* 2005)
58.3	1,08	0,62	Glicose	*Escherichia coli*	Batelada alimentada	(LIN *et al.,* 2005)
55.2	1,15	----	Melaço de cana	*Actinobacillus succinogenes*	Batelada	(LIU *et al.*, 2007)
83	10,4	0,89	Glicose	*Anaerobiospirillum succiniciproducens*	Batelada Eletrodiálise	(MEYNIAL, 2008)

P: produto final, Qp: Produtividade volumérica, Yp/s: Fator de rendimento em produto

2.2. Ácido succínico

O ácido butanodióico, conhecido como ácido succínico, é um ácido dicarboxílico produzido como um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), ou como produto principal da fermentação anaeróbica por alguns microrganismos (LEE, *et al.,* 2000), constituindo-se em um metabólito comum produzido por plantas, animais e microrganismos (ZEIKUS *et al.*, 1999).

Sua estrutura química, apresentada na Figura 2.1, é representada por $C_4H_6O_4$, e suas características estão apresentadas na Tabela 2.6.

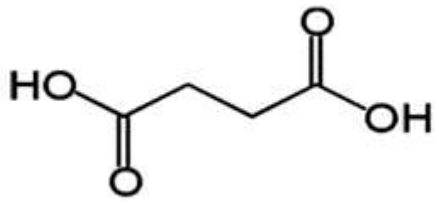

Figura 2.1. Estrutura química do ácido succínico

Basicamente, é um composto sólido em temperatura ambiente, incolor e inodoro. Possui ponto de fusão de 185 ^{0}C e ponto de ebulição de 235 ^{0}C. Sua forma aniônica é o succinato, que constitui um componente do ciclo do ácido tricarboxílico, capaz de doar elétrons para a cadeia transportadora de elétrons.

Tabela 2.6 . Características do ácido succínico

Nomes comuns	**Ácido butanodióico, ácido 1,2-etanodicarboxílico,**
Massa molecular	118,09 u
Aparência	Cristal inodoro/incolor
Gravidade específica	1,572 (20^{0}C /4^{0}C)
Ponto de fusão	184-188^{0}C
Ponto de ebulição	235^{0}C
Volatilidade	0 (21^{0}C)
Outras informações	Combustível e corrosivo

Fonte: www.gadiv.com

2.2.1. Aplicações do ácido succínico

Considerado um componente chave na obtenção de uma série de produtos comercialmente importantes, serve de matéria-prima para fabricação de muitos *comodities* químicos, tais como ácido adípico, surfactantes, solventes verdes, ingredientes estimulantes para crescimento de plantas, antibióticos e vitaminas (MCKINLAY *et al*., 2007; ZEIKUS & JAIN, 1999). O ácido succínico e seus derivados são largamente utilizados como especialidade química para aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (SONG & LEE, 2006).

Destaca-se por permitir a realização de transformações na sua estrutura química de maneira facilitada. Dentre as suas aplicações principais, podem ser destacados três derivados do succinato, obtidos por hidrogenação, que são o 1,4 butanodiol (BDO), tetrahidrofurano (THF), e gamma-butirolactona (GBL), além de moléculas de pirrolidonas (CUKALOVIC & STEVENS, 2008; DELHOMME *et al*., 2009).

De acordo com a potencialidade do ácido succínico, seu uso está voltado para produção de numerosas substâncias químicas com diferentes aplicações industriais, classificadas em três grandes grupos:

I. **Indústria química**: Setor que constitui o maior mercado de aplicação deste ácido, podendo ser usado na fabricação de resinas sintéticas, biopolímeros (PBS, PES), detergentes, solventes biodegradáveis e intermediários para sínteses químicas (WILKE *et al*., 2004). Também pode ser utilizado na produção de fibra de vidro e resinas de troca iônica (LEE *et al.*, 2003 (a); KIM *et al.*, 2004). Segundo RUDNER *et al*. (2005), as substâncias químicas mais importantes, produzidas a partir do ácido succínico, são:

- n-metilpirrolidona: recomendado como substituto do cloreto de metileno como solvente para diminuir poluições tóxicas. Este composto é conhecido como “solvente verde”;
- 1,4-butanodiol: matéria-prima para a produção de resinas, plásticos e polímeros de alta resistência, sendo também utilizado como solvente;
- Tetrahidrofurano (THF): ingrediente de solventes, colas e tintas;
- γ-butirolactona: ingrediente de solventes de tintas e produtos têxteis;
- Ácido adípico: precursor do nylon 6.6 e matéria-prima na fabricação de espumas e produtos industriais;
- Dietil-succinato: químico “verde” utilizado na limpeza de superfícies metálicas e também como removedor de tintas;
- Ésteres lineares alifáticos: utilizados na fabricação de resinas, plásticos e outros produtos de consumo industrial;
- Succimidas: utilizadas como combustíveis e em materiais absorventes.

Conforme já mencionado, anteriormente, o ácido succínico pode substituir uma quantidade acima de 250 produtos químicos que são derivados do benzeno, minimizando a poluição gerada na produção dos mesmos (KERMANSHAHI *et al.*, 2005). Além disso, o etileno-diaminodisuccinato, derivado do ácido succínico, pode substituir o EDTA em muitos processos em que é utilizado atualmente (ZEIKUS, 1999).

II. **Indústria de alimentos**: É usado como modificador de pH e como agente antimicrobiano. O succinato de sódio tem a característica de acentuar o sabor dos

alimentos, podendo ser utilizado no lugar do glutamato de sódio (CAROLE *et al.*, 2004). Outros sais do ácido podem ser utilizados como aditivos no cultivo de plantas e na alimentação animal, atuando como precursor de proteínas, fontes de energia e estimulantes de crescimento. Em alguns aminoácidos é usado para produzir substâncias com qualidades de proteínas de soja.

III. **Indústria farmacêutica**: O ácido succínico é utilizado na produção de fármacos, antibióticos, aminoácidos, vitaminas, sedativos, medicamentos anticoncepcionais e medicinais combatendo inflamações, espasmos, artrites e até mesmo o câncer. O mercado destas substâncias está acima de 400 milhões de dólares ao ano (ZEIKUS, 1999).

O esquema de blocos, ilustrado na Figura 2.2, apresenta essas e outras aplicações do ácido succinico, consideradas importantes.

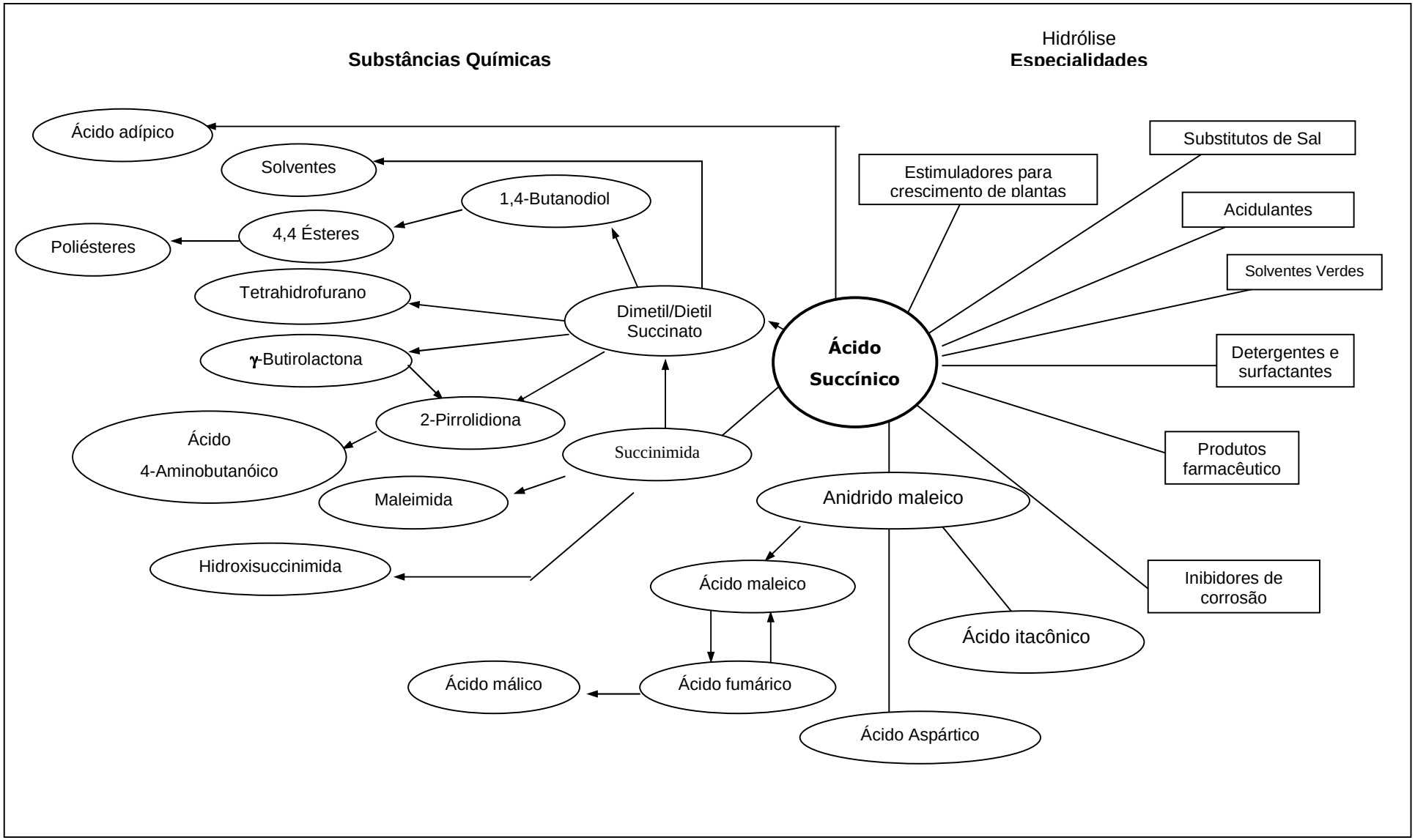

Figura 2.2. Produtos obtidos a partir do ácido succínico, como uma comoditie em potencial. (JOERI *et al*., 2010; CUKALOVIC & STEVENS, 2008 e DELHOMME *et al*., 2009)

2.2.2. Biopolímeros, bioplásticos e plásticos biodegradáveis

Além da demanda crescente de aplicações utilizando ácido succínico, seu uso é estendido à síntese de copolímeros biodegradáveis (RUDNER, 2005), tais como os poliésteres: PES (polisuccinato de etileno), PBS (polibutilenosuccinato), PBSA (polibutileno succinato adipato) e PBT (polibutilenotereftalado) (PRADELLA *et al*., 2006).

Polímeros "verdes" são polímeros semelhantes aos polímeros sintéticos de origem petroquímica, mas que empregam matérias-primas renováveis (BASTOS, 2007). Nesse sentido, são exatamente iguais aos polímeros derivados do petróleo, polimerizados da mesma maneira e com as mesmas propriedades. Os biopolímeros são polímeros naturais sintetizados por organismos vivos, sob as mais diversas condições ambientais, com diferentes composições de monômeros, estrutura macromolecular e diferentes propriedades físicas. Constituem exemplos de biopolímeros o amido, as proteínas e os peptídeos, além dos ácidos nucléicos (DNA e RNA), cujos respectivos monômeros são os açúcares, os aminoácidos e os ácidos nucléicos (PRADELLA *et al.*, 2006)

Os principais tipos de biopolímero são os bioplásticos, como o polipropileno e o polietileno, entre outros, que podem ser usados no segmento de embalagens. Seu consumo ainda é inexpressivo, mas as perspectivas de crescimento são promissoras, particularmente, devido a aspectos ambientais e econômicos. Em 2005, o consumo desses materiais na Europa foi de 40 mil toneladas, o dobro em relação a 2001 (EPOBIO, 2006). Especialistas vislumbram perspectivas promissoras e estimam que, nos próximos dez anos, os bioplásticos representarão cerca de 1% a 2% do mercado mundial (COUTINHO *et al*., 2004).

A maioria dos biopolímeros é biocompatível (não produz efeito tóxico) e biodegradável, decompondo-se em curto espaço de tempo, em ambientes microbiologicamente ativos. No entanto, plásticos sintéticos também podem ser biodegradáveis e a maioria dos que são assim definidos têm como base o petróleo. Os primeiros produtos, originados há mais de vinte anos, eram baseados nas resinas plásticas tradicionais derivadas do petróleo, misturadas com pequenas quantidades de amido. Em presença de água, as resinas se desintegravam em pequenos pedaços e o amido se biodegradava. Posteriormente, novos polímeros biodegradáveis foram desenvolvidos com base em amido e outros produtos naturais (modificados quimicamente ou em reatores biológicos) ou utilizando o próprio petróleo. Há estruturas mais recentes, como os plásticos oxibiodegradáveis, que são baseados em poliolefinas tradicionais, às quais se adiciona um catalisador, aditivo de origem orgânica, como carbono ou hidrogênio, contendo sais de metais de transição que aceleram a oxidação do polímero. Este processo resulta em

moléculas menores, passíveis de serem umedecidas por água, e disponíveis para os microrganismos sob a forma de uma fonte de energia. A taxa de degradação está relacionada à temperatura ambiente (DOTY, 2005).

Portanto, plásticos biodegradáveis podem ser obtidos de polímeros naturais ou sintéticos e podem ser produzidos por fontes renováveis ou não-renováveis. Alguns dos principais plásticos biodegradáveis são poliésteres que podem ser naturais ou sintetizados por meio de fontes renováveis ou não-renováveis (Figura 2.3).

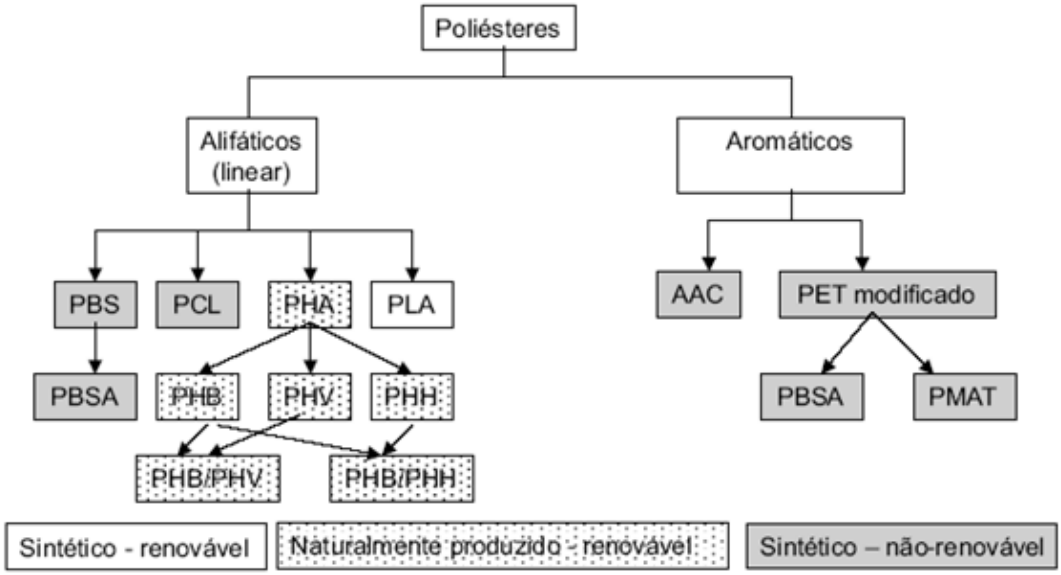

Figura 2.3. Poliésteres alifáticos e aromáticos.

Fonte: NOLAN (2002).

PBS: Polibutileno succinato, PHA: Polihidroxialcanoato, PLA: Polilactato, PBSA: Polibutileno succinato adipato, PHB: Polihidroxibutirato, PHH: Polihidroxialcanaoato, PET: Polietileno tereftalato, ACC: Copoliéster alifático aromático, PMAT: Polimetileno adipato tereftalato

Cabe ressaltar que, apesar das características interessantes dos biopolímeros, tais como biodegradabilidade e o uso de recursos renováveis, muitos ainda não apresentam propriedades físicas idênticas aos polímeros petroquímicos (por exemplo, maior fragilidade e decomposição muito rápida) e, em especial, têm custos de produção elevados, ainda que em queda nos últimos anos (COUTINHO *et al.,* 2004). A questão do preço é, de fato, a principal desvantagem. Biopolímeros como o PLA encontram-se na faixa de € 3,00-4,00/kg, o PHA em € 3,50-5,00/kg e os compostos do amido em € 2,00-4,00/kg, enquanto o preço dos plásticos sintéticos está atualmente em € 1,00/kg.

O PBS é um poliéster alifático sintético obtido através da copolimerização do 1,4 butanodiol (BDO) com ácido succínico, ambos produzidos por fermentação. Munoz-Guerra *et al*. (2005) publicaram a síntese de copoliésteres alifático-aromáticos obtidos pela reação

em massa do PET com o poli (succinato de 1,4 butileno) (PBS) em diferentes proporções de cada homopolímero (KINT *et al*., 2003). A reação do PET pós-consumo com poliésteres alifáticos destaca-se por ser um meio simples e de baixo custo para a produção de novos termoplásticos com propriedades intermediárias entre os poliésteres aromáticos e alifáticos, aliado à vantagem destes copolímeros serem biodegradáveis.

O PET é um material que possui excelentes propriedades térmicas e mecânicas, o que o torna um dos polímeros mais utilizados atualmente, sendo amplamente empregado na fabricação de embalagens de alimentos e bebidas. A elevada produção mundial, estimada em 26 milhões de toneladas no ano de 2000 com previsão de alcançar um total de 55 milhões de toneladas em 2010 (FRADET & TESSIER, 2003), aliada à estabilidade química é responsável, juntamente com outros fatores, pelo acúmulo crescente deste polímero nos aterros sanitários. Apesar de o PET ser inócuo ao corpo humano, devido à sua excelente resistência a agentes biológicos e atmosféricos, ele torna-se nocivo ao meio ambiente (KINT & MUNOZ, 1999).

Fatores econômicos e ambientais advogam em favor da reciclagem em grande escala do PET, de maneira similar ao que já acontece atualmente com materiais convencionais como vidro, papel e metal (LOUP *et al*., 2003). Muitos trabalhos vêm sendo realizados visando obter copolímeros com propriedades térmicas e mecânicas interessantes, porém com características de biodegradabilidade superiores quando comparadas ao PET.

Copolímeros de PET obtidos através da inserção de moléculas sulfonadas na sua cadeia possuem biodegradabilidade bastante alta quando comparada com o PET (GAONA & ILARDYA, 2003). WITT *et al.* (1997) sintetizaram diferentes copolímeros alifático-aromáticos e observaram que em uma faixa em torno de 35 a 55% em mols de ácido tereftálico obtêm-se copolímeros com uma boa relação entre propriedades mecânicas e térmicas e biodegradabilidade.

O PES é sintetizado através da reação de policondensação entre os monômeros etilenoglicol (EG) e ácido succínico (AS) com uma proporção inicial de EG/AS=3/1, com a eliminação da água formada e do etilenoglicol em excesso (FRADET, 2003). O copoliéster, obtido da reação do PET e PES, pode apresentar na sua estrutura as seqüências TET (tereftalato etileno tereftalato), SES (succinato etileno succinato) e TES (tereftalato etileno succinato), conforme mostra a Figura 2.4.

O desenvolvimento dessas rotas alternativas possibilitará redução de custos de produção, de modo a tornar o PBS uma alternativa futura aos polímeros convencionais (PET) e mesmo a outros biopolímeros (PLA). Hoje, seu custo só permite o uso como blenda com amido ou copolímeros adipatos, produzidos pela japonesa Showa Highpolymer

e a coreana SK Polymers (NOLAN, 2002). A DuPont, a Eastar e a Basf produzem o polibutileno succinato tereftalato (PBST), com base no BDO e no ácido succínico (BASTOS, 2007)

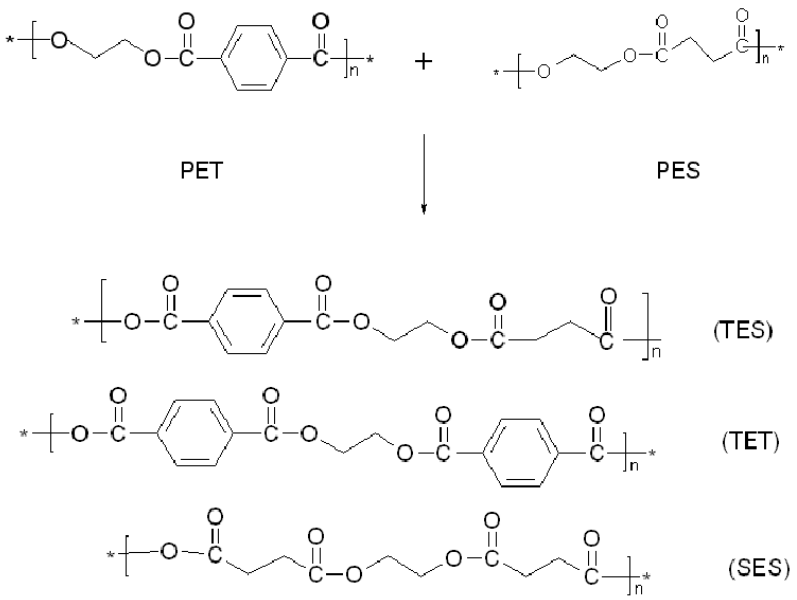

Figura 2.4. Estruturas possíveis para os copolímeros PET-*co*-PES. Fonte: (PIRES *et al*., 2005)

2.2.2.1. O Potencial das inovações de base biotecnológica em biopolímeros

É importante destacar os diversos mecanismos de apoio governamental mobilizados para biopolímeros e biotecnologia industrial, por meio da concessão de recursos para pesquisa, desenvolvimento e inovação, além de modificações na legislação com vistas a estimular o uso de biopolímeros e polímeros “verdes”.

No Brasil, já é possível identificar iniciativas orientadas para a produção de alguns biopolímeros, como bioplásticos com base no açúcar, o PHB e o PHB-HV, pela empresa PHB Industrial, a partir de tecnologia desenvolvida em parceria com universidades e instituições de pesquisa. Há ainda, a produção de quitosana pela Polymar com a Padetec (UFCE), além de projetos para produção de goma xantana, pelas empresas Policam e Quantas, por meio de tecnologias desenvolvidas em universidades brasileiras e, diversos outros casos em que os resultados de pesquisas científico-acadêmicas no país poderão originar, futuramente, produção local de biopolímeros. Um desses exemplos corresponde ao desenvolvimento de bioplástico à base de amido de milho (ou outros cereais, raízes e tubérculos) e de gelatina, por pesquisadores da Unicamp. Outro exemplo é o desenvolvimento do PHB e do PHB-HV pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica/UFSC,

com base na frutose do bagaço de maçã. Como regra geral, essas iniciativas resultam de projetos cooperativos de pesquisa de empresas de menor porte com universidades.

Na área de polímeros fabricados com base em matérias-primas renováveis (os polímeros “verdes”), por outro lado, as iniciativas são de grandes grupos, tradicionais empresas químicas como a multinacional Dow Química ou a maior empresa petroquímica brasileira, a Braskem (grupo Odebrecht), por meio da busca de alternativas ao petróleo, com projetos para produção de polietileno “verde”, ou seja, o polietileno convencional polimerizado a partir do etileno obtido do etanol da cana-de-açúcar e não da nafta petroquímica (VALOR, 2007). A primeira está buscando parceria com o fabricante da matéria-prima da cana-de-açúcar (Crystalsev), para produção de 350 mil t/a de polietileno verde, enquanto a Braskem objetiva produzir de 100 mil a 200 mil t/a de polietileno do etanol da cana adquirido do mercado (DCI, 2007). Os dois investimentos são típicos projetos da alcoolquímica, que, embora sem envolver inovações tecnológicas radicais como os biopolímeros, estão em consonância com a tendência mundial de valorização de matérias-primas renováveis.

2.3. Aspectos mercadológicos da produção mundial de ácido succínico

O cultivo da cana-de-açúcar é privilégio de poucos países, estando o Brasil em uma posição muito favorável, em relação a esta biomassa. Dessa forma, é natural que o avanço da biorrefinaria no Brasil se dê, inicialmente, com a cana-de-açúcar, em vez da madeira. Um estudo recente indica que, considerando os preços atuais de mercado da madeira, do petróleo e do bioetanol, a utilização mais lucrativa da madeira em grande escala é ainda para a produção de polpa Kraft branqueada. Neste estudo, foi determinada a seguinte relação relativa de lucratividade, para o uso da madeira: 100% para a produção de polpa Kraft branqueada, 7% para a queima em caldeira de biomassa, para produção de vapor/energia e 46% para a produção de bioetanol (COLODETTE, 2008). Porém, a produção de ácido succínico, a partir da madeira, apresentaria lucratividade de 800%, isto é, 8 vezes maior que a produção de polpa branqueada.

Deve ser ressaltado que o mercado mundial de ácido succínico não excede a US$ 2 milhões anualmente. Naturalmente, todos esses cálculos econômicos são baseados no preço de US$ 110/barril de petróleo. Em suma, com os crescentes aumentos no preço do petróleo e a potencial exaustão desse recurso natural não renovável, a biorrefinaria tornar-se-á uma realidade cada vez menos contestada.

O mercado global para ácido succínico, incluindo rota biotecnológica e química, foi projetado para crescer a uma taxa anual de 23.5% entre 2006 e 2015, estimando-se alcançar em torno 144.7 mil toneladas nos próximos cinco anos. Este crescimento pode ser justificado pelos interesses acerca da sua posição de destaque como bloco de construção. Em um relatório publicado, através do Mercado Global, foi descrito um total de 27 grandes empresas que estão empenhadas em consolidar a produção em larga escala de ácido succínico, como a ARD (Agro-Industrie Recherches et Développements, França), Anhui Sanxin Chemical Co., Ltd.(China), Anqing Hexing Chemical Co., Ltd. (China), BASF SE (Alemanha), Bio-amber S.A.S (França), DNP Green Technology, Inc.(EUA), Kawasaki Kasei Chemicals Ltd.(Japão), e a MBI International, Myriant Technologies, LLC (EUA), Roquette Frres S.A. (França) e a Royal DSM N.V.

A Royal DSM N.V e a Roquette criaram uma aliança estratégica para comercializar ácido succínico em escala industrial, até o final de 2011, a partir de um processo de fermentação com fontes renováveis (glicose) e suprimento de CO_2. Desde 2009, uma planta piloto para demonstração foi inaugurada em Pomacle (França) (KIDWELL *et al.,* 2008 e SCOTT *et al*., 2009). Uma integração com a DNP Tecnologia Verde e a ARD (BioAmber), anunciou uma capacidade de produção anual de 2.000 toneladas.

No início de 2011, a BioAmber entrou em acordo exclusivo de licenciamento de tecnologia com a CELEXION para produzir ácido succínico e ácido adípico, a partir de fontes renováveis, aumentando sua infra-estrutura. A empresa também criou uma unidade de P&D em Plymouth (Minnesota) com uma considerável eficiência em seus processos fermentativos, em química analítica e biologia molecular (BIOAMBER, 2011).

No mesmo período, a Myriant Technologies (Myriant) e a Davy Process Technology (Davy), uma empresa Johnson Matthey, assinaram um memorando de entendimento, sobre a utilização de ácido succínico como matéria-prima para a obtenção de 1,4-butanodiol e gama-butirolactona (GBL), visando minimizar os custos de recuperação e purificação do ácido succínico, na etapa de *Downstream*. Nos ultimos quinze anos, as empresas Davy desenvolveram uma tecnologia baseada em butanodiol obtido pelo anidrido maleico e, licenciou mais de meio milhão de toneladas de capacidade anual sobre a produção das diferentes misturas de tetraidrofurano (THF), butanodiol (BDO) e gama-butirolactona (GBL) (MYRIANT, 2011).

Não obstante, mais uma aliança, almejando licenciamento no período entre 2010 e 2011, foi criada entre a Myriant Technologies LLC e a Uhde, para estudos de engenharia, de obtenção e construção de uma planta industrial. As empresas começaram, inclusive, a

disponibilizar amostras para a verificação das especificações e da qualidade do produto para os seus clientes. A companhia espera com este ritmo, começar uma produção comercial até 2012 (MCCONNELL *et al*., 2009). Outras empresas, como a BASF AG e a Purac Ltd, também anunciaram parcerias para produzir ácido succínico em escala industrial. Enquanto isso, a Mitsubishi Chemical Corp. Ltd, e a PTT PLC estão em andamento com os estudos para fabricação do polímero biodegradável, PBS, derivado de ácido succínico (MM *et al*., 2009).

O valor monetário do ácido succínico, produzido por síntese química, está na faixa de US$ 5,90 – 8,80/kg dependendo do seu grau de pureza (SONG & LEE, 2005). De acordo com . Koutinas *et al.* (2007), a produção de ácido succínico via fermentativa, a partir de glicose, poderia reduzir o preço de mercado em relação à rota petroquímica, de US$ 7,0/kg para US$ 0.6/kg.

O comércio de substâncias químicas, derivadas do ácido succínico, estaria em torno de aproximadamente 16.000 toneladas por ano (PATEL, 2006). Entretanto, o mercado em potencial é estimado para aproximadamente 270.000 toneladas ao ano, caso o ácido succínico realmente venha a substituir o anidrido maleico como precursor de uma série de produtos químicos de interesse industrial (DELHOMME, 2009; WILLKE &VORLOP, 2004).

Ainda, de acordo com OTERO (2009), a produção de ácido succínico apresenta uma demanda mundial anual que excede US$ 2 bilhões, acima dos 160 milhões/kg produzidos atualmente pela rota petroquímica, mediante a conversão do anidrido maleico (OTERO *et al*., 2009).

Pode se concluir, que o interesse na produção de ácido succínico por fermentação está, claramente, associado às aplicações para a obtenção de plásticos biodegradáveis. Além disso, o uso de recursos renováveis resultam em uma redução de energia em torno de 30-40% em relação a um processo químico atual, diminuindo as emissões de CO_2, já que se trata do primeiro processo onde o CO_2 é usado ativamente durante a produção (WILLKE & VORLOP, 2004; ZHANG, 2008).

2.4. Processos de produção de ácido succínico

2.4.1. Rota química

Atualmente, a maioria do ácido succínico produzido comercialmente é resultado da síntese química envolvendo a hidrólise de produtos derivados do petróleo, o qual está associado a processos ambientalmente não favoráveis, gerando níveis de poluição. Esse processo se dá com a oxidação do butano até anidrido maleico, que é hidrolisado até

obtenção do ácido maleico (CORNIL & LAPPE, 2002). Em seguida, através de sua hidrogenação é obtido o ácido succínico (ZEIKUS *et al.*, 1999), conforme mostra a Figura 2.5.

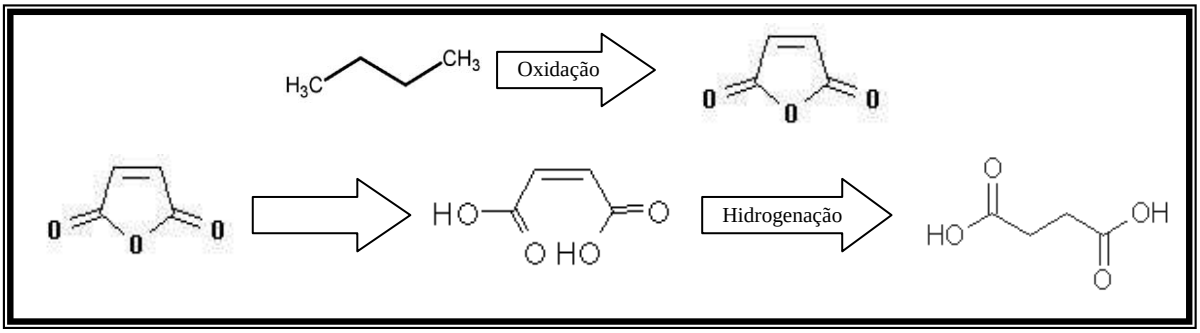

Figura 2.5. Síntese química para obtenção do ácido succínico (ZEIKUS *et al.,*1999)

O custo elevado para a conversão de anidrido maleico para ácido succínico, representa uma limitação para as diversas aplicações deste produto. Entretanto, devido a questões de impacto econômico e ambiental, atenção tem sido focalizada na produção fermentativa de ácido succínico por microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos, como uma alternativa para a síntese química (ISAR *et al.,* 2006; SONG *et al.,* 2007; LIU *et al.*, 2008 e SAUER *et al*., 2008).

2.4.2. Rota fermentativa

Existem vários processos fermentativos para a produção de ácidos orgânicos, que diferem principalmente no tipo de fermentação e no microrganismo utilizado. Os processos podem ser em superfícies (líquidas ou sólidas) ou em meios líquidos, podendo ainda utilizar leveduras, bactérias ou fungos (GOLDBERG *et al*., 1991). A sobrevivência das companhias produtoras de ácido depende muito do baixo custo de produção, por se tratar de um mercado de preços bastante suscetíveis, com uma ligeira margem de lucro, aumento constante do número de companhias produtoras e o constante aumento de produtos sintetizados quimicamente. A estratégia de condução do processo fermentativo, requer estudos prévios de otimização, visando maiores rendimentos, contribuindo para diminuir os custos do processo (MCKINLAY *et al.,* 2007).

O processo fermentativo pode ser operado por três formas: batelada simples, batelada alimentada ou contínuo. Na batelada simples, ao meio de fermentação é adicionada uma suspensão celular e o processo é transcorrido, sem adições de meio novo, nem retiradas de meio reacional durante o seu curso. A batelada simples é caracterizada por alteração nas condições ambientais a todo instante do processo (as concentrações de

nutrientes são reduzidas e de células, produtos e sub-produtos aumentadas) (PEREIRA JR., 2005). O principal problema desta forma de se operar o processo fermentativo é decorrente de fenômenos de inibição pelo substrato, produto, ou outros metabólitos. Para se contornar esses problemas associados à inibição, outras formas de condução podem ser utilizadas, como a batelada alimentada, que possibilita a manutenção da concentração desses inibidores/repressores em níveis sub-inibitórios/sub-repressores, com implicações diretas no desempenho da célula. A técnica de batelada alimentada é definida como um modo de operação onde um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao fermentador, intermitentemente ou continuamente, sem que ocorra retirada de material durante a operação (PEREIRA JR., 2005). A condução contínua é outra modalidade de se operar fermentadores. Como o próprio nome sugere tanto a alimentação de meio nutriente, quanto à retirada de produto (meio fermentado) são realizadas de forma contínua. Sua principal vantagem, quando comparada com outras formas de condução, está ligada à possibilidade de se operar o sistema por extensos períodos de tempo, resultando em aumento de produtividade (PEREIRA JR., 1991).

A fermentação está se tornando cada vez mais, parte integrante do desenvolvimento de novos produtos de alto valor agregado e está substituindo rotas convencionais para produção de importantes produtos químicos (HOEK *et al*., 2003). O etanol, o butanol e o ácido láctico são os produtos mais tradicionais de processos fermentativos, e são formados como resultado do metabolismo anaeróbio de açúcares. Porém, há uma série de vantagens ligadas à obtenção biotecnológica do ácido succínico, destacando-se a possibilidade de planejamento de produções alternativas, seqüenciais ou conjuntas com outros produtos de interesse no mercado como: ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, propiônico e/ou etanol, cujas produções se dão com o emprego de matéria-prima renovável, particularmente, os resíduos agrícolas e agro-industriais, decorrentes do processamento da cana-de-açúcar; (ZEIKUS *et al.*, 1999).

2.4.2.1. Matérias-primas utilizadas na produção de ácido succínico

Uma grande variedade de matérias-primas para a produção de ácido succínico, utilizadas como fonte de substrato/carbono/energia, pode ser encontrada descrita na literatura. Diferentes estratégias para fermentação também tem sido reportadas a partir de soro do queijo (SAMUELOV *et al*., 1999;LEE *et* al., 2000,2003a; WAN *et al*., 2008), melaço de cana de açúcar (AGARWAL *et al*., 2006; LIU *et al.,* 2008), hidrolisado de madeira (LEE *et al.*, 2003b e OKUDA *et al.,* 2007), hidrolisado da madeira destoxificado (HODEG *et al*., 2009), hidrolisado da palha de arroz (DONNELLY, 2004), fibra de milho (CHEN *et al.,*

2010), resíduos de talo de milho (corn stover) (LI *et al*., 2010), alcachofra e topinambo de Jerusalém (REN *et al.,* 2008); trigo (DORADO *et al*., 2009), milhocina (AGARWAL *et al*., 2006); palha de trigo (DU *et al.*, 2008) e hidrolisado do sake (CHEN *et al*., 2010).

A viabilidade técnica, os balanços mássicos e energéticos e a economicidade são aspectos relevantes que devem ser considerados na escolha da matéria-prima. Dessa forma, as matérias-primas para bioprocessos podem ser agrupadas em função da estrutura e complexidade molecular dos substratos (reagentes primários dos quais o produto é obtido). Em algumas, os substratos encontram-se na forma polimérica, e sua hidrólise prévia será necessária, caso o agente biológico não seja capaz de sintetizar enzimas que catalisam a despolimerização desses substratos (PEREIRA, 1991). Assim, essas matérias-primas podem conter:

- Substratos solúveis que podem ser facilmente extraídos e convertidos prontamente a produto(s), como por exemplo: sacarose, glicose, frutose e lactose, de cana de açúcar, beterraba, melaço, soro de leite etc.
- Polissacarídeos insolúveis, que precisam de tratamento moderado para solubilização e hidrólise, antes da conversão a produto(s), como por exemplo: amido de milho, mandioca, trigo, cevada, batata, etc.
- Polissacarídeos insolúveis altamente resistentes, que necessitam de pré-tratamento físico, seguido de hidrólise química ou enzimática para produzir substratos na forma monomérica, que serão convertidos a produto(s), como por exemplo: celulose e hemicelulose de matérias primas lignocelulósicas.

A Figura 2.6 apresenta a classificação das matérias-primas em função de seus respectivos substratos. O desenvolvimento das novas tecnologias visa o aproveitamento de resíduos agroindustriais, materiais lignocelulósicos, no intuito de diminuir os custos associados às matérias primas, que podem atingir 2/3 do custo total de produção, e incrementar os níveis de produtividade. Há que se ressaltar, que a matéria-prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção, havendo casos em que pode representar até 75% dos custos totais, sendo esta uma das razões pelo crescente interesse no aproveitamento de resíduos agro-industriais e florestais como matérias-primas para a produção não somente de ácidos orgânicos, mas de uma grande gama de substâncias químicas de forte interesse comercial (BETANCUR & PEREIRA JR, 2010).

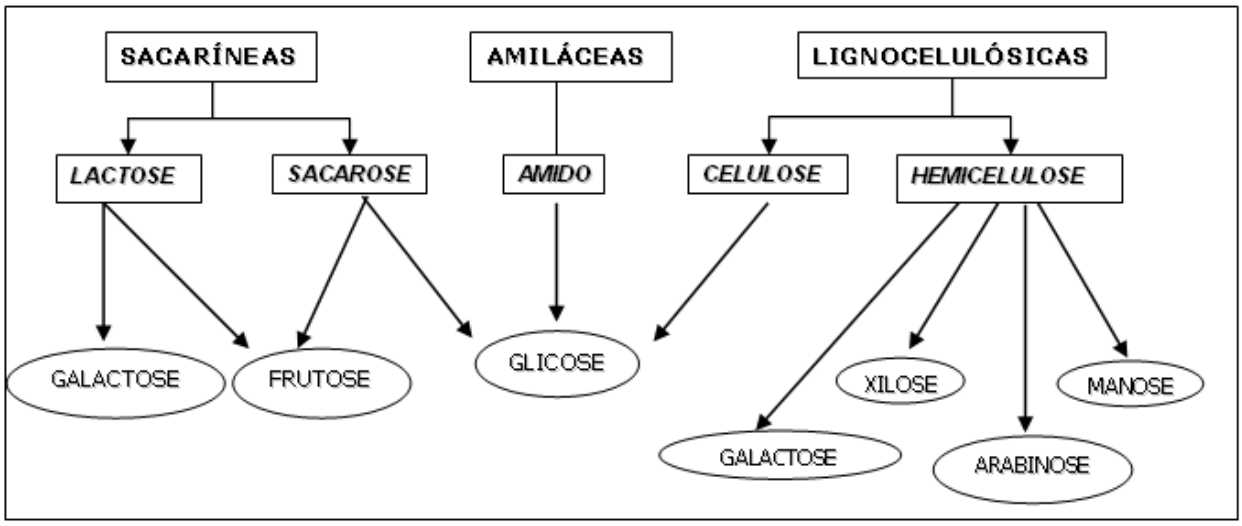

Figura 2.6. Principais matérias-primas glicídicas e seus substratos correspondentes.
Fonte: PEREIRA JR. (1991)

2.4.3. Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, participando com aproximadamente 50% da biomassa terrestre. O termo *estrutura lignocelulósica* (Figura 2.7) refere-se à parte do vegetal que forma a parede celular (meia-lamela, paredes primária e secundária), composta por estruturas fibrosas, constituídas basicamente por polissacarídeos [*celulose* (40-60%) e *hemicelulose* (20-40%)] (SANTOS & PEREIRA JR, 2009). Estes componentes estão associados a uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas, denominada *lignina* (15-25%). De uma forma geral, pode-se afirmar que estes materiais possuem em sua composição, aproximadamente, 65-75% de polissacarídeos (em base seca), que contêm em suas unidades monoméricas, valiosos glicídios (açúcares) (PEREIRA JR, 2010).

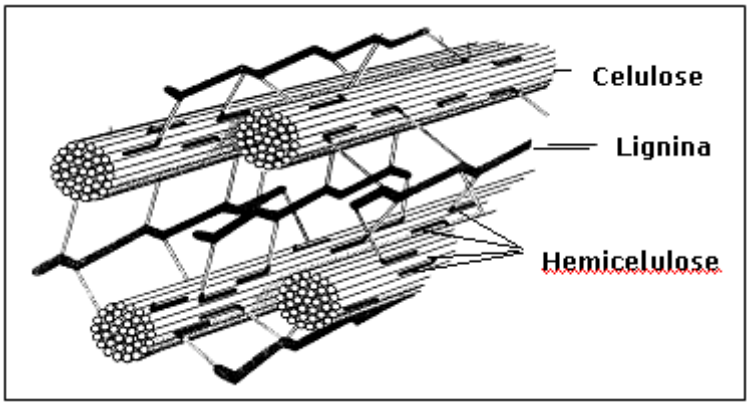

Figura 2.7. Polímeros constituintes do material lignoceulósico (SHLESER, 1994)

Dentre os resíduos agro-industriais de composição lignocelulósica de maior importância destacam-se: bagaço e palha de cana; sabugo e palha de milho; palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada e resíduos municipais baseados em papel (Tabela 2.7). No contexto brasileiro, estima-se que somente o setor sucro-alcooleiro gere, aproximadamente, 16 milhões de toneladas de bagaço de cana excedente e 76 milhões de toneladas de palha (DEDINI, 2007 e MAPA, 2008).

Tabela 2.7. Composição de resíduos agro-industriais

Fonte	Composição (%)				
	Celulose	**Hemicelulose**	**Lignina**	**Extrativos**	**Cinzas**
Bagaço de cana	33-36	28-30	18-20	4-6	2-4,8
Palha de arroz	32-37	19-24	9-13	4-5	12-18
Sabugo de milho	34-36	16-24	15-19	2-6	2-4
Palha de trigo	30-33	22-28	14-18	3-7	3-7
Palha de sorgo	34-36	25-26	25-26	-	-
Jornal impresso	40-55	25-40	18-30	-	-
Madeiras	~50	~20	15-20	Até 10	Até 5

Fonte: SUN & CHENG (2002), PANDEY *et al*. (2000), OLSSON & HAHN-HÄGERDAL (1996)

As composições em glicídeos da celulose e da hemicelulose são mostradas na Tabela 2.8, apresentando variações segundo o tipo de material lignocelulósico.

Tabela 2.8. Constituintes básicos de alguns materiais lignocelulósicos

	Sabugo de milho	**Palha de trigo**	**Palha de arroz**	**Bagaço de cana**	**Semente de algodão**	**Jornal impresso**	**Resíduos urbanos**
Glicídeos (%)							
Glicose	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0	64,4	40,0
Manose	0,3	0,8	1,8	n.d.	4,1	16,6	8,0
Galactose	0,8	4,4	0,4	1,1	0,1	n.d.	n.d.
Xilose	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6	4,6	14,0
Arabinose	4,2	4,4	4,5	4,5	4,3	0,5	4,0
Outros (%)							
Lignina	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6	21,0	20,0
Cinzas	4,3	9,6	4,4	4,8	14,8	0,4	1,0
Proteínas	4,0	4,0	n.d.	4,0	4,0	n.d.	n.d.

n.d. medidas não determinadas
Fonte: LEE (1998)

2.4.3.1. Celulose

A celulose é o polímero orgânico considerado como o maior constituinte da parede celular das plantas e uma das estruturas que é constantemente regenerada durante a fotossíntese. É um homopolissacarídeo linear composto por unidades de β-D-glicose, unidas por ligações β (1-4) carbono-carbono (Figura 2.8 (1)) (PANDLEY, 2000; LEE, 1997). A molécula de celulose possui entre 8000 e 14000 unidades de glicose, dependendo do tipo de planta, apresentando uma massa aproximada de 2,3 milhões de umas (unidades de massa atômica) (SHLESER, 1994). As cadeias de celulose formam entre si ligações de hidrogênio intramoleculares (O6-H-O2' e O6-H-O3') e intermoleculares (O3-H-O5') (Figura 2.8 (6)).

Estas ligações conferem alta rigidez e elevado grau de ordenação à estrutura, criando as denominadas regiões cristalinas, responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da celulose (LEMOS, 2001).

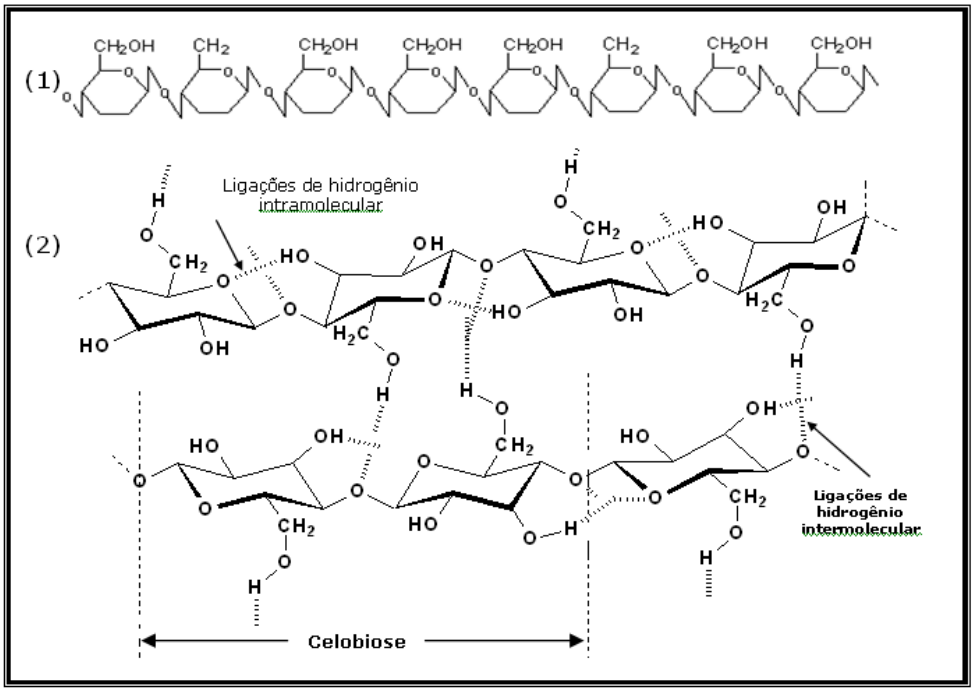

Figura 2.8. Disposição das moléculas de glicose, unidas por ligações Glicosídicas (1) (COUGHLAN, 1985 *apud* LEMOS, 2001); Estrutura simplificada da Celulose (2) (PEREIRA Jr., 1991)

2.4.3.2. A Lignina

A lignina, rica em compostos aromáticos, presente em todas as plantas superiores, é a responsável pela rigidez da parede celular em vegetais, da sua resistência ao impacto, compressão e dobra, sendo também um agente permanente de ligação entre as células (LEMOS, 2001). Cabe destacar que a lignina quando liberada dificulta os processos fermentativos. Estruturalmente, é uma complexa macromolécula aromática, hidrofóbica e opticamente inativa, com numerosas ligações cruzadas (aproximadamente 10 tipos diferentes). A macromolécula deriva da polimerização desidrogenativa de três álcoois: álcool trans-coniferílico, trans-p-cumárico e álcool trans-sinapílico, conforme mostra a Figura 2.9 (CARAMEZ, 1999).

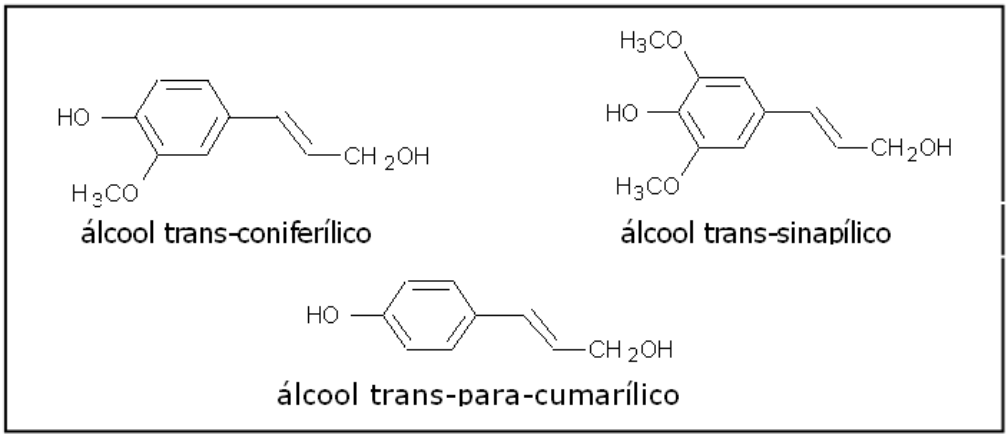

Figura 2.9. Álcoois precursores da lignina
Fonte: d'ALMEIDA (1988)

2.4.3.3. A Fração Hemicelulósica

Da estrutura complexa da hemicelulose participam dois tipos de unidades de açúcar, formando macromoléculas com 100 a 200 unidades, que, em conjunto, atingem uma massa molecular bem menor do que a da celulose.

Entre as unidades de pentoses e hexoses que formam a estrutura da hemicelulose destacam-se a β-D-manose, β-D-glicose, α-L-arabinose, α-D-galactose e principalmente, β-D-xilose, em proporções que dependem da origem do meterial lignocelulósico. Adicionalmente, podem ser encontrados ácidos como β-D-glucurônico, β-D-galactourônico e α-D-4-O-metilglucurônico, e alguns grupos acetil (CARAMEZ, 1999).

A macromolécula da hemicelulose (Figura 2.10), sem regiões cristalinas devido ao seu grau de ramificação, é constituída por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa

molecular, como xilanas, arabinanas, mananas, e ainda polissacarídeos mais complexos como arabinoxilanas, glucoarabinoxilanas, arabinogalactanas, arabinoglucoranoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas, galactoglucomanas e galactomanas (FOGEL, 2004).

A xilana é o componente majoritário do complexo hemicelulósico, constituindo entre 15% e 30% da massa seca de madeiras e resíduos agro-industriais. Depois da celulose as xilanas constituem a mais abundante fonte de carboidratos das plantas. As xilanas correspondem a 15-30% da massa seca total nas madeiras duras, formadas, principalmente, por glucouranoxilanas, e a 7-12% das madeiras macias, formadas, principalmente, por galactoglucomananas e arabinoglucouranoxilana (CARAMEZ, 1999).

No caso do pré-tratamento ácido do material lignocelulósico, visando à solubilização da hemicelulose, gera-se uma mistura de glicídeos na qual a xilose é majoritária, alcançando os dois terços dos açúcares redutores (DELGENES *et al*., 1998).

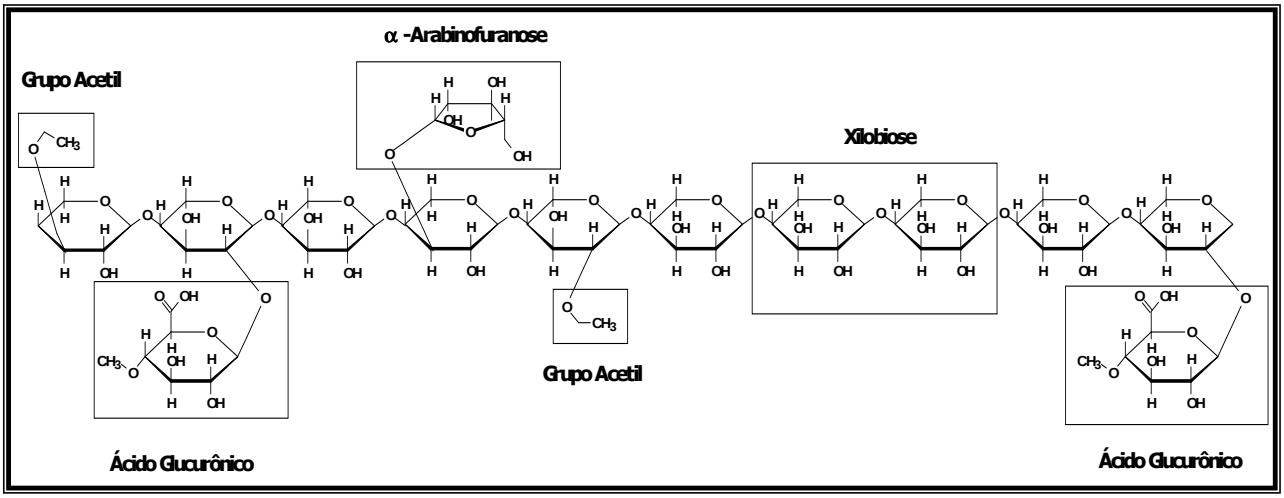

Figura 2.10. **Estrutura Típica da Hemicelulose**
Fonte: MUSSATTO (2002)

2.4.4. Materiais lignocelulósicos e o contexto de biorrefinaria

O aproveitamento de materiais de composição lignocelulósica tem focalizado a produção não convencional de etanol combustível. No entanto, já podem ser observados intensivos esforços e grandes investimentos no sentido de se diversificar o uso desses abundantes resíduos, dentro do conceito, do que vem sendo denominado, de Biorrefinaria.

Biorrefinaria é um termo relativamente novo, que se refere ao uso de matérias-primas renováveis (*biomassas*) e de seus resíduos, de maneira mais integral e diversificada, para a produção, por rota química ou biotecnológica de uma variedade de valiosas substâncias e energia, com mínima geração de resíduos e emissões (PEREIRA JR, 2008).

O conceito de Biorrefinaria é construído com base em duas plataformas diferentes. Ambas visam fornecer blocos de construção para a obtenção de diferentes produtos. A plataforma bioquímica focaliza a fermentação dos glicídios (açúcares) extraídos das biomassas por processos hidrolíticos. A plataforma termoquímica enfoca a gaseificação ou a pirólise da biomassa e de subprodutos dos processos de conversão (PEREIRA JR, 2008). A Figura 2.11 ilustra as duas correntes para o aproveitamento das biomassas, sendo a plataforma bioquímica aquela sobre a qual o presente trabalho está, fundamentalmente, baseado.

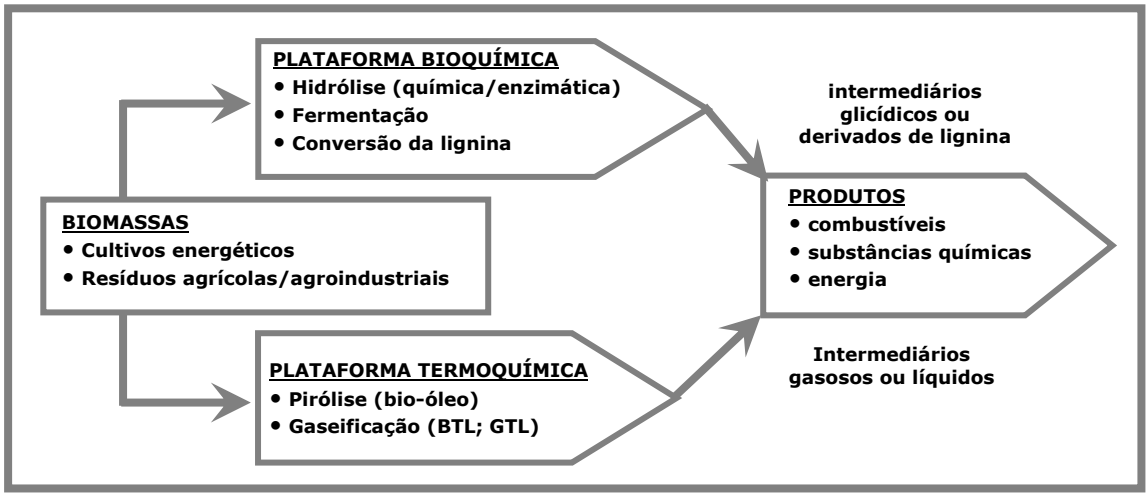

Figura 2.11. Esquema simplificado das rotas tecnológicas para o desenvolvimento de Biorrefinarias (Fonte: PEREIRA JR. *et al.*, 2008)

2.4.5. Bagaço de cana-de-açúcar

O cultivo de cana de açúcar começou no Brasil no século XVI com o intuito de produzir açúcar e romper com o monopólio promovido pela França. No início da década de 70 a produção atingia os 50 milhões de toneladas e, com a implantação do PROALCOOL, este valor elevou-se consideravelmente no ano de 1985 (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999). Segundo algumas estimativas, a safra de cana-de-açúcar aumentou de 318 milhões de toneladas em 2007 para 514 milhões de toneladas em 2008, chegando a aproximadamente 730 milhões em 2010 (SANTOS, 2009). Atualmente, o bagaço gerado nas usinas é consumido para produção de energia por meio da co-geração, tornando as usinas auto-sustentáveis energeticamente.

Com a moagem da cana-de-açúcar para a extração do caldo de cana, geram-se grandes quantidades de bagaço de cana, normalmente utilizadas para a produção de vapor e eletricidade em processos de pouca eficiência, devido à inexistência de aplicações

mais atraentes para o material. Atualmente, pretende-se desenvolver processos que permitam um aproveitamento mais racional do bagaço de cana, como a produção biotecnológica de diversas substâncias como etanol, xilitol e ácido succínico (ARIFEEN, 2007; KOUTINAS, 2007 e DU, 2008). Para este tipo de aproveitamento é necessária a liberação dos glicídeos constituintes das diferentes frações hemicelulósica e celulósica, utilizando pré-tratamentos economicamente viáveis que permitam a extração com pouca degradação dos açúcares e baixas concentrações de inibidores (SUN & CHENG, 2002).

A existência de processos eficientes para a extração dos glicídeos, unida à integração energética das usinas que inclui o uso de caldeiras mais eficientes, e à substituição de parte do bagaço queimado por outros materiais como palha, permitiriam uma disponibilidade de bagaço próxima a 78% do obtido no processo de moagem. Esse excedente de bagaço poderia ser destinado a etapas de pré-tratamento e posterior transformação em substâncias de maior interesse comercial (BETANCUR, 2010).

2.4.6. Tipos de Pré-Tratamento

Um pré-tratamento é considerado bom se a acessibilidade ao ataque biológico, isto é, das enzimas, é maximizada e a formação dos co-produtos inibidores é minimizada. Os diferentes tipos de pré-tratamento, aplicados a materiais lignocelulósicos para clivar as ligações das macroestruturas, podem ser classificados como físicos, físico-químicos, químicos e biológicos.

Os pré-tratamentos físico-químicos são utilizados para aumentar a susceptibilidade do material lignocelulósico ao ataque enzimático. Caracterizam-se pelo tratamento do material em elevadas pressões e temperaturas, e o posterior resfriamento rápido. São eles:

- ✓ Explosão a vapor ou auto-hidrólise: O material é tratado em contato com vapor de água saturado, permitindo a solubilização de alguns monômeros e variados polissacarídeos da fração hemicelulósica, a transformação da lignina e o aumento da susceptibilidade da celulose a posterior hidrólise.
- ✓ Explosão por amônia: Neste caso o material é impregnado ou embebido numa solução de amônia durante o processo com o intuito de aumentar taxa de sacarificação.
- ✓ Explosão por CO_2: Neste caso o material é impregnado com CO_2 que se transforma no correspondente ácido e incrementa o processo hidrolítico.

No caso dos pré-tratamentos químicos, alguns desses processos são descritos a seguir:

- ✓ Hidrólise ácida: Neste processo são utilizados ácidos como catalisadores do rompimento entre as frações, e/ou das próprias frações, em condições que variam desde as mais drásticas, com o objetivo de hidrolisar a celulose, até moderadas, para a solubilização seletiva da fração de hemicelulose.
- ✓ Ozonólise: O ozônio é utilizado neste processo para retirar a lignina do material lignocelulósico deixando-o mais accessível ao ataque enzimático.
- ✓ Hidrólise alcalina: A presença de álcalis durante o processo de hidrólise permite a saponificação de ligações éster, ocorrentes entre xilanas e entre xilana e lignina, permitindo a extração de uma parte dessas frações, ao mesmo tempo em que é reduzida a cristalinidade das fibras do complexo.
- ✓ Deslignificação oxidativa: Neste processo enzimas peroxidases são utilizadas para biodegradar a lignina em presença de H_2O_2 aumentando a susceptibilidade das fibras a posteriores processos de hidrólises.
- ✓ Processo *organosolv*: Uma mistura de ácido e solvente orgânico, geralmente etanol, é utilizada neste processo para o rompimento das ligações internas da lignina e a hemicelulose.

Nos pré-tratamentos biológicos são utilizados biocatalisadores (enzimas) para clivar seletivamente as ligações presentes no material lignocelulósico. Em outros casos são utilizados microrganismos, principalmente, actinomicetos e fungos basidiomicetos, para a degradação total do material (SUN & CHENG, 2002).

O processo mais comum utilizado como pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é a explosão por vapor. Neste processo o material é mantido por um determinado tempo imerso em vapor de agua saturado, numa temperatura que oscila entre 160 e 260°C (0,69 a 4,83 MPa) e, posteriormente, submetido a uma descompressão rápida até alcançar a pressão atmosférica. O procedimento permite que a hemicelulose seja separada da matriz lignocelulósica e solubilizada. Algumas das limitações da explosão por vapor, que podem ser generalizadas para a maioria dos pré-tratamentos, têm sido citadas por diferentes autores (SUN & CHENG, 2002; LAVARACK *et al*., 2002), como: destruição de parte da fração hemicelulósica; rompimento incompleto da matriz lignina-carboidrato e a geração de inibidores. Os inibidores podem ser compostos por minerais contidos no material lignocelulósico ou gerados pela corrosão de equipamentos; o ácido acético, proveniente dos grupos acetil presente no material; Furfural e hidroximetilfurfural (HMF) formados da

degradação de xilose e glicose, respectivamente; produtos derivados da degradação da lignina (compostos fenólicos, ácidos aromáticos e aldeídos) e compostos derivados do eventual uso de catalisadores (ácido vanílico, capróico, caprílico, pelargônico e palmítico).

A explosão de vapor, apesar de ser o pré-tratamento mais comum, não atinge os valores de rendimento em recuperação de xilose, obtidos com a hidrólise ácida, acima de 95% (FOGEL, 2005).

2.4.6.1. Pré-tratamento ácido

Esta técnica é especialmente útil para a separação e solubilização da fração hemicelulósica, quando realizada com ácidos diluídos, permitindo, o aumento da susceptibilidade da celulose a futuros processos de hidrólise sem afetar, consideravelmente, sua estrutura base. Essa característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose em relação a outros glicídeos.

Durante o pré-tratamento ácido, os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose. Com a clivagem dos polímeros são liberadas diversas substâncias, sendo majoritária a presença de xilose, glicose e arabinose. Entre os ácidos utilizados para este tipo de pré-tratamento, encontram-se: H_2SO_4, HCl, HF, CH_3COOH e HNO_3 (AGUILAR *et al.*, 2002; SUN & CHENG, 2002; CUZENS & MILLER, 1997; RODRÍGUEZ-CHONG *et al*., 2004).

Apesar de ser uma reação relativamente complexa, principalmente, pela característica bifásica do processo, AGUILAR (2002) sugere que as etapas do mecanismo de hidrólise incluem:

1. A difusão de prótons através da matriz lignocelulósica;
2. A “protonação” dos oxigênios das ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros do glicídeo constituinte da cadeia;
3. Clivagem das ligações éter;
4. Geração de cátions de carbono como intermediário;
5. Solvatação do cátion de carbono com água;
6. Regeneração do próton com co-geração do monômero, oligômero ou polímero do glicídeo, dependendo da posição da ligação éter;
7. Difusão dos produtos da reação pela fase líquida;
8. Recomeço da reação a partir do segundo passo.

2.4.6.1.1. Inibidores do processo de fermentação

A desvantagem em relação ao processo de pré-tratamento ácido, que resulta no hidrolisado hemicelulósico, reside na formação de inibidores do crescimento celular e da fermentação de xilose. A presença de hexoses como manose, galactose, glicose e/ou de pentoses, pode promover uma diminuição na utilização da xilose, devido à preferência metabólica por esses glicídeos ou a inibição das enzimas responsáveis do metabolismo da pentose. Apesar disso, o consumo de xilose é restabelecido quando esgotados esses glicídeos fermentáveis (DU PREEZ, 1994).

Outros tipos de inibidores podem limitar, e até impedir, o consumo da fonte de carbono e/ou reduzir a cinética de crescimento, prejudicando o desempenho da fermentação. A inibição pode também ser resultado do sinergismo entre as várias substâncias presentes no hidrolisado. Os inibidores mais comuns são:

Ácido acético: gerado a partir dos grupos acetil presentes nas xilanas. Tem-se reportado concentrações de até 16,7 g/L em hidrolisado de bagaço de cana, dependendo das condições em é realizada a hidrólise ácida (PARAJÓ, 1998[b]). O ácido, na forma não dissociada, pode-se difundir ao citoplasma da célula e reduzir o pH intracelular, gerando problemas para a produção de energia e transporte de diversos nutrientes, o que aumenta o requerimento de energia da célula. Mecanismos semelhantes de inibição vêm sendo reportados para o acetaldeído.

Furfural: é um aldeído com natureza aromática formado pela hidrólise de materiais lignocelulósicos que contém pentoses, como o bagaço de cana (GUTIÉRREZ *et al*., 2002). Este tipo de substância reduz o crescimento celular, a formação de ATP e a produção de etanol durante sua assimilação ou degradação (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 1999). Segundo o tipo de microrganismo, pode causar a morte celular, ao interferir no processo de respiração e na fosforilação oxidativa. Em sua forma reduzida, álcool furfurílico, também gera efeitos inibitórios de menor intensidade (PARAJO, 1998[b]).

Hidroxi-metil-furfural (HMF): com um mecanismo de ação similar ao descrito para o furfural, o HMF é assimilado em taxas menores tendo o efeito de aumentar a fase lag de crescimento das células. Esta substância é gerada da degradação de hexoses durante o processo da hidrólise (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 1999).

Substâncias Fenólicas: Estas substâncias são geradas nos processos de degradação da lignina, que ocorrem durante o pré-tratamento ácido. As substâncias fenólicas atuam desestruturando as membranas celulares, o que diminui a capacidade de proteção e produção enzimática das células. Adicionalmente, a inibição do consumo de xilose gerada por alguns compostos fenólicos de baixa massa molecular, tem sido reportada pela literatura. Entre essas substâncias fenólicas obtidas pela degradação da

lignina, encontram-se: ácido p-hidroxibenzóico, ácido m-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido cinâmico, siringaldeído, cinamaldeído, p-hidroxicinamaldeído, álcool coniferilico e álcool 3,5-dimetoxi-4-hidroxinamílico (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 1999. PARAJO, 1998[b]).

Adicionalmente, deve-se ressaltar que o efeito inibitório de algumas das substâncias citadas é potencializado pela presença conjunta de outras, como no caso do ácido acético e do furfural (PALMQVIST *et al*., 1999), podendo ser minimizado com o uso de alta concentração de células no início do processo mediante etapas suscessivas de crescimento (LARSSON *et al*., 1998).

2.4.6.1.2. Processos de Destoxificação

Os métodos para destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, oriundo do pré-tratamento, a ser utilizado como meio de fermentação, variam de acordo com tipo de inibidor presente. Entre os métodos mais conhecidos encontram-se aqueles destinados a mudanças de pH com CaO, $Ca(OH)_2$, H_2SO_4 ou utilização de carvão ativo, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos e até enzimas (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996; POUTANEN *et al*., 1990; HAHN HÄGERDAL *et al*., 1991 e 1998).

Informações adicionais sobre alguns tratamentos investigados para a destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos e seus efeitos de resposta sobre os inibidores, podem ser encontrados nos estudos de SANCHES *et al*. (2005); HAHN-HÄGERDAL *et al*. (1998); BETANCUR & PEREIRA (2010). Entre esses processos, por exemplo, o aumento de pH para 10, seguido de ajuste para pH 6, apresenta-se como um dos tratamentos mais promissores, devido à faixa de inibidores que são retirados e ao custo do tratamento. Nota-se que alguns tratamentos, apesar de se mostrarem eficientes na diminuição de inibidores, podem criar condições que afetam as características do meio e geram uma maior condição de *stress* ao microrganismo utilizado. Tratamentos com variações de pH podem desencadear aumentos excessivos na força iônica do meio. Adicionalmente, alguns tratamentos podem diminuir a concentração de açúcares fermentáveis no hidrolisado.

O desenvolvimento de processos de hidrólises que minimizem a presença de inibidores no hidrolisado, eliminando possíveis etapas de destoxificação, concomitantes a uma alta eficiência na recuperação de açúcares, são de suma importância para reduzir os custos do processo. Uma alternativa para minimizar estes efeitos inibitórios, ocasionado por substâncias indesejadas no hidrolisado, refere-se à aclimatação do microrganismo ao meio, utilizando uma metodologia de cultivos sucessivos em meios, com conteúdos

gradativamente maiores da solução que contem as substâncias inibidoras (BETANCUR & PEREIRA, 2010).

2.4.6.1.3. Pré-tratamento alcalino

Quando comparado com o tratamento ácido, a utilização do pré-tratamento alcalino requer temperaturas e pressões moderadas e consiste na remoção de lignina da biomassa, aumentando a reatividade da fibra. Normalmente, é utilizada a soda ou cal como álcalis, seguido de recuperação dos mesmos, para garantir a economicidade do método (BAUDEL *et al*., 2006). O tratamento consiste em causar um desnovelamento da estrutura, aumentando a área de superfície interna, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade, promovendo a separação das ligações estruturais entre a lignina e os carboidratos (SUN & CHENG, 2002). Como resultado, a porosidade dos materiais lignocelulósicos é intensificada, após a remoção da lignina.

2.4.6.1.4. Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo muito estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias (que levariam à perda de rendimento), ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007). A cristalinidade da celulose, a proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornam este tipo de hidrólise um processo lento e pouco econômico. A estrutura capilar das fibras de celulose e a presença de metais diminuem a eficiência da hidrólise enzimática (ROBERTO *et al,* 2003; CANETTIERE, 2004).

Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo assim os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluente (SEGEL, 1975). No caso da hidrólise enzimática, a especificidade da enzima evita ainda que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (CONTEIRO, 1992).

As enzimas do complexo celulolítico, denominadas de forma geral de celulases, são amplamente utilizadas para o desenvolvimento de diversos estudos e, podem ser produzidas por bactérias e fungos filamentosos, principalmente o *Trichoderma reesei*

(MARTINS, 2005). Há ainda registros na literatura com *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Schizophyllum*.

As celulases são classificadas em três grupos: (i) **Endoglucanases**, que clivam ligações internas da fibra celulósica; (ii) **Exoglucanases**, que atuam progressivamente nas extremidades redutoras e não-redutoras da celulose libertando pequenos oligosacarídeos de celulose; e (iii) **ß-glucosidases**, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (LYND *et al*., 2002). A Figura 2.12 esquematiza a atuação dessas enzimas sobre a celulose.

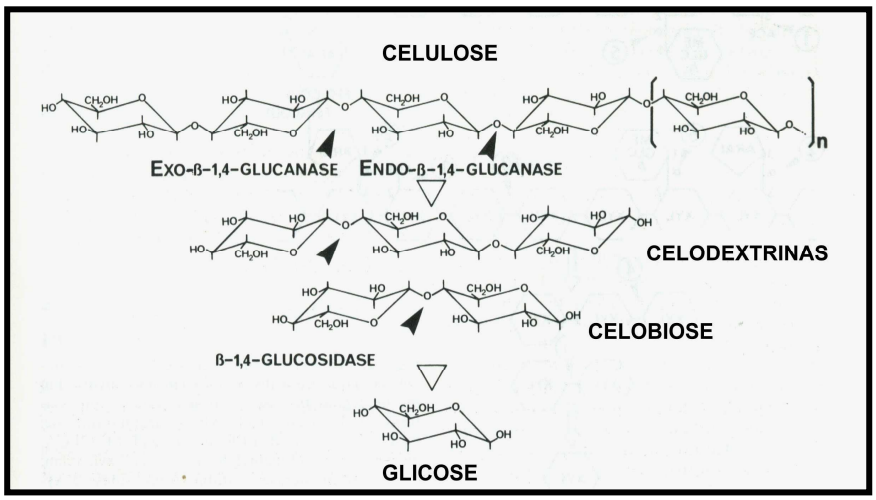

Figura 2.12. Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose.
Fonte: MALBURG *et al.* (1992).

As endoglucanases, ou 1,4-ß-D-glucana-4-glucanohidrolases (E.C.3.2.1.4) são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise. Tais enzimas hidrolisam randomicamente regiões internas de estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando como produtos oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais redutores, sendo um redutor e um não redutor. Durante a reação de hidrólise uma molécula de água é consumida (BEGUIN & AUBERT, 1993; MIYAMOTO, 1997).

O grupo das exoglucanases é constituído majoritariamente pelas enzimas 1,4-ß-D-glucana-glucanohidrolases (E.C.3.2.1.74), também conhecidas como celodextrinases e 1,4-ß-D-glucana-celobiohidrolases (E.C.3.2.1.91), mais comumente conhecidas como celobiohidrolases. Dentre os dois tipos, certamente o mais reportado na literatura é o das celobiohidrolases (CBH).

As celobiohidrolases são distinguidas em dois tipos: As enzimas do tipo I (CBH I) hidrolisam terminais redutores, enquanto que as do tipo II (CBH II) hidrolisam terminais não

redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (AWAFO *et al*., 1996). A estrutura das celobiohidrolases apresenta uma região na forma de “gancho”, cuja função é se ligar à fibra celulósica, facilitando o seu acesso ao sítio catalítico. Adicionalmente, é reportado que as celobiohidrolases (CBH I) possuem dez subsítios ativos no domínio catalítico, cuja função é se ligar fisicamente à celulose e iniciar as reações químicas que hidrolisam as cadeias a celobiose.

O terceiro e último grande grupo das enzimas do complexo celulolítico engloba as enzimas ß-glucosidásicas, ou ß-glicosídeo glucohidrolases (E.C.3.2.1.21). As ß-glucosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) a glicose. Assim como as celobiohidrolases, também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise (AWAFO *et al*., 1996). Quando atuam conjuntamente, as celulases apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia (LYND *et al*., 2002):

1. Sinergia endo-exo. As endoglucanases, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibilizam terminais redutores e não redutores para atuação das CBH I e CBH II, respectivamente;
2. Sinergia exo-exo. As CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação das endoglucanases;
3. Sinergia exo-BG. Como seu produto de hidrólise, as celobiohidrolases liberam celobiose, que são substratos para as ß-glucosidases.

A hidrólise do polímero celulósico pelas celulases envolve basicamente duas etapas: A adsorção das celulases à superfície do substrato celulósico e a hidrólise de celulose em açúcares fermentáveis. Para tal, os seguintes passos acontecem (AWAFO *et al*., 1996):

1. Difusão do complexo celulásico do seio do fluido para a região de localização do substrato celulósico. No caso de substrato insolúvel, a difusão acontece na direção do filme imediatamente adjacente à partícula do substrato;
2. Adsorção do complexo celulásico aos sítios disponíveis no substrato celulósico;
3. Formação de um complexo ativo celulases-substrato;
4. Hidrólise das ligações glicosídicas do polímero celulósico;
5. Difusão dos produtos de hidrólise do sítio ativo celulases-substrato para o seio do fluido;
6. Dessorção do complexo celulásico do substrato hidrolisado.

O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da

biodegradação, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, e taxa de agitação. Conseqüentemente é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (KNAUF & MONIRUZZAMAN, 2004.) A transformação dos materiais lignocelulósicos, para a produção de diversos produtos químicos, vem sendo estudada sob diferentes estratégias de processamento. Devido à presença de diferentes açúcares, muitas vezes se faz necessário o multiprocessamento, ou seja, o emprego de enzimas simultaneamente à ação de microorganismos (PEREIRA JR, 2010). Neste sentido e trazendo estas estratégias para a temática do presente trabalho de pesquisa, 2 concepções tecnológicas se destacam e são descritas a seguir:

2.4.7. Sacarificação e fermentação simultâneas (Simultaneous Saccharification and Fermentation - SSF)

Como o próprio nome diz, a hidrólise enzimática de celulose e a fermentação ocorrem em uma mesma etapa, conforme mostra a Figura 2.13.

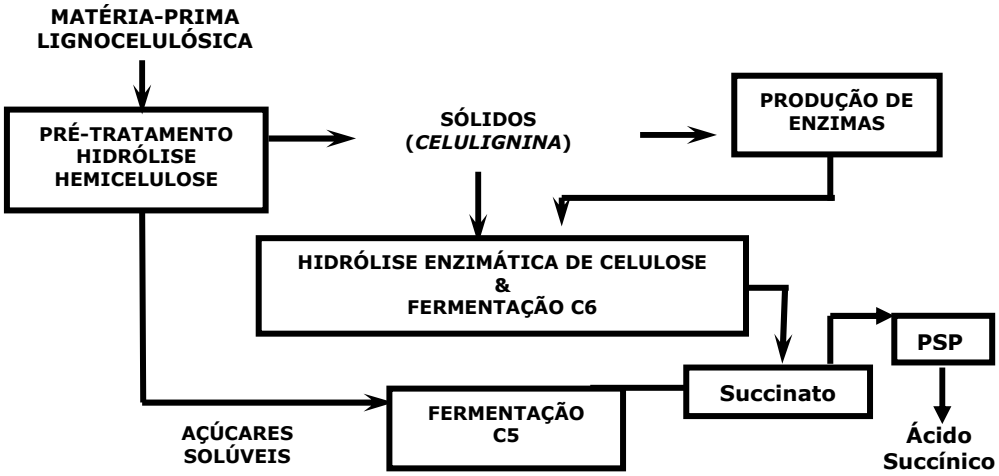

Figura 2.13. Diagrama de blocos do processo SSF.

Fonte: Adaptado de PEREIRA JR (2010). PSP: Processo de Separação e Purificação

A fração hemicelulósica é hidrolisada e fermentada em etapa separada, segundo métodos descritos anteriormente. Ao contrário do que ocorre com a fração hemicelulósica, da qual açúcares podem ser obtidos mediante a sua hidrólise, quando se objetiva realizar a hidrólise enzimática da celulose, esta deverá estar associada a um processo de transformação. Isto decorre do fato de que, ainda que apresentem altas atividades catalíticas, as enzimas do complexo celulolítico são inibidas pelos produtos gerados na hidrólise (glicose e celobiose) (PEREIRA JR, 2010).

Dessa forma, a alternativa encontrada para solucionar os problemas de inibição consiste em deslocar o equilíbrio da reação de hidrólise, mediante a "retirada" da glicose do meio reacional. Para se alcançar esse tento, a estratégia adotada é a de se acoplar ao processo hidrolítico um processo fermentativo que ocorra simultaneamente, à medida que a glicose seja formada. Esse processo é chamado, na literatura, de *"Simultaneous Saccharification and Fermentation"* (SSF). Por um lado, esse processo oferece a vantagem de se minimizar os problemas inibitórios, por outro, as condições operacionais ideais para a hidrólise enzimática não necessariamente serão as mesmas da fermentação (PEREIRA JR, 2010).

2.4.8. Sacarificação com co-fermentação simultâneas (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation-SSCF)

Este processo envolve 3 etapas, das quais a hidrólise da fração hemicelulósica e a produção de celulases ocorrem separadamente, conforme ilustrado na Figura 2.14.

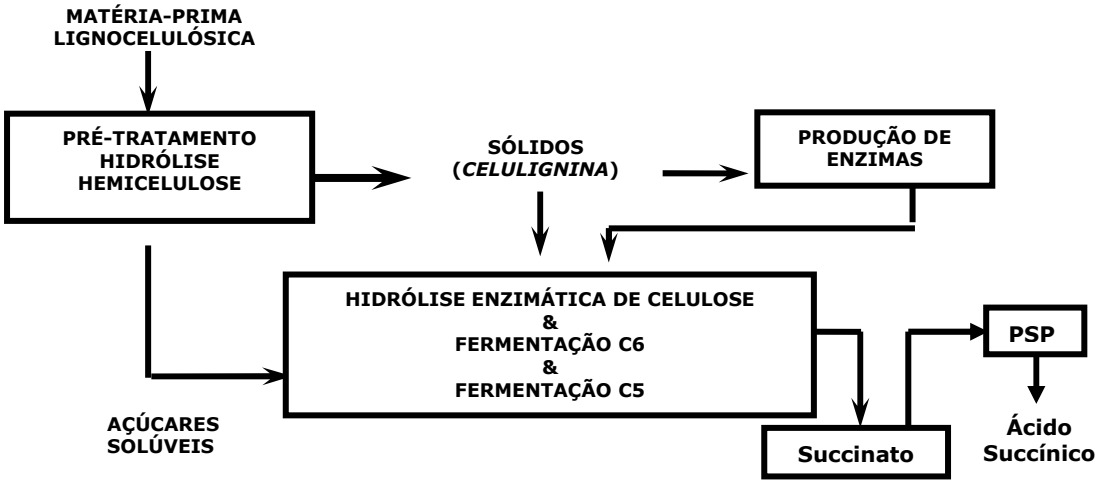

Figura 2.14. Diagrama de blocos do processo SSCF.

Fonte: Adaptado de PEREIRA JR (2010). PSP: Processo de Separação e Purificação

De acordo com esta concepção, a corrente líquida rica em pentoses, obtida após o pré-tratamento permanece no reator, ao qual são adicionadas as celulases e, posteriormente, inoculado com uma linhagem recombinante (capaz de fermentar pentoses e hexoses).

2.4.9. Microrganismos produtores de ácido succínico

O primeiro passo no desenvolvimento de processos microbianos para síntese de ácidos orgânicos é identificar uma ou mais linhagens que produzam os metabólitos desejáveis e em quantidades aceitáveis. A variedade de linhagens que tem sido reportada como produtores em potencial de ácido succínico vêm se tornando uma realidade cada vez mais concreta, por se tratar de um intermediário metabólico comum de muitos microrganismos.

Entre esses microrganismos, encontra-se a espécie *Propionibacterium*, que forma succinato a partir de aminoácidos; as bactérias típicas do trato gastrointestinal como *Esterechia coli, Pectinatus sp, Bacteróides sp*; as bactérias obtidas do rumem como *Ruminococcus flavefaciens, Actinobacillus succinogenes, Bacteróides amylophilus, Prevotella ruminicola, Succinimonas amylolytica, Succinivibrio dextrinisolvens, Wolinella succinogenes e Cytophaga succinicans* (ISAR *et al*., 2007; OKINO *et al.,* 2008 e KARNRA *et al.,* 2005*)*. Além de algumas linhagens de bactérias láticas, a bactéria *Mannheiimia succiniciprocens*, isolada do rumem bovino, também representa a classe produtora de ácido succínico (LEE, *et al.*, 2003 (a) e KIM *et al.*, 2004).

Além dos microrganismos naturalmente ocorrentes, como *M. succiniciproducens* (HUH *et al*., 2006 e LEE *et al*., 2003) e *A. succiniciproducens* (LEE *et al*., 1999a e MEYNIAL *et al., 2008*), já estão disponíveis estudos que envolvem algumas linhagens geneticamente modificadas, como *E.Coli AFP184* ou *E.Coli* KJ122 (LIN *et al*., 2005 *e* OKUDA *et al*., 2007*)*.

Grande parte dos microrganismos produtores de ácido succínico foi isolada do rumem bovino, porque nesse ecossistema o succinato é usado como um importante precursor para o propionato, que é absorvido através da parede do rumem e oxidado fornecendo energia e precursores biossíntéticos para esses animais (ZEIKUS *et al.*, 1999).

Dentre os microrganismos com grande habilidade para produzir ácido succínico, a *Anaerobiospirillum succiniproducen sps; Mannheimia succiniciproducens; Actinobacillus succinogenes* e *a Escherichia coli,* são os três mais indicados, de acordo com concentração final de produto e valores de rendimentos alcançados de acordo com as estratégias adotadas para cada caso. A bactéria *Anaerobiospirillum succiniproducens* é estritamente anaeróbica e gram negativa (ZEIKUS *et al*., 1999), podendo ser considerada uma das mais eficientes, possuindo rendimento e produtividade de 88% e 1,8.g/L.h, respectivamente, quando a concentração inicial de glicose utilizada foi de 40.g/L (LEE *et al*.,2003 (b)).

A bactéria *Mannheimia succiniciproducens*, mesofílica, capnofílica, gram negativa e anaeróbica facultativa, foi isolada recentemente do rumem bovino, podendo utilizar glicose e xilose como fontes de carbono, geralmente de hidrolisados (LEE *et al.,* 2002). Em processos fermentativos, estudos usando hidrolisado de madeira como substrato, resultaram em um fator de rendimento e produtividade igual a 63% e 1,19.g/L.h, respectivamente (KIM *et al.*, 2004).

Entretanto, muitos estudiosos sugerem que a linhagem *Actinobacillus succinogenes*, bactéria obtida do rumem bovino, osmotolerante e anaeróbica facultativa, pode produzir succinato com uma concentração em torno de 100 g/L, assim como acetato, formato, lactato e etanol, dependendo dos níveis de nutrientes adotados para a condução do processo. Uma característica interessante desse microrganismo é ser osmofílica moderada e possuir alta tolerância ao sal succinato, que é crucial para o processo de recuperação do produto (GUETLER *et al.*, 1996; MCKINLAY *et al.,* 2007).

Assim como a *M. succiniciproducens*, a *A. succinogenes* é membro da família dos *Pasteurellaceae*, e um total de 2115 genes foram identificados, dos quais 1768 possuem uma função predita. Desse total, somente 404 genes foram mapeados pelo banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), o que significa que muitos estudos ainda precisam ser realizados para a compreensão bioquímica deste microrganismo, de forma integral (MARKOWITZ *et al.,* 2008). Por serem capnofílicos, precisam incorporar gás carbônico como fonte auxiliar de carbonos, para um crescimento celular adequado e atingir melhores rendimentos em ácido succínico (VAN DER WERF *et al*., 1997).

Por possuir um tempo pequeno para a duplicação celular e estar presente em abundância na natureza, a *E. coli* é a bactéria mais usada como referência, em biologia molecular. Porém, as linhagens selvagens de *E. coli* não produzem ácido succínico como produto principal, sendo necessário desenvolver algumas manipulações genéticas (JANTAMA *et al*., 2008; NEIDHARDT *et al*., 1996 e VEMURI *et al.*, 2002).

Muitos esforços têm sido desenvolvidos na tentativa de obter altas concentrações de ácido succínico, a partir de *E. coli* (CHATTERJEE *et al*., 2001; GOKARN *et al*., 1997 e GOKARN *et al*., 2001; HONG & LEE, 2001; VEMURI *et al*., 2002). Para aumentar a produção, alcançando valores como 58.3 g/L de ácido succínico, várias estratégias já foram executadas, como a incorporação de betaína (aminoácido N-metilado) no meio, criando uma proteção natural para a célula. Valores elevados de concentração, rendimento e de produtividades iguais a 86.5 g/l, 0.83 g/g, e 0.9 g/L.h (JANTAMA *et al*., 2008), respectivamente, já foram registrados na literatura e, mesmo assim ainda está distante do valor ótimo para esta célula. Como subprodutos principais foram detectados a presença de

piruvato, malato e acetato, sinalizando para uma possível deficiência no potencial redox desta linhagem.

Técnicas de modificação genética têm sido empregadas de forma recorrente para a transformação de várias linhagens, com a formação de vetores entre espécies próximas, como *Actinobacillus*, *Haemophilus*, e *Pasteurella* visando elevar os valores de eficiência do processo (BROGAN *et al*., 1996; FREY, 1992).

Raros estudos envolvendo o uso de fungos na produção de ácido succínico foram descritos, até a presente data. No entando, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., e *Penicillium simplicissimum* são fungos filamentosos conhecidos por produzirem ácido succínico sob condições aeróbicas e anaeróbicas (MAGNUSON *et al*., 2004).

Estudos envolvendo *Saccharomyces cerevisiae* vêm apresentando um avanço no processo de produção de ácido succínico, com o objetivo de minimizar os custos de purificação e acidificação, etapas posteriores à fermentação. No entanto, esta linhagem não acumula succinato naturalmente, necessitando de alterações genéticas sobre seu metabolismo, para utilização de diversas fontes de substratos (OTERO, 2009).

CAMARASA & GRIVET (2003) investigaram o uso do vinho de arroz na produção de ácido succínico, em fermentação sob condições anaeróbicas, por *Saccharomyces cerevisiae* após modificações genéticas, elevando os valores de rendimento em produto.

Um efeito combinado entre fungo e bactéria (*Rhizophus* sp. *Enterococcus faecalis*) através de um processo desenvolvido em duas etapas, apresentou um alto valor de produtividade e rendimento (2.2 g/l/h e 0.95 g/g), durante estudos descritos por MOON *et al*. (2003). Na primeira etapa, o fungo produz fumarato, que é transferido para um segundo reator, onde *E. faecalis* sintetiza o ácido succínico.

Os substratos que podem ser utilizados para produção de ácido succínico por esses microrganismos são variados. A principal fonte de carbono geralmente é a glicose, no entanto, outros açúcares como celobiose, frutose, lactose, maltose, manitol, manose, sacarose, D-xilose e salicina podem ser utilizadas por alguns microrganismos específicos, como a *A. succinogenes* (GARRITY *et al*., 2004; GUETTLER, *et al.*, 1999), permitindo a fermentação de muitas fontes de carbono baratas, como melaço de cana, soro e hidrolisado de trigo (DU *et al*, 2008; WAN *et al.,* 2008 e LIU *et al*., 2008). Já *A. succiniciproducens* pode produzir succinato, acetato, formato, etanol e lactato a partir de glicose e lactose (ZEIKUS *et al.*, 1999).

As fontes de nitrogênio mais utilizadas são o extrato de levedura e polipeptona. Porém, resultados consideráveis foram obtidos com milhocina, que constitui uma fonte de nitrogênio mais econômica em comparação com aos anteriores (LEE *et al.*, 2003b). Fatores fisiológicos e nutricionais como concentração inicial de açúcar, fontes de

nitrogênio, tamanho do inóculo, concentração dos íons carbonatos, pH e temperatura do meio de crescimento são reportados como os fatores mais críticos que afetam tanto o crescimento celular como a produção de ácido succínico (AGARWAL, *et al.,* 2007; LEE *et al.,* 1999 a, b).

2.4.9.1. Metabolismo na produção de ácido succínico

Toda bactéria produtora de ácido succínico, durante a fermentação, forma uma mistura de ácidos, produzindo quantidades variadas do produto de interesse e de outros sub-produtos (MCKINLAY *et al*., 2007). A fisiologia das bactérias que possuem habilidade para produzir ácido succínico varia de forma significativa. DATTA *et al*. (1992), reportam que a bactéria *A. succiniciproducens* apresenta mudanças morfológicas durante seu crescimento, afetando o rendimento de produção de ácido succínico, dependendo da concentração inicial de glicose (NGHIEM *et al.*, 1999; DATTA & GLASSNER, 1992)

A fermentação para obtenção de ácido succínico com *E. coli* pode ser através de processo anaeróbico ou de fase dupla, que consiste no crescimento aeróbio seguido por uma fase de produção anaeróbica. Na fase anaeróbica o fosfoenolpiruvato (PEP) e o piruvato são convertidos até formato, lactato e etanol, conforme mostra a Figura 2.15 (VEMURI e*t al.*, 2002). As enzimas PEP carboxiquinase e PEP carboxilase atuam na carboxilação do PEP para produzir oxaloacetato (MILARD *et al.*, 1996). Já as bactérias *A. succinogenes e A. succiniciproducens* utilizam exclusivamente a via PEP carboxiquinase, onde a *A. succinogenes* utiliza quatro enzimas-chaves (PEP carboxiquinase, malato desidrogenase, fumarase e fumarato desidrogenase). A via PEP carboxiquinase é regulada pelo nível de CO_2. Nas bactérias que utilizam esta via (*A. succiniciproducens e A. succinogenes*) a PEP carboxiquinase atua catabolicamente para fixar CO_2, juntamente com ADP, e sintetizar oxaloacetato e ATP a partir do PEP. A concentração de CO_2 regula os níveis das principais enzimas da via PEP carboxiquinase, atuando como um aceptor de elétrons e alterando o fluxo do PEP, metabolizando piruvato e lactato/etanol em baixos níveis de CO_2, produzindo succinato em altos níveis de CO_2, conforme mostra a Figura 2.16 (KIM *et al*., 2004; GUETLER *et al.*, 1996).

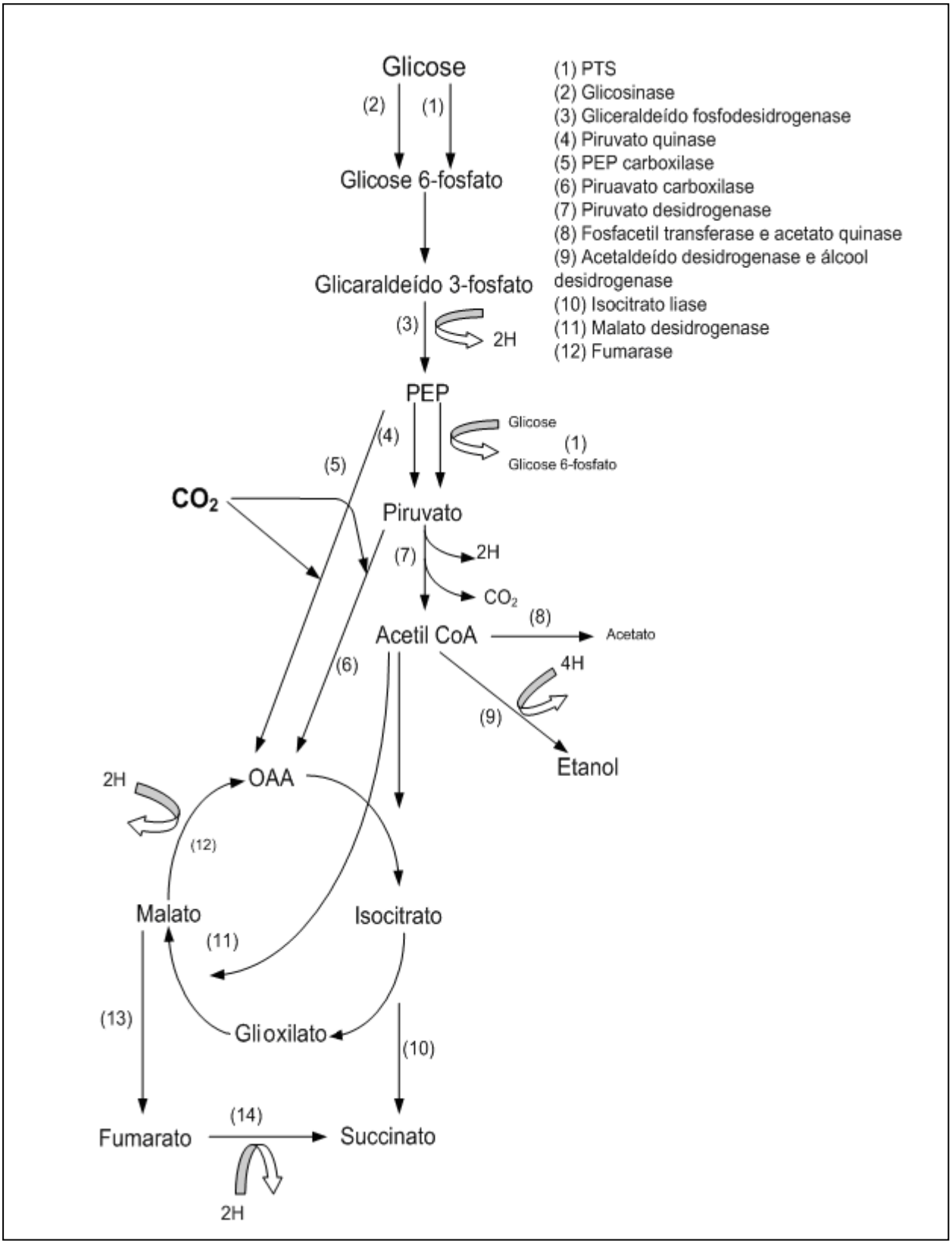

Figura 2.15. Via bioquímica para síntese de succinato, por *E. coli, em presença de* glicose como fonte de carbono (VEMURI *et al.*, 2002)

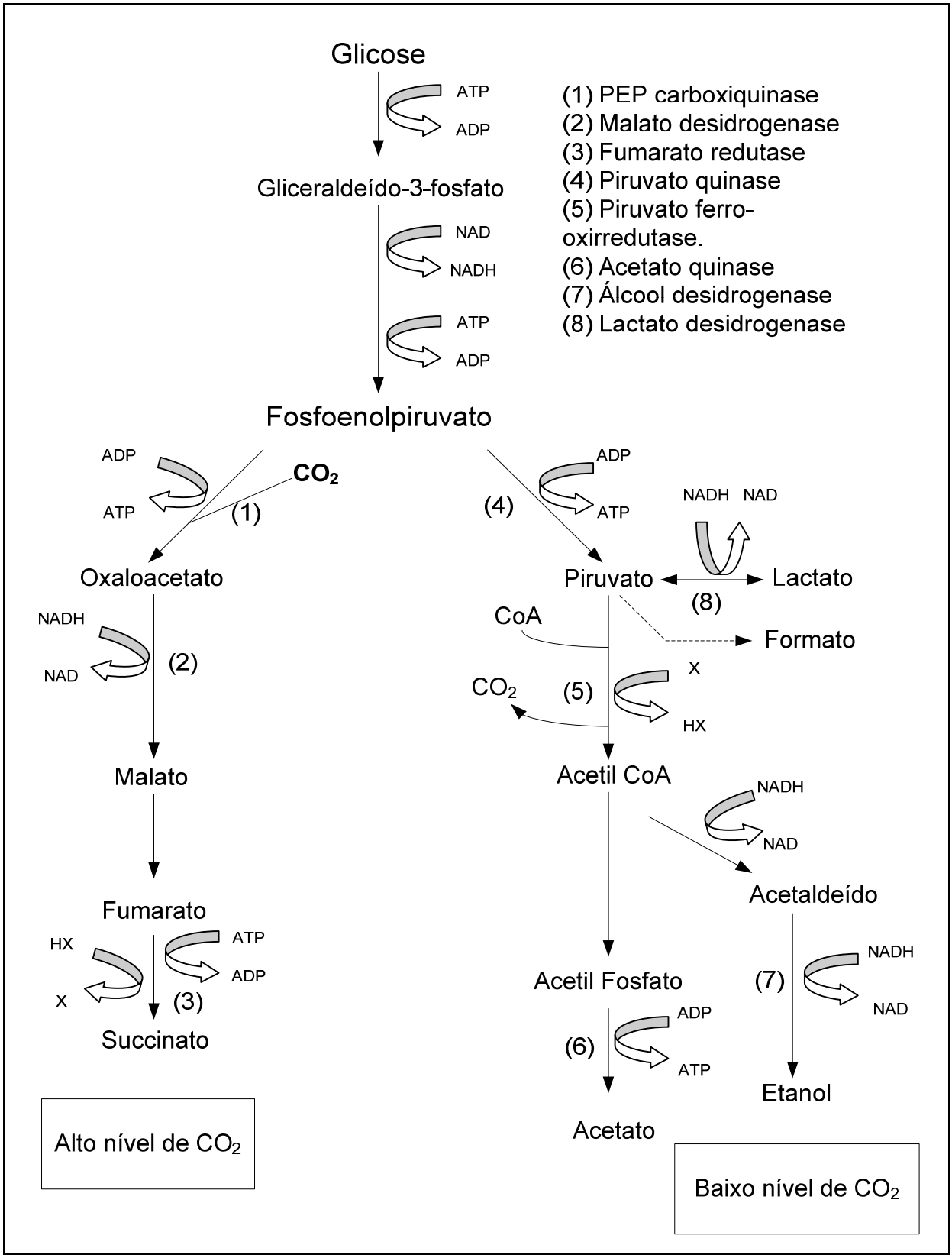

Figura 2.16. Metabolismo de *A. succiniciproducens* e *A. succinogenes*. (ZEIKUS *et al.*, 1999).

2.5. Processos de recuperação e purificação de ácidos orgânicos

O impacto econômico dos produtos provenientes da fermentação ainda é limitado, em grande parte devido à dificuldade de recuperação do produto. Para que os ácidos provenientes da fermentação sejam utilizados na indústria, melhoras substanciais nas tecnologias de separação são necessárias. Alguns processos industriais requerem o ácido succínico livre, dessa forma torna-se necessário remover todas as impurezas geradas na produção (células, proteínas, sais e subprodutos).

Existe na literatura uma série de “rotas” para o processo de separação e purificação de ácidos orgânicos, sendo necessária uma avaliação minuciosa, mediante a análise de diversos fatores, como custo-benefício e níveis de toxidez, durante a escolha do processo que melhor se adequaria na etapa de “dowstream”, respeitando as condições do processo. O método tradicional de separação de ácidos orgânicos obtidos por fermentação é a precipitação com hidróxido de cálcio, a qual apresenta um grande consumo de reagente e gera uma significativa quantidade de resíduo sólido, respondendo por cerca de 60-70% do custo do produto final (BANIEL & EYAL, 1995).

Portanto, a técnica alternativa mais estudada é a extração líquido-líquido (ELL) reativa, onde é utilizada normalmente uma amina como extrato (HESTEKIN *et al*., 2002). O sucesso de um processo de extração líquido-líquido depende muito da escolha do extratante mais conveniente, como por exemplo, alguns organofosforados, aminas alifáticas, solventes compostos e solventes simples com a adição de sais. (LINTOMEN, 1999). Os dados apresentados e avaliados no trabalho de LINTOMEN (1999) demonstram a utilização de extratantes simples, como alcoóis, com a adição de sais, os quais abrem novas possibilidades na recuperação de ácidos orgânicos provenientes de diferentes soluções, incluindo caldos de fermentação, efluentes líquidos, etc.

Ainda que a extração, líquido-líquido, seja uma técnica de eficácia comprovada para a separação de metais, com inúmeras aplicações industriais, os processos baseados nessa técnica normalmente consomem grandes quantidades de reagentes. Além disto no caso específico da recuperação de compostos oriundos de fermentação, a toxidez dos componentes da fase orgânica (diluente e extratante) para as bactérias constitui um problema crítico (PAYNE & SMITH, 1983).

Há ainda, os processos de separação por membranas (Figura 2.17), que agem como uma barreira seletiva para separação, total ou parcial de espécies químicas presentes em uma mistura, líquida ou gasosa, da qual se pretende obter um produto isento ou deficiente em determinados componentes e outro concentrado em tais componentes, utilizando para este fim uma força motriz ou diferença de potencial elétrico (eletrodiálise) apropriada (HABERT *et al.*, 1997)

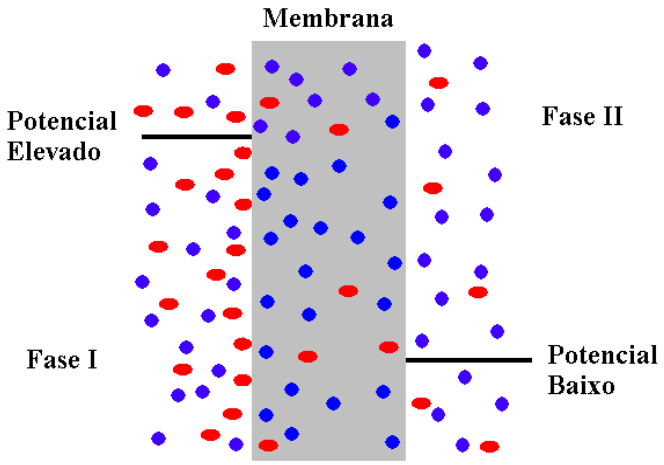

Figura 2.17. Transporte de diferentes espécies através de uma membrana (HABERT *et al.*, 1997).

Em função da natureza da força motriz os processos são divididos em três categorias: Processos cuja força motriz é o gradiente de pressão (Microfiltração-MF, Ultrafiltração-UF, Nanofiltração-NF e Osmose Inversa - OI); Processos cuja força motriz é o gradiente de concentração (Pervaporação, Permeação de gases, Diálise); Processos cuja força motriz é o gradiente de potencial elétrico (Eletrodiálise) (MULDER, 1991).

2.5.1. Processos de separação e recuperação de ácido succínico

O processo de separação permanece como um dos assuntos mais discutidos, quando a produção microbiana de ácido succínico é avaliada. Para uma efetiva aplicação industrial, conforme mostra a Tabela 2.8, a escolha do processo depende da escalabilidade (limites físicos à questão do desempenho), robustez, rendimento de separação global e principalmente dos custos envolvidos (KURZROCK *et al.*, 2010 e SONG & LEE, 2007).

Tabela 2.9. Parâmetros para aplicação de processos de separação

Métodos	Escalabilidade	Robustez	Rendimento (separação)	Custo
Ultrafiltração	−	+	+	−
Precipitação	+	+	−	−
Eletrodiálise	−	−	+/−	−
Extração líquido-líquido	+	+	+	−

Entre os ácidos orgânicos, o ácido succínico é um dos mais facilmente extraídos para a fase orgânica, devido a sua baixa polaridade, pois é dicarboxílico, enquanto outros ácidos são, por exemplo, monocarboxílicos. Quanto menor a polaridade, menores são as interações com a água e mais "livre" se encontra o ácido para ser extraído pela fase orgânica. Ácidos, em geral, mais polares apresentam uma forte ligação com a água, tornando-se então menos extraíveis pela fase orgânica. As interações com a água são do tipo ligações de hidrogênio que ocorrem entre grupos carboxilas e hidroxilas do ácido com as moléculas de água (LINTOMEN *et al*., 1990).

Para reduzir o efeito inibitório sobre o crescimento celular e incrementar os parâmetros produtivos, vários sistemas de extração de ácidos, integrados ao processo fermentativo, têm sido propostos (HATANAKA *et al*., 1988; ZHONG *et al*., 1993; QUESADA-CHANTO *et al.*, 1994; NAKANO *et al*., 1995; OZADALI *et al.*, 1996; DA COSTA *et al.*, 1999; GU *et al.*, 1998; WÓDZKI *et al.*, 2000; MIYANO *et al*., 2000). Segundo Kurzrock & Botz (2009), novas tecnologias incluem a participação simultânea de processos de microfiltração, eletrodiálise, precipitação, acidificação, destilação e cristalização (Figura 2.18) ou acidificação, troca iônica e cristalização, processos menos poluentes e de mais altos rendimentos na recuperação do produto.

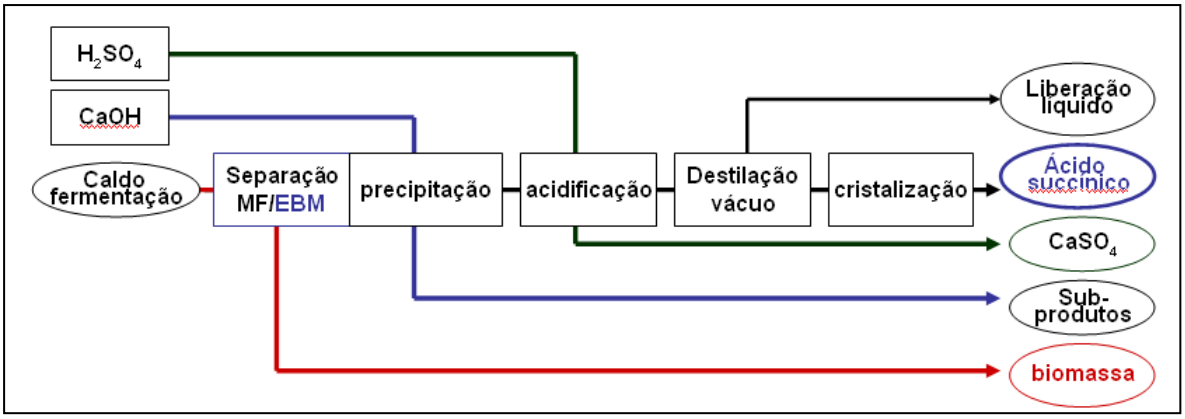

Figura 2.18. Processo de separação e purificação de ácido succínico. MF/EBM: integração entre Microfiltração e Membranas bipolares de eletrodiálise.

Porém, este processo é feito com a adição de Ca $(OH)_2$ no caldo de fermentação, que além de apresentar custo elevado é hostil ao meio ambiente (INCI & USLU, 2005). O sólido é filtrado e tratado com H_2SO_4, para a precipitação preferencial do $CaSO_4$ (gesso). O ácido orgânico livre também pode ser purificado (carbono ativado, troca iônica, etc.) e concentrado por evaporação.

DA COSTA *et al.* (1999) empregaram um módulo de eletrodiálise desenvolvido pela GKSS – *Forschungezentrum Geesthacht GmbH, Institut für Chemie, de Geesthacht*, Alemanha, integrado ao processo fermentativo, e observaram um incremento na produtividade em ácido orgânico e de produtividade em células. A técnica da eletrodiálise (ED), Figura 2.19, é um processo de separação de íons pelo efeito de um campo elétrico utilizando membranas íons-seletivas, as quais são permeáveis a determinados íons e impermeáveis a outros. São capazes de separar cátions ou ânions presentes em uma solução aquosa.

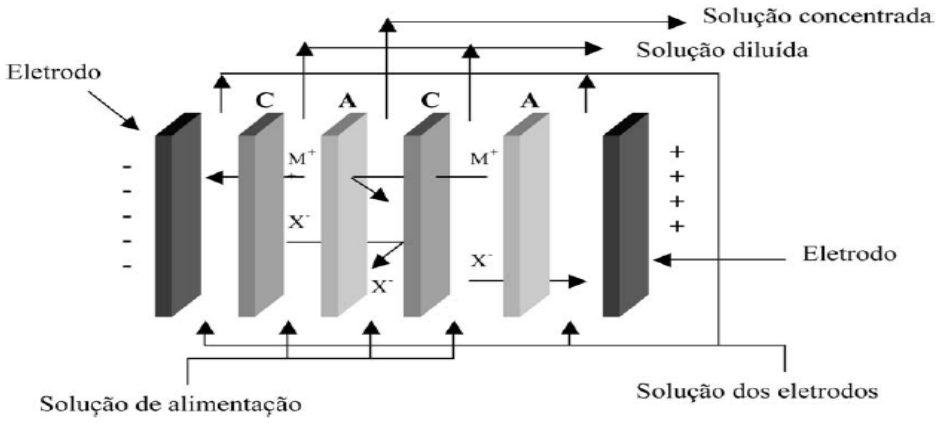

Figura 2.19. Esquema de funcionamento de membranas bipolares de eletrodiálise, PC*Cell*

O processo de separação e purificação do ácido succínico, durante a etapa de *Downstream,* não fazem parte do foco de estudo no presente trabalho (Figura 2.20). Maiores detalhes a respeito podem ser encontrados nos estudos de Davison *et al*. 2004; HUH *et al*. (2006), LIN *et al*. (2009) e KURZROCK & WEUSTER (2010).

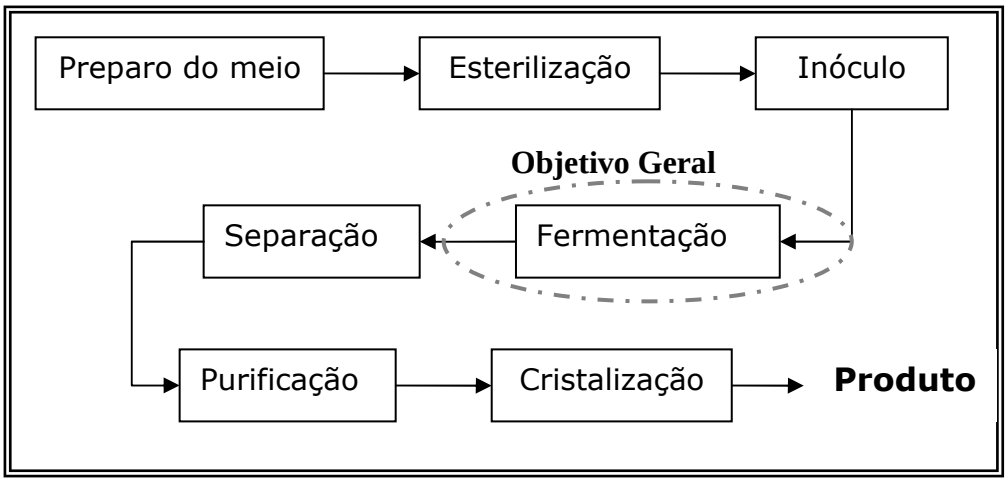

Figura 2.20. Diagrama de blocos da produção de ácidos orgânicos por fermentação.

Pode-se concluir que, apesar das vantagens que os processos biotecnológicos apresentam, um dos principais problemas deste tipo de processo está relacionado à alta diluição do produto em solução aquosa, aumentando o custo do processo de purificação e separação, tornando-o o fator economicamente limitante do processo.

Neste contexto, a principal tarefa da bioengenharia em cooperação com a biologia molecular é superar este problema, não através da construção de novos biorreatores, mas através do desenvolvimento de processos economicamente sustentáveis (GERBSH & BUCHHOLZ, 1995). Estudos visando à otimização do processo e a redução de custos, vêm sendo cada vez mais recorrentes entre a comunidade científica. Por exemplo, vários modelos cinéticos não estruturados foram propostos para descrever o processo fermentativo para síntese de outros ácidos acético, lático e glutâmico (AKERBERG *et al*., 1998; KHAN *et al*., 2005).

Porém, ainda não há registros de estudos visando desenvolver modelos que representem a síntese de ácido succínico a partir da fermentação da cana-de açúcar, mediante a conversão direta de glicose em produto com formação de intermediários.

2.6. Modelagem e Simulação de Processos

Uma importante aplicação dos modelos matemáticos é para testar ou validar hipóteses. Pela análise de discrepância entre os modelos e pelo sistema que eles representam é possível estendê-los para outras aplicações ou desenvolver um novo modelo, seguido de validação através do uso de dados do sistema, obtidos por planejamento de experimentos ou a partir de medidas prévias do comportamento do sistema (THAYSEN, 2005).

Segundo Secchi (1995) para o desenvolvimento da modelagem de um processo deve-se considerar:

- Descrição do processo e definição do problema: talvez a parte mais importante para análise de um processo, seja o conhecimento dos fenômenos que o envolvem e o que se deseja conhecer de suas causas e efeitos, ainda que não seja possível estabelecer regras para a definição do problema;

- Teoria e aplicação das leis fundamentais: definição da teoria que governa os seus fenômenos. Esta teoria está geralmente disponível em uma variedade de fontes publicadas ou não. Para casos isolados, onde não existe teoria disponível, é interessante postular uma ou várias e posteriormente testar sua validade através da comparação da solução do modelo matemático com resultados experimentais;

- Equacionamento: escrever a teoria em simbologia matemática; Considerações do modelo;

- Consistência: verificar se o número de equações é igual ao número de variáveis a determinar (graus de liberdade igual a zero), isto é muito importante em sistemas complexos e grandes;

- Solução desejada: uma consideração das soluções requeridas do modelo é um processo necessário antes de suas obtenções propriamente ditas;

- Matemática e computação: a natureza das equações do modelo é que determina o método para a obtenção da solução a ser selecionada, seja ele analítico, numérico ou por inspeção;

- Solução e validação: verificar as soluções obtidas do modelo matemático, através de comparações com dados experimentais ou julgamentos de engenharia.

Segundo SCHMIDELL & BONOMI (2001), para a modelagem de um processo microbiano, deve-se analisar, também, os principais fenômenos que caracterizam as interações: população microbiana – meio ambiente – tipo de processo fermentativo, de acordo com os fatores: influência da "história" da população microbiana no processo (fase lag e de adaptação, mutações, perda de viabilidade entre outros); influência da composição do meio de cultivo nas velocidades de crescimento ou de produção da população microbiana; consumo de substrato para crescimento e também, na maioria dos casos, para manutenção da viabilidade celular; geração de produtos associados ou não ao crescimento celular; transferência de substrato do meio para o interior das células e de produtos da célula para o meio; velocidade de respiração em processos aeróbios; tipo de processo; influência das variáveis fisico-químicas no processo; influência das variações na síntese dos componentes celulares; homogeneidade ou heterogeneidade do processo; influência das condições operacionais na morfologia da população microbiana.

2.6.1. Modelagem de Processos Biotecnológicos

Para se realizar o *design* de um processo biotecnológico é necessário saber a taxa com que ocorrem mudanças nas concentrações, por exemplo, de células, substrato e produto. Os dados da cinética microbiana de crescimento, distribuição da população de células, síntese de produto e consumo de substrato são de grande importância na produção, controle e otimização do processo (ASENJO & MERCHUK, 1994). É importante saber também como o ambiente reacional afeta a cinética. Em alguns casos o uso de

modelos simplificados é suficiente para o design do sistema. Contudo, em outros pode ser vantajoso o uso de modelos mais sofisticados (LUNELLI & MACIEL, 2007)..

Dependendo do uso, da aplicação e da complexidade da situação física, os modelos que representam o crescimento celular podem variar bastante. Esta variação engloba os modelos bem simples e os mais sofisticados. A Figura 2.21 mostra alguns parâmetros, fenômenos e interações que influenciam o comportamento cinético da população de células.

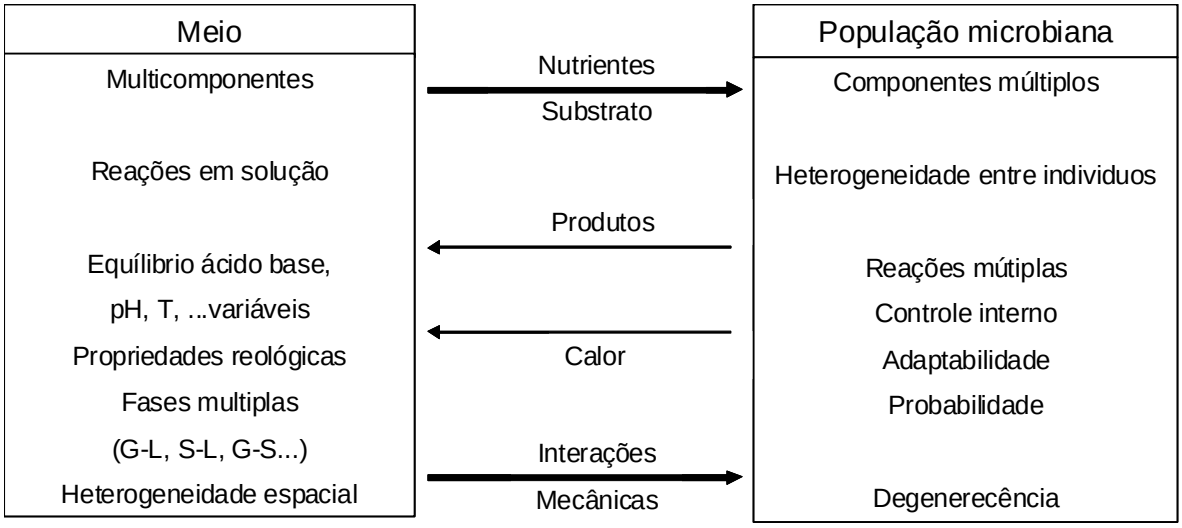

Figura 2.21. Resumo de alguns parâmetros, fenômenos e interações que determinam a cinética da população de células (BAYLEY & OLLIS, 1986).

A utilização de modelos cinéticos simplificados é necessária para tornar prática uma representação matemática da cinética. É quase impossível tentar formular um modelo que inclua todos os detalhes mostrados na Figura 2.21. Assim, algumas simplificações são realizadas. Uma das mais utilizadas é a que considera um único substrato limitante sendo o restante em excesso de modo que seja considerada somente a concentração deste substrato. Se necessário pode-se incluir outro componente do meio como um inibidor. Também o uso de controles externos no biorreator pode regular e manter constantes algumas variáveis do meio como pH, temperatura e concentração de O_2 dissolvido (BAYLEY e OLLIS, 1986). Por outro lado, pode se tornar necessária, em alguns casos, a inclusão de variáveis múltiplas no modelo de modo a se obter uma melhor representatividade do comportamento cinético(LUNELLI & MACIEL, 2007)..

ROELS & KOSSEN (1978) apresentam uma perspectiva sobre os vários tipos de modelos usados em processos microbianos, os quais estão relacionados na Tabela 2.12. Pode-se perceber a variedade de modelos que podem ser usados para a representação matemática de processos fermentativos (biotecnológicos).

Tabela 2.10. Tipos de modelos usados em processos microbianos

MODELOS	
Determinístico	Estocástico
Estruturado	Não estruturado
Distribuído	Segregado
Descritivo	Preditivo
Caixa preta	Caixa cinzenta
Contínuo	Discreto
Parâmetros concentrados	Parâmetros distribuídos

Em relação aos modelos estruturados e não estruturados FREDRICKSON (1970 *apud* BAILEY, 1998), introduziu uma classificação para representar matematicamente a população celular, utilizando estes dois termos (estruturado e não estruturado), além da introdução dos termos, segregado e não segregado. Esta classificação proposta por Fredrickson pode ser visualizada na Figura 2.22, que mostra a introdução do termo segregado para indicar de forma explícita a presença de indivíduos heterogêneos em uma população celular, e o termo estruturado para designar a formulação, onde o material celular é composto de múltiplos componentes químicos.

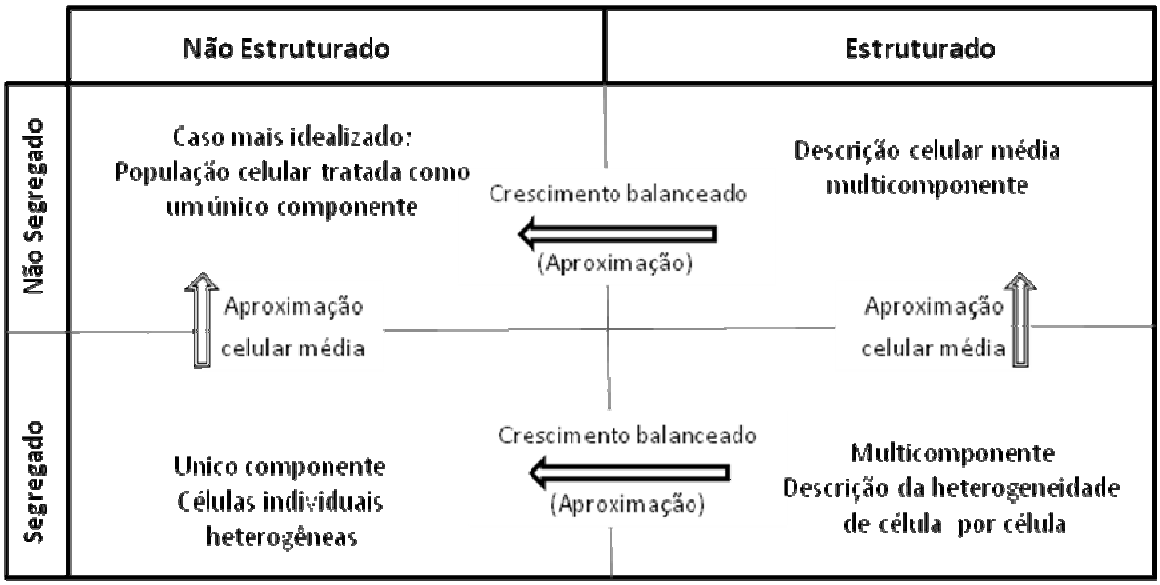

Figura 2.22. Classificação dos modelos matemáticos para representação da cinética da população celular (FREDRICKSON, 1970 *apud* BAILEY, 1998).

Em estudos tradicionais de processos fermentativos, metabólitos extracelulares (como substrato e produto) têm sido quantificados, bem como a concentração de biomassa. Os modelos que podem ser formulados baseados nestes tipos de medidas são altamente não estruturados e sua aplicação para a interpretação da fisiologia celular e predição do comportamento celular de diferentes condições de cultivo é completamente limitada. Os modelos não estruturados constituem uma classe de modelos sem

preocupação da descrição da estrutura da população a ser modelada. No caso de uma população microbiana, a composição ou qualidade da biomassa não é levada em consideração. Estes modelos incluem as observações mais fundamentais dos processos de crescimento microbiano: 1) a taxa de produção de massa celular é proporcional à concentração de biomassa; 2) existe um limite de saturação para a taxa de crescimento , para cada substrato; 3) as células necessitam de substrato e podem sintetizar produtos, mesmo quando cessam o crescimento (MONTESINOS *et al*., 1995). Este tipo de modelo não reconhece nenhuma estrutura interna da célula, também não difere entre as formas celulares, as quais são evidentes em culturas celulares, animal e vegetal.

Modelos não estruturados são geralmente mais tratáveis do ponto de vista matemático e mais facilmente verificáveis experimentalmente. De certa forma, estes modelos são mais preferíveis onde sua precisão e descrição do sistema sejam adequadas a uma determinada aplicação. A equação de Monod, para o crescimento de microrganismo limitado pelo substrato, é um exemplo de um modelo não estruturado bem sucedido. Em geral, modelos não estruturados podem ser considerados como uma boa precisão em dois casos: quando a composição dos organismos não é relevante ao aspecto do sistema, ou quando ela é independente do tempo, isto é, em crescimento balanceado (FREDRICKSON, 1970 *apud* BAILEY, 1998). Quando a composição celular e/ou a morfologia da cultura celular são importantes e as variáveis fortemente dependentes do tempo, a solução é o uso de modelos estruturados que incluem os principais aspectos da estrutura e da fisiologia microbiana para a descrição matemática do metabolismo dos microrganismos (NIELSEN & VILLADSEN, 1992).

Seguindo os avanços das técnicas analíticas, medidas das concentrações de metabólitos intracelulares e as atividades de enzimas intracelulares têm possibilitado a formulação de modelos mais estruturados, que tem aumentado a possibilidade para interpretação e predição da fisiologia celular (GOMBERT & NIELSEN, 2000).

De acordo com Harder & Roels (1982) a importância de se construir modelos estruturados, reside no fato de que estes se tornam mais significantes, exatamente onde os modelos não estruturados apresentam falhas, como por exemplo, Monod. Isto se aplica, particularmente, para culturas em batelada, batelada alimentada ou contínua.

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos, o mais importante é que o modelo estruturado seja tão simples quanto possível. Os modelos estruturados contêm uma grande quantidade de parâmetros que tornam complicada sua manipulação com vistas à aplicação na biotecnologia (FREDRICKSON, 1976).

2.6.2. Modelos cinéticos de crescimento microbiano

O modelo cinético de crescimento microbiano mais utilizado é apresentado na Equação 2.3, denominado Monod. É muito semelhante ao modelo de cinética enzimática Michaelis-Menten. Este modelo é válido se somente um substrato é limitante estando os outros em excesso.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S} \qquad \text{(Equação 2.1)}$$

onde, $$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} \qquad \text{(Equação 2.2)}$$

SCHMIDELL *et al*. (2001) mostram um resumo de modelos não estruturados com crescimento balanceado que são apresentados na Tabela 2.11. Estes modelos não estruturados não devem ser utilizados quando a composição celular mudar significativamente no processo, afetando assim a cinética. Para estes casos devem ser utilizados modelos estruturados disponíveis em literatura especializada.

BAILEY & OLIS (1986) descreveram alguns estudos de casos onde o modelo de Monod sofreu algumas modificações, devido à necessidade de se ampliar ou incluir modificações nos termos cinéticos, para levar em conta o metabolismo endógeno, manutenção celular, ou sugerir taxas específicas de crescimento que levam em conta diferentes dependências da cinética de crescimento, como os modelos de Tessier, Moser e Contois. As duas primeiras equações resultam equações algébricas com soluções mais complicadas que a forma de Monod.

A equação de Contois, por exemplo, contém uma constante aparente proporcional à concentração de biomassa X. Outros modelos para a taxa específica de crescimento foram propostos de acordo com casos particulares que forneceram bom ajuste a dados experimentais. Segundo o modelo proposto por Andrews, a taxa específica de crescimento pode ser inibida pelos constituintes do meio tal como substrato e produto.

Existem também os modelos de formação de produto. A formação de produto pode ser classificada em diferentes grupos (ASENJO & MERCHUK, 1994):

a. Produto principal é resultado direto do metabolismo energético.

b. Produto principal é resultado indireto do metabolismo energético.

c. Produto principal é um metabólico secundário.

d. Produto principal é uma proteína intra ou extracelular.

Tabela 2.11. Modelos cinéticos não estruturados descritos para a representação de diversos fenômenos identificados em processo fermentativos.

Referência	Modelo cinético
Crescimento com um único substrato limitante	
MONOD	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_S + s}$
MOISER	$\mu_x = \frac{\mu_m s^n}{K_S + s^n}$
CONTOIS	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_S x + s}$
SINCLAIR; KRISTIANSEN	$\mu_d = -K_d$
Crescimento com um único substrato limitante e inibidor	
ANDREWS	$\mu_x = \frac{\mu_a s}{K_S + s + \frac{S}{K^2_i}}$
WU	$\mu_x = \frac{\mu_a}{1 + \frac{K_S}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n}$
DUNNET	$\mu_x = \frac{\mu_{m1} s_1}{K_{S1} + s_1} + \frac{\mu_{m2} s_2}{K_{S2} + s_2 + \frac{s^2_1}{K_i}}$
MEGEE	$\mu_x = \frac{\mu_{m1} s_1 s_2}{(K_{S1} + s_1) + (K_{S2} + s_2)}$
TSAO; HANSON	$\mu_x = \left(\mu_0 + \frac{\mu_1 s_1}{K_{S1} + s_1} + \frac{\mu_2 s_2}{K_{S2} + s_2}\right) \cdot \left(\frac{s_3}{K_{S3} + s_3}\right)$
PIRT	$\mu_S = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x + m_s$
ZENG; DECKWER	$\mu_S = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x + m_s + \Delta\mu_S^{\max} \frac{S - S^*}{K^* + S - S^*}$

Onde:
μ_X: taxa específica de crescimento.
μ_d: taxa específica de morte celular.
μ_s: taxa específica de consumo de substrato (pode ser representado por q_s)
S, S_1, S_2 e S_3: concentrações de substratos limitantes.
S^*:concentração de S para manter μ_X.
X:concentração celular.
Yx/s:fator de conversão de substrato em células.
ms: coeficiente de manutenção energética. Os demais são parâmetros cinéticos.

Metabólito primário: é produzido durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo. Um exemplo típico deste tipo de metabólito é a produção de álcool. O etanol é um produto do metabolismo anaeróbico de leveduras e algumas bactérias, sendo formado como parte do metabolismo energético. Uma vez que o crescimento só pode ocorrer se houver produção de energia, a produção de etanol está associada ao crescimento. Outros exemplos englobam a produção de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos e enzimas.

Metabólito secundário: produzido durante a fase estacionária de crescimento ou idiofase, ou seja, com produção "não associada" ao crescimento celular. Constituem o grupo mais comum e importante dos metabólitos de interesse industrial. Como exemplo clássico, podemos citar a produção de antibióticos.

Segundo BAYLEY & OLLIS (1986), Gaden simplificou os grupos acima e classificou a relação entre produção e crescimento celular em:

Tipo 1. Modelo de produção associada ao crescimento: o substrato é convertido a um produto único, que se forma concomitantemente com o crescimento celular. Logo, a formação de produto é proporcional ao crescimento. A fermentação alcoólica é um exemplo desta classe.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} \qquad \text{(Equação 2.3)}$$

Tipo 2. Modelo de produção parcialmente associada ao crescimento: a taxa de formação de produto depende tanto da taxa de crescimento como da concentração celular. Portanto, esta expressão, envolvendo dois termos cinéticos, freqüentemente chamados de cinética Leudeking-Piret, bastante útil no ajuste de dados para a formação de produtos de diferentes fermentações, como por exemplo, na produção de ácido acético por *Lactobacillus delbrueckii.*

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \qquad \text{(Equação 2.4)}$$

Tipo 3. Modelo de produção não associada ao crescimento: a taxa de formação de produto só é dependente da concentração celular. Como exemplo, a fermentação da penicilina exibe tal comportamento.

$$\frac{dP}{dt} = \beta X \qquad \text{(Equação 2.5)}$$

A Figura 2.23 apresenta o comportamento de cada modelo descrito. Outros modelos, que associam a formação de produto ao crescimento celular, podem ser visto na Tabela 2.12.

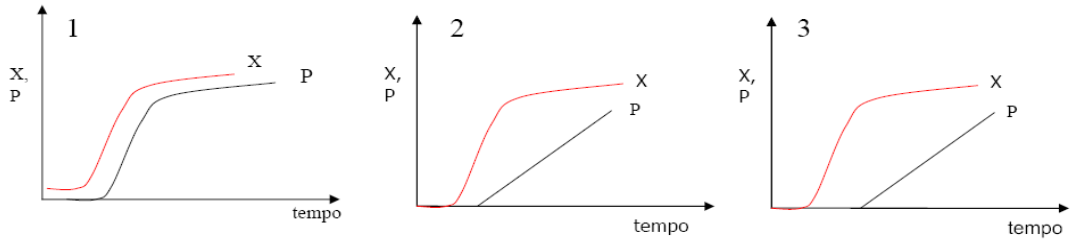

Figura 2.23. Padrões cinéticos de crescimento celular e formação de produtos.

Tabela 2.12. Modelos com a formação de produto metabólico inibitório

Referência	Modelo cinético
AIBA; SHODA	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_S + s} + \frac{K_p}{K_p + P}$ $\mu_p = \frac{\mu'_m s}{K'_S + s} + \frac{K'_p}{K'_p + P}$
AIBA	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_S + s} e^{-K_p P}$ $\mu_p = \frac{\mu'_m s}{K'_S + s} e^{-K'_p P}$
GHOSE; TYAGI	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_S + s} + \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)$ $\mu_p = \frac{\mu'_m s}{K'_S + s} + \left(1 - \frac{P}{P'_m}\right)$
LEVENSPEIL	$\mu = \mu_{\max}\left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)\left(\frac{S}{K_S + S}\right)$
LEE	$\mu = \mu_{\max}\left(\frac{S}{K_S + S}\right)\left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)\left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$
TOSETTO	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{\left(K_S + S + \frac{S^2}{K}\right)}\left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$
Onde: μ_X: taxa específica de crescimento. μ_p: taxa específica de produção (também pode ser representado por q_p). S: concentração de substrato limitante. P: concentração de produto. Os demais são parâmetros cinéticos.	

Fonte: Adaptado de SCHMIDELL *et al.* (2001)

2.6.3. Métodos matemáticos utilizados para a resolução dos modelos

2.6.3.1. Método dos resíduos ponderados

Este método pode ser aplicado para resolver equações integrais diferenciais. Nesse método, a função de densidade de população é aproximada por uma combinação linear de funções de base. Os pesos do método são determinados pela substituição da equação total do método no balanço de população para definir um resíduo (RAWLINGS *et al*., 1993).

2.6.3.2. Método de Colocação Ortogonal

As variáveis envolvidas são expandidas em termos de uma função tentativa polinomial e as equações diferenciais parciais (EDP) são satisfeitas nos pontos discretos ou pontos de colocação, os quais resultarão num conjunto de equações diferenciais ordinárias (EDO). Estas EDO's são expressas, normalmente, em termos do valor da solução nos pontos de colocação e, a colocação ortogonal pode ser feita em uma das duas ou em ambas as direções espaciais do modelo matemático (VASCO DE TOLEDO, 1999)

2.6.3.3. Método das Linhas

O método das linhas consiste na discretização parcial de uma equação diferencial parcial, na qual todas as coordenadas menos uma são discretizadas. A coordenada que não é discretizada deve aparecer apenas como uma derivada primeira, isto é, a equação diferencial parcial é de primeira ordem em relação a esta coordenada. Assim, um sistema de equações diferenciais ordinárias é o resultado da discretização parcial (PINTO & LAGE, 1997).

2.6.3.4. Método de Runge-Kutta

O método de Runge-Kutta é um método clássico de fácil resolução e suficientemente preciso para resolução de problemas que envolvem equações diferenciais ordinárias. Um dos métodos de Runge-Kutta mais usado é o método de quarta ordem (LUNELLI & MACIEL, 2007). Esse método envolve uma média ponderada dos valores de *f(t,y)* tomados em diferentes pontos de intervalo de intervalo ($t_n \leq t \leq t_{n+1}$), e é dado por:

$$y_{n.1} = y_n + \frac{h}{6}(k_{n.1} + 2k_{n.2} + 2k_{n.3} + k_{n.4})$$
$$y_{n.1} = hf(t_n, y_n)$$
$$y_{n.2} = hf(t_n + \frac{1}{2}h, y_n + + \frac{1}{2}hk_{n.1})$$ (Equação 2.6)
$$y_{n.3} = hf(t_n + \frac{1}{2}h, y_n + + \frac{1}{2}hk_{n.2})$$
$$y_{n.4} = hf(t_n + h, y_n + + hk_{n.3})$$

Devido à natureza não linear da velocidade de reação, a solução numérica é facilmente implementada em computador, podendo-se incorporar diferentes modelos cinéticos para levar em conta fenômenos de inibição pelo substrato, produto ou pela própria célula, ou ainda manutenção celular e morte (LUNELLI & MACIEL, 2007)..

2.6.3.5. Planejamento Experimental

O planejamento experimental vem sendo muito usado para avaliar e otimizar processos industriais, pois é uma ferramenta que busca facilitar o estudo de um sistema, diminuindo a quantidade de experimentos necessários para obtenção de informações sobre o comportamento do mesmo. Segundo BOX & HUNTER (1987), o planejamento experimental fatorial facilita a elaboração de modelos, interagindo os dados; fazendo comparações, buscando similaridades, diferenças e tendências. Quando há a necessidade de investigar um grande número de fatores para estabelecer aqueles mais importantes, emprega-se um projeto que permite verificar os efeitos principais do maior número possível de fatores, com um menor número de observações (RODRIGUES, 2010). Tais projetos são chamados projetos saturados, porque toda a informação é usada para estimar os efeitos principais, não restando graus de liberdade para estimar os efeitos de interação e às vezes, nem o erro experimental (BARROS NETO *et al*., 1996). Um exemplo deste tipo de planejamento saturado é o planejamento de Plackett-Burman (PB).

Os planejamentos de PB são planejamentos fatoriais fracionários através dos quais se podem estudar muitos fatores com poucos ensaios. Neste caso, os fatores considerados são os parâmetros cinéticos do modelo e as respostas são as concentrações de células, substrato e produto. Tais planejamentos são de dois níveis e estudam k = N-1 fatores em N ensaios (RODIGUES, 2010). Maiores detalhes sobre os planejamentos de PB podem ser obtidos em PLACKETT & BURMAN (1946).

2.7. Estratégias de fermentação para a produção de ácido succínico

Na Tabela 2.13 foi elaborada uma avaliação para a produção de ácido succínico, mediante uma ampla revisão da literatura, até a presente data. Foram selecionados para a análise os seguintes aspectos: as linhagens mais recorrentes (*A.succinogenes, A. succiniciproducens, M.succiniciproducens, E.coli, C.glutamicum e Bacteroides fragalis*), as estratégias de fermentação (aeração, operação do processo, componentes do meio e fonte de CO_2), além dos valores de rendimento, taxa de formação de produto, concentração final de produto, produtividade volumétrica e subprodutos formados (BEAUPREZ *et al*., 2010). Entre os trabalhos pesquisados, há um total de 11 patentes, que foram depositadas entre 1992 e 2005. Cabe ressaltar que os resultados encontrados para a linhagem *A. succinogenes* CIP 106512 foram os mais proeminentes do presente trabalho.

Nota-se que a maioria dos grupos conduziram o processo em batelada, com resultados relativamente satisfatórios, embora os maiores valores de produtividades e taxas de formação de produto tenham sido obtidos com os ensaios conduzidos em batelada alimentada e processo contínuo. Todos as operações descritas foram conduzidas em pH neutro e apresentaram formação de outros metabólitos, além do ácido succínico, comportamento típico de heterofermentação. A maioria dos estudos utilizou para o preparo do meio de cultivo as seguintes matérias-primas: milhocina, hidrolisado da madeira, hidrolisado de resíduos do milho, soro e melaço. Quase a tolalidade dos ensaios foram conduzidos com glicose como fonte de carbono. No entanto, ISAR *et al*. (2006) depositaram uma patente onde foi utilizada a sacarose como fonte de carbono, com *E.coli* W3110 e o processo foi conduzido com batelada em duas fases (aeróbica e anaeróbica), resultando em um elevado rendimento, de 1.2 g/g, uma concentração final de ácido succínico de 24 g/L e uma produtividade volumétrica de 0,81g/L.h.

Uma produtividade volumétrica elevada, igual a 10.4 g/L.h, e uma concentração igual 83 g/L de ácido succínico, foram obtidos durante um processo contínuo com *A. succiniciproducens*, a partir de um sistema de integração com membranas para o reciclo de células, a uma taxa de diluição igual a 0,98 h^{-1} (MEYNIAL & DOROTNY, 2008)

Em um processo conduzido com batelada alimentada e reciclo de células, por *C. glutamicum* (OKINO *et al.,* 2008), uma concentração de 146 g/L de ácido succínico foi obtida. Cabe ressaltar que os autores fizeram uso de engenharia metabólica para atingir os objetivos almejados. Utilizando a bactéria *A succinogenes* CGMCC1593, ZHENG *et al.* (2009) conseguiram um rendimento de 80% em ácido succínico, a partir do hidrolisado da palha, após destoxificação para redução da concentração de inibidores do crescimento celular, além de conduzirem o processo em batelada alimentada.

Tabela 2.13. Valores encontrados e calculados para rendimento ($Y_{p/s}$), produtividade volumétrica (Q_p) e taxa específica de formação de produto (q_p), a partir dos dados obtidos pela literatura, para diferentes linhagens e estratégias de fermentação.

Linhagens	Estratégia de fermentação	$Y_{p/s}$ (g/g)	q_{AS} (g/g . h)[d]	Qp (g/L.h)	P (g/L)[c]	Subprodutos[b]	Referências
A. succinogenes							
CIP106512	an; B; Xi, E.L, CO_2, $NaHCO_3$	0.66	0.34	1.88	42.5	Fo,Ac	Este trabalho
CIP106512	an; B; Hbc, E.L, CO_2, $NaHCO_3$	0.53	0.31	1.50	40.3	Fo,Ac	Este trabalho
CIP106512	an; B; Glc, E.L, CO_2, $NaHCO_3$	0.52	0.27	1.77	41.6	Fo,Ac	Este trabalho
CIP106512	an; B; Bc(SSF), E.L, CO_2, $NaHCO_3$	0.45	0.25	1.42	38.4	Fo,Ac	Este trabalho
FZ6	an; B; Mic, E.L, Na_2CO_3	0.94	N.D.	1.01	63.7	Fo, Pi, Pr, Ac	GLASSNER *et al.*, 1996
130Z	an; B; Mic, E.L, Na_2CO_3	0.79	N.D.	1.56	29–39	Fo, Pi, Ac	GLASSHER *et al.*, 1998
FZ53	an; B; Glc, Mic, E.L, $MgCO_3$	0.82	N.D.	1.36	105.8	Fo, Pi, Pr, Ac	GUETLER *et al.*, 1996
130Z	an; B; Glc, Mic, E.L, Ac, $MgCO_3$	0.87	N.D.	0.18	17.4	Fo, Pi, Ac	URBANCE *et al.*, 2003
130Z*	an; **Bs**; Glc, Mic, E.L, Ac,	0.86	N.D.	0.88	33.9	Fo, Pi, Ac	URBANCE *et al.*, 2004
130Z	an; B; Glc, Def, $NaHCO_3$	0.46	0.47	0.28	4.2	Fo, Ac, Et	MCKINLAY *et al.*, 2005
130Z	an; B; Glc, Def, $NaHCO_3$	0.5	0.19	0.3	4.1	Fo, Ac, Et	MCKINLAY *et al.*, 2007
130Z	an; B; Glc, E.L, CO_2, $NaHCO_3$	0.62	0.3	1.35	33.8	Fo, Ac	CORONA *et al.*, 2008
CGMCC1593	an; B; HM, E.L, CO_2, Na_2CO_3	0.79	N.D.	0.97	46.4	Fo, Ac	LIU *et al.*, 2008
CGMCC1593*	an; **BA**; HM, E.L, CO_2, Na_2CO_3	0.94	N.D.	1.15	55.2	Fo, Ac	LIU *et al.*, 2008
CGMCC1593*	an; **BA**; Glc, E.L CO_2, Na_2CO_3	0.75	N.D.	1.3	60.2	Fo, Ac	LIU& ZHENG,2008
130Z	an; B; Sor, E.L, CO_2	0.57	N.D.	0.58	50	Fo, Ac	WAN *et al.*, 2009
130Z	an; B; HTr, CO_2, $MgCO_3$	0.81	N.D.	1.19	64.2	Fo, Ac	DU *et al.*, 2008
CGMCC1593	an; B; HMil, CO_2, $MgCO_3$	0.81	N.D.	0.95	45.5	Fo, Ac	ZHENG *et al.*, 2009
CGMCC1593*	an; **BA**; HMil, CO_2, $MgCO_3$	0.82	N.D.	1.21	53.2	Fo, Ac	ZHENG *et al.*, 2009
A. succiniciproducens							
ATCC 29305[a]	an; B; Glc, Mic, CO_2, Na_2CO_3	0.79	N.D.	0.79	15.9	Fo, Ac, Et, La	SAMUELOV *et al.*, 1991
ATCC 53488	an; B; Glc, Mic, CO_2, Na_2CO_3	0.91	N.D.	1.93	43.5	Fo, Ac	SONG & LEE, 2006
ATCC 53488	an; B; Glc, P, E.L, CO_2, Na_2CO_3	0.88	N.D.	0.87	33.2	Fo, La, Ac	DATTA *et al.*, 1992
ATCC 53488*	an; **C2e**; Glc, Mic , CO_2, Na_2CO_3	0.85	N.D.	2.03	39.1	Fo, Ac	DATTA & JAIN, 1992
FA-10	an; B; Glc, Mi, CO_2, Na_2CO_3	0.66	N.D.	0.77	34.1	Fo, Ac, Pi	GUETLER & JAIN, 1994

Linhagens	Estratégia de fermentação	$Y_{p/s}$ (g/g)	q_{AS} (g/g . h)[d]	Qp (g/L.h)	P (g/L)[c]	Subprodutos[b]	Referências
FA-10	an; B; Glc, E.L, P, CO_2, Na_2CO_3	0.7	N.D.	0.78	31.6	Fo, Ac	GUETLER & JAIN, 1994
ATCC 53488	an; B; Glc, E.L, P, CO_2, Na_2CO_3	0.99	1.5	1.2	32.2	Fo, Ac	NGHIEM *et al.*, 1997
ATCC 53488	an; B; Glc, E.L, P, CO_2/H_2,	0.86	0.45	1.8	34.4	Ac	LEE *et al.*, 1999
ATCC 53488	an; B; Sor, Mic, CO_2, Na_2CO_3	0.84	N.D.	N.D.	34.3	Fo, La, Ac	SAMUELOV *et al.*, 1999
ATCC 53488*	an; **BA**; Sor, Mic, CO_2, Na_2CO_3	0.91	N.D.	0.96	34.7	Fo, La, Ac	SAMUELOV *et al.*, 1999
ATCC 53488	an; **C**; Sor, Mic, CO_2, Na_2CO_3	0.64	N.D.	3	19.8	Fo, La, Ac	SAMUELOV *et al.*, 1999
ATCC 53488	an; B; Glc/Gl, P, E.L, CO_2,	0.97	0.29	1.35	29.6	Ac	LEE *et al.*, 2001
ATCC 53488	an; B; HM, Mic, CO_2, Na_2CO_3	0.88	0.37	0.74	23.8	Ac	LEE *et al.*, 2003
ATCC 53488*	an; **Cm**; Glc, P, E.L, CO_2,	0.88	1.1	10.4	83	Ac	MEYNIAL *et al*, 2008
ATCC 53488*	an; **Cm**; Glc, P, E.L, CO_2,	0.71	0.51	3.3	14.3	Ac	LEE *et al.*, 2008
ATCC 53488	an; B; Gal, P, E.L, CO_2, Na_2CO_3	0.87	1.32	1.46	15.3	Ac	LEE & CHANG, 2008
ATCC 53488	an; B; Gal/Glc, P, E.L, CO_2,	0.87	3	0.97	14.7	Ac	LEE & CHANG, 2008
M. succiniciproducens							
MBEL55E	an; B; Glc, P, E.L, CO_2	0.70	0.54	1.87	14	Fo, La, Ac	LEE & HONG, 2002
MBEL55E	an; B; HM, Mic, E.L, CO_2	0.72	0.37	1.22	13.5	Fo, La, Ac	LEE & CHANG, 2003
MBEL55E	an; C; HM, Mic, E.L, CO_2	0.69	0.45	1.00	12	Fo, Ac	LEE & CHANG, 2003
MBEL55E	an; C; HM, Mic, E.L, CO_2	0.60	1.77	3.90	5	Fo, La, Ac	LEE & CHANG, 2003
MBEL55E	an; B; HM, E.L, CO_2	0.56	0.58	1.17	11.7	Fo, La, Ac	LEE *et al.*, 2003
MBEL55E	an; C; HM, E.L, CO_2	0.60	1.80	1.40	9.5	Fo, La, Ac	LEE *et al.*, 2003
MBEL55E	an; C; HM, E.L, CO_2	0.55	6.38	3.19	8	Fo, La, Ac	LEE *et al.*, 2003
LPK7*	an; **BA**; Glc, E.L, CO_2	0.76	0.72	1.80	52.4	Pi, Ma, Ac, La	LEE & SONG, 2006
MBEL55E	an; B; Glc, E.L, CO_2, $NaHCO_3$	0.59	0.52	1.75	10.5	Fo, La, Ac	LEE *et al.*, 2007
LPK7	an; C; Glc (9 g/l), E.L, CO_2	0.71	0.64	1.29	12.9	Pi, Ac, La	OH & LEE, 2008
LPK7	an; C; Glc (9 g/l), EL, CO_2	0.29	0.78	1.56	5.2	Pi, Ac, La	OH & LEE, 2008
LPK7	an; C; Glc (18 g/l), EL, CO_2	0.28	0.53	1.07	10.7	PI, Ac, La	OH & LEE, 2008
LPK7	an; C; Glc (18 g/l), EL, CO_2	0.10	0.52	1.05	3.5	PI, Ac, La	OH & LEE, 2008
LPK7	an; B; Glc, Def, CO_2	0.54	0.53	1.67	10.1	Fo, La, Ac	SONG & JANG, 2008
E. coli							
JCL1208pPC201	an; B; Glc, E.L, T, $MgCO_3$	0.29	N.D.	0.59	10.7	Fo, Ac, Et, La	MILLARD *et al.*, 1996

Linhagens	Estratégia de fermentação	$Y_{p/s}$ (g/g)	q_{AS} (g/g . h)[d]	Qp (g/L.h)	P (g/L)[c]	Subprodutos[b]	Referências
NZN111pMEE1	d; B; Glc, E.L, T, CO_2/H_2, $MgCO_3$	0.64	N.D.	0.32	12.8	Ac, Et	STOLS & DONNELLY,1997
MG1655/pUC18	an; B; Glc, E.L T, CO_2	0.42	0.48	0.43	4.2	Fo, La	GOKARN *et al.*, 1998
AFP111	d; B; Glc, Mi, CO_2, Na_2CO_3	0.54	N.D.	0.52	51	Ac	NGHIEM *et al.*, 1999
JCL1242-*pyc*	an; B; Glc, E.L, T, Na_2CO_3, CO_2	0.15	0.17	0.14	1.5	Fo, Ac, Et, La	GOKARN & ALTMAN, 2000
NZN111pTrcML*	d; **BA**; Glc, E.L, T, CO_2/H_2	0.47	N.D.	0.08	9.4	Ma, Ac, Fo, La,	HONG &LEE, 2001
AFP400	an; B; Glc, EL, T, CO_2, $MgCO_3$	0.61	N.D.	0.61	6.1	Fo, Ac, Et, La	CHATTERJEE *et al.*, 2001
AFP111-*pyc*	d; B; Glc, EL, T, CO_2, Na_2CO_3	1.10	0.13	1.30	99.2	Ac, Et	VEMURI et al., 2002
NZN111pTrcML	d; B; So, EL, T, CO_2	1.10	N.D.	0.13	10	Ma, Ac, Et	HONG & LEE, 2002
SS373	d; B; Glc, EL, CO_2, Na_2CO_3	0.73	N.D.	0.32	11	PI	CHANG & KIM, 2002
NZN111pTrcMLFu	d; B; Glc, EL, T, CO_2/H_2	0.35	N.D.	0.06	7	Ac, Et	HONG & LEE, 2004
HL27615k	ae; B; Glc, EL, T, Na_2CO_3	0.45	N.D.	0.16	5	PI, Ac	LIN & BENNETT, 2005
HL27659k-*pepc**	ae; **BA**; Glc, EL, T, $NaHCO_3$	0.62	0.09	0.72	58.3	PI, Ac	LIN & SAN, 2005
HL51276k-*pepc*	ae; B; Glc, EL , T, $NaHCO_3$	0.71	0.05	0.14	8.3	PI, Ac	LIN & BENNETT, 2005
HL27659k*	ae; **C**; Glc, EL, T, $NaHCO_3$	0.59	0.20	0.70	7	PI, Ac	LIN *et al.*, 2005
SBS550MG*	an; **BA**; Glc, EL,T, $NaHCO_3$	1.06	0.21	0.42	40	Fo, Ac	SANCHEZ *et al.*, 2005
E. coli							
W3110GFA*	an; **BA**; Glc, EL, $NaHCO_3$, CO_2	0.2	N.D.	0.03	2.1	Fo, Ac, Et, La	LEE & KIM, 2005
SBS110MG-*pyc*	an; B; Glc, EL, T, $NaHCO_3$, CO_2	0.9	N.D.	0.65	16	Fo, Ac	SANCHEZ *et al.*, 2005
TUQ19/pQZ6	d; B; Glc, EL, T, $MgCO_3$, CO_2	0.8	N.D.	0.79	13	Ac, Et, La	WANG & CHEN, 2006
TUQ2/pQZ6/pQZ5	d; B; Glc, EL, T, $MgCO_3$, CO_2	0.8	1.2	0.59	12	Ac, Et, La	WANG & WU, 2006
W3110	d; B; Sac, EL, T, CO_2, $MgCO_3$	1.2	N.D.	0.81	24	N.D.	ISAR *et al.*, 2006
SBS550 pHL314*	an; **BA**; Glc, EL, T, $NaHCO_3$, CO_2	1.1	N.D.	0.42	40	Fo, Ac	KA-YIU *et al.*, 2005
AFP184	d; B; Glc, Mic, CO_2	0.8	N.D.	1.27	38	PI	ANDERSSON *et al.*, 2007
AFP184	d; B; Fru, Mic, CO_2	0.7	N.D.	1.01	30	PI	ANDERSSON *et al.*, 2007
AFP184	d; B; Xi, Mic, CO_2	0.5	N.D.	0.78	23	PI	ANDERSSON *et al.*, 2007
NZN111*	d; **BA**; Glc, Ac, $NaHCO_3$, CO_2	0.7	0.2	0.70	28	PI, Ac	WU & ZHOU, 2007
W3110	d; B; Me, Mic, CO_2, $MgCO_3$	0.52	N.D.	0.87	26	N.D.	AGARWAL *et al.*, 2007
KJ060	an; B; Glc, def, $NaHCO_3$, CO_2	0.9	N.D.	0.90	87	Ma, Ac, La	JANTAMA *et al.*, 2008
KJ073	an; B; Glc, def, $NaHCO_3$, CO_2	0.8	N.D.	0.82	79	Ma, Ac, PI	JANTAMA & HAUPT, 2008

Linhagens	Estratégia de fermentação	$Y_{p/s}$ (g/g)	q_{AS} (g/g . h)[d]	Qp (g/L.h)	P (g/L)[c]	Subprodutos[b]	Referências
KJ060	an; B; Glc, def, $NaHCO_3$, CO_2	1.1	N.D.	0.61	73	Ma, Ac, La, PI	JANTAMA & HAUPT, 2008
KJ122	an; B; Glc, def, $NaHCO_3$, CO_2	0.9	0.4	0.88	83	Ma, Ac, PI	JANTAMA & ZHANG, 2008
C. glutamicum*							
R*	µae; **BArc**; Glc, EL, Cas, $NaHCO_3$	0.19	0.13	3.8	23	Ac, La	OKINO *et al*., 2005
R Δ*ldhA*-pCRA717*	µae; **BArc**; Glc, EL, Cas, $NaHCO_3$	0.92	0.06	3.17	146	Ac, Ma, La, PI	OKINO *et al*., 2008
Bacteroides fragalis							
MTCC1045	an; B; Glc, EL, P, Na_2CO_3, CO_2	0.62	N.D.	0.42	12.5	N.D.	ISAR & AGARWAL, 2006
MTCC1045	an; B; Glc, EL, P, Na_2CO_3, CO_2	0.57	N.D.	0.83	20	N.D.	ISAR & AGARWAL, 2007

Estratégia de fermentação: an: anaeróbico, ae: aeróbico, d: duas fases; µae: microaeróbico; B: batelada, Bs: batelada sequencial (repetida); BA: batelada alimentada, BArc: batelada alimentada com reciclo de células, C: cultivo contínuo, C2e: sistema contínuo em dois estágios (2 taxas de diluição diferentes), Cm: cultivo contínuo integrado com sitema de membranas para reciclo de células.
Meio de cultivo: Xi: xilose, Glc: glicose, Gl: glicerol, Sac: sacarose, Fru: frutose Gal: galactose, So: sorbitol, P: peptona, T: triptona, E.L: extrato de levedura, Cas: casaminoácidos, Mic: milhocina, Sor: soro, HM: Hidrolisado de madeira pré-tratado, Me: melaço de cana, HTr: Hidrolisado do trigo, HMil: Hidrolisado de resíduos de milho (corn stover), Bc: bagaço de cana-de-açucar, Hbc: Hidrolisado do bagaço de cana-de-açucar; Ac: acetato, Def: meio definido.
Símbolos: Qp: produtividade volumétrica, q_{AS}: taxa específica de formação de ácido succínico, Yp/s: rendimento em produto por substrato consumido, N.D: Nenhum dado foi mencionado
Subprodutos: Fo: ácido fórmico, La: ácido lático, Ac: ácido acético, PI: piruvato, Ma: malato, Pr: propionato, Et: etanol.
Índices: a: ATCC 29305 foi depositado novamente, como ATCC 53488, em 1992**. b:** Em muitos casos, não houve a formação de todos os subprodutos. **c:** Alguns casos apresentaram valores baixos na concentração de ácido succínico, devido ao uso de pequenas concentrações iniciais de fonte de carbono ou adotaram uma estratégia de fermentação pouco eficiente. **d:** Muitos estudos não apresentaram dados suficientes para que fossem realizados todos os cálculos referentes às taxas específicas de formação de produto.
* Processos que utilizaram estratégias diferentes da condução em Batelada simples.
Dados em vermelho representam as referências de trabalhos que foram depositados como patente.
Fonte: Adaptado de BEAUPREZ *et al*. (2010)

Uma alternativa para a redução desses metabólitos indesejados para processos com *A. succinogenes*, envolve o uso de engenharia genética, retirando os genes que codificam para formação de formato, lactato e etanol (desidrogenase) e acetato (quinase). Um estudo com uma bactéria modificada, *A. succinogenes* FZ6, mostrou que a produção de piruvato foi aumentada ao invés de succinato, devido à ação da desidrogenase (PARK *et al*., 1999), indicando que a formação de subproduto é o resultante na rota fosfoenolpiruvato para piruvato ou oxaloacetato. Logo o fluxo para piruvato precisa ser controlado (SAUER *et al*., 2005). Porém, toda estratégia de engenharia exige ferramentas genéticas essenciais para uma modificação adequada do microrganismo e, ainda não foram desenvolvidas muitas tecnologias para *Pasteurellaceae*. Recentemente, um vetor de transporte foi construído para *A. succinogenes*, que permitiu a superexpressão de genes exógenos (KIM & LAIVENIEKS *et al*., 2004). A divulgação dessa informação genética atendeu as expectativas de alguns estudos, utilizando *E.coli* (deMEY *et al.,* 2007), melhorando o rendimento em ácido succínico, mas acarretou em um grande número de subprodutos.

2.8. Considerações gerais

O crescimento populacional e a associada demanda por combustíveis e bens de consumo têm intensificado Pesquisa e Desenvolvimento para a utilização, de forma mais diversificada, de matérias-primas renováveis, em substituição às fontes fósseis. Isso tem estimulado pesquisadores e empresas de diversos países, que contam com amplos mecanismos de apoio governamental, a buscar o desenvolvimento de novas tecnologias, visando à instalação de biorrefinarias análogas às refinarias de petróleo.

A utilização de biomassas residuais é de grande interesse e importância na medida em que não há demanda de aumento da extensão de áreas agricultáveis. O que se tenciona é transferi-las da posição de resíduos sólidos para a posição de matérias-primas valiosas visando à produção de combustíveis e de outras substâncias químicas. Os avanços nesta área sinalizam que, seguramente, o aproveitamento de matérias-primas renováveis, incluindo os seus resíduos, reverterá à dependência mundial por fontes fósseis. Assim, matérias-primas não tradicionais deverão ter seu potencial avaliado e os processos de produção de biocombustíveis e de outras substâncias químicas, como ácido succínico, no contexto de biorrefinaria deverão ser desenvolvidos.

Como pode ser observado pela Tabela 2.13, a otimização de um processo para a obtenção de ácido succínico vem sendo tópico constante de várias pesquisas nos últimos anos. Embora alguns dos desempenhos do processo sejam de fato promissores, muitos

problemas foram descobertos. Existe uma expressiva quantidade de microrganismos produtores de ácido succínico, conforme foi descrito antriormente, com destaque para as espécies *A. succinogenes, A. succiniciproducens, M. succiniciproducens, E. coli, Corynebacterium. glutamicum e Bacteroides. fragalis*. As linhagens naturalmente ocorrentes, vêm apresentando uma série de "auxotrofias", aumentando as exigências pelo substrato e, consequentemente encarecendo o processo. Além disso, a maioria dos rendimentos eficientes, foi alcançada mediante a utilização de um meio de cultivo complexo.

Para evitar o principal problema de auxotrofia, a *E.coli* foi escolhida como alternativa para alguns processos, devido a sua facilidade de crescimento em meio de composição mínima e alteração genética do metabolismo. Embora muitos processos tenham utilizado de forma recorrente esses métodos de mutação, nenhuma linhagem foi desenvolvida sem a necessidade de uma suplementação que compensasse a auxotrofia. Portanto, deveriam ser desenvolvidos modelos mais aprimorados para aumentar a taxa de produção. Cabe ressaltar a importância do uso de ferramentas computacionais para uma correta otimização, mediante simulações do processo, seguidas de uma coerente análise dos parâmetros do modelo e sua hierarquia de influência sobre a variável de resposta.

Sumariamente, a estratégia concebida para a elaboração do presente trabalho foi realizar o pré-tratamento químico em condições moderadas, que resulta na hidrólise da hemicelulose, seguido de pré-hidrólise enzimática da celulose, que foi na sequencia associada (integrada) a um processo de bioconversão, denominado de processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Foi com o intuito de inserir a produção de ácido succínico de 2ª geração no contexto de biorrefinaria que este trabalho foi concebido, não tendo sido identificados grupos nacionais ou poucos grupos internacionais que estejam trabalhando nesta temática. Acreditamos que a lacuna existente nos estudos relacionados à produção deste importante ácido orgânico corrobora a importância desta temática, dando o devido suporte a realização da presente tese de doutorado. Concluindo este capítulo, transcreve-se citação de uma declaração do orientador do presente trabalho de pesquisa.

O País reúne condições para ser o principal receptor de recursos de investimento, provenientes do mercado de carbono, por ter no meio ambiente sua maior riqueza e possuir enorme capacidade de absorção e regeneração atmosférica. A produção de ácido succínico de 2ª geração está inserida no contexto de biorrefinaria, avançando para as tecnologias emergentes e portadoras de futuro.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

3.1. Justificativa

A dependência por petróleo permanece como o fator mais importante que afeta a distribuição mundial de riqueza, os conflitos globais e a qualidade do meio ambiente. Existem diversas possibilidades para substituir processos químicos convencionais por processos biotecnológicos baseados em fontes renováveis, dentro do contexto de biorrefinaria. Porém, isso se torna viável somente quando a matéria-prima é barata, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil. Adicionalmente, é necessário o desenvolvimento de processos que trabalham de forma adequada para fazer o melhor uso possível de matéria-prima, com procedimentos que evitam o máximo possível à agressão ao meio ambiente, onde a utilização de fontes alternativas é feita de forma equilibrada entre a cadeia alimentar e a obtenção de produtos químicos (HATTI *et al*., 2007).

Paralelamente, questões de segurança, política e saúde estão se tornando cada vez mais importantes, fazendo-se necessária a reavaliação de muitos processos químicos. As autoridades reguladoras têm dado maior atenção aos problemas de caráter ambiental, seja por pressão da opinião pública mundial ou por segmentos da sociedade civil organizada. O processamento de hidrocarbonetos ocorre, via de regras, em solventes orgânicos. Muitas rotas são baseadas em catalisadores que requerem altas temperaturas e pressões para sua atividade. Em geral, reagentes, subprodutos ou intermediários são nocivos à saúde humana ou ao meio-ambiente. Além disto, o consumo de energia e a emissão de efluentes (líquidos, gasosos e resíduos sólidos) são significativos (DECHEMA, 2004).

Por outro lado, os bioprocessos ocorrem geralmente em meio aquoso e produzem efluentes com um grau de toxidez muito inferior em relação aqueles oriundos do processamento do petróleo. Além disto, os produtos do processamento de biomassa são normalmente biodegradáveis e não-tóxicos (LYND *et al*., 1999; WILLKE & VORLOPO, 2004). É incontestável que, particularmente na área de produção básica e na química fina, o uso de processos biotecnológicos é significativo, uma vez que:

- São usualmente distintos pela sua alta especificidade (conversão de substrato) e seletividade (espectro do produto);
- Usam fontes renováveis como matéria-prima, contribuindo para a sustentabilidade de processos e produtos;
- As reações dos processos biotecnológicos podem ocorrer em condições brandas em relação aos valores de pH, temperatura e pressão.

Sob esta panorâmica, bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado, a exemplo do que ocorre com a produção de etanol de 2ª geração, nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO/EQ/UFRJ), para obtenção de ácido succínico, desde que sejam utilizados os processos que permitam a extração dos açúcares constituintes. Em suma, são várias as justificativas que impulsionaram a realização do presente trabalho:

- O ácido succínico pode ser considerado um produto "*commodity*" de ampla aplicação industrial, tornando-se alvo de interesse por grandes empresas nos últimos anos;
- Possui alta reatividade, devido a sua quiralidade natural, pela presença de dois grupamentos carboxila;
- Permite o uso de matéria-prima renovável no processo fermentativo;
- É economicamente viável em relação à rota química;
- Está inserido no contexto de tecnologia de captação de CO_2;

Dessa forma, faz-se evidente a importância do desenvolvimento de um projeto sobre esta temática, envolvendo baixos custos e altas produtividades. A seguir, o objetivo geral e objetivos específicos foram traçados:

3.2. Objetivo geral

Dentro do contexto apresentado acima, o objetivo geral do presente trabalho consiste no desenvolvimento de um processo microbiano, economicamente viável, para a síntese de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* CIP 106152, a partir da fermentação do bagaço de cana-de-açúcar, através da conversão de xilose (hemicelulose) e glicose (celulose), respectivamente.

3.2.1. Objetivos específicos

- Padronizar o tempo de propagação através de estudos dos perfis cinéticos de crescimento da bactéria *Actinobacillus* Succinogenes CIP 106152;
- Elaborar um meio de crescimento menos complexo, em relação ao recomendado pela literatura, para normalizar a atividade metabólica da linhagem;
- Estudar a melhor relação carbono e nitrogênio (C:N) na produção de ácido succínico, usando glicose e xilose como fontes de carbono;
- Avaliar da influência dos componentes do meio de fermentação na produção de ácido succínico através de planejamento experimental;
- Otimizar das condições de processo (pH, agitação, temperatura), utilizando metodologia de planejamento experimental como ferramenta de trabalho, com a produção ácida como variável de resposta;
- Estudar a fermentabilidade a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, obtido em condições otimizadas por Betancur (2005), para produção de ácido succínico;
- Estudar uma estratégia para propagação celular em meio contendo hidrolisado com alto teor de xilose (aclimatação celular);
- Otimizar a produção de ácido succínico em biorreator, na ausência e presença de suprimento externo de CO_2 durante o processo fermentativo, avaliando efetivamente sua influência no metabolismo celular;
- Validar os resultados obtidos no planejamento experimental fatorial, em biorreator instrumentado, com as variáveis significativamente mais favoráveis à produção de ácido succínico, segundo os experimentos conduzidos em frascos agitados;
- Investigar a viabilidade da realização de um processo simultâneo de hidrólise enzimática de celulose e fermentação (*SSF*), abordando o desempenho da linhagem face à utilização de celulignina, com preparados comerciais, em condições otimizadas por Santos (2009);
- Desenvolver um modelo determinístico simples, de acordo com os modelos existentes na literatura, para uma maior compreensão do comportamento cinético do processo estudado;

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e as metodologias utilizadas para o desenvolvimento do presente trabalho. Os experimentos tiveram início após a ativação das células, armazenadas em ampolas de liofilização, método utilizado para preservação de células a longo prazo. Foram estabelecidos: manutenção e manipulação do microrganismo utilizado; padronização do tempo para preparo de inóculo e a elaboração dos ensaios conduzidos em meio de composição simplificada. A metodologia experimental utilizada para obtenção de ácido succínico foi desenvolvida, inicialmente, através de frascos agitados com posterior validação das condições ótimas em biorreator instrumentado. Para a otimização do processo, foram utilizados planejamentos experimentais e análises de respostas mediante ferramentas computacionais de trabalho, garantindo um controle mais seguro das condições operacionais do processo.

4.1. Esterilização das vidrarias e do meio de cultivo

Toda vidraria utilizada nos experimentos de cultivo foi esterilizada em autoclave durante 20 minutos, sob pressão de 1 kgf/cm^2 e temperatura de 120ºC, seguido de secagem em estufa de esterilização Mod. FIC. 05. FAMO (50 a 60 ºC). Os meios de cultura foram autoclavados por 15 min., sob pressão de 0.5 kgf/cm^2 e temperatura de 120ºC.

4.2. Material microbiológico

4.2.1. Microrganismo utilizado

A linhagem de *Actinobacillus succinogenes* CIP 106512 foi obtida do banco de cepas francês "Institut Pasteur Collection - CIP", mantida em liofilização, armazenada em ampola devidamente lacrada, sob abrigo de luz. Esta bactéria foi previamente reportada como sendo o microrganismo mais adequado para conversão de açúcares a ácido succínico (ZEIKUS *et al.*, 1999).

A linhagem foi ativada mediante a suspensão de células em um meio líquido TSB (Caldo de Triptona de Soja - 500gr M/Difco), para obtenção de inóculo, com a seguinte composição, em g/L de água deionizada: Peptona de caseína: 3,0; Peptona de soja 2,0; Cloreto de sódio 4,0; Fosfato de potássio 2,5 e glicose 2,5 (VAN DER WERF *et al*., 1997). Inicialmente, preparou-se o meio contendo a solução de TSB 40,0 g/L que foi, em seguida, esterilizado. Seguindo a recomendação do CIP, tubos de ensaios contendo alíquotas de 2 mL deste meio foram utilizados para promover a ativação das células contidas nas ampolas de liofilização, que foram em seguida, transferidas assepticamente para o meio de manutenção. Com o auxílio de uma alça de *Drigalski*, previamente esterilizada, as células foram espalhadas sob a superfície do meio agarizado em placas de PETRI estéreis, as quais foram levadas para incubação a 37^{0}C por 24h.

4.2.2. Manutenção do microrganismo

O microrganismo foi mantido em ágar inclinado TSA (Triptona Agar Triptona de Soja – 500gr M/Difco) e armazenado a 4ºC, após ser incubado em estufa com temperatura controlada de 37^{0}C durante aproximadamente 24h. A composição do meio agarizado está descrita na Tabela 4.1. Com a finalidade de manter as células ativas para a realização dos diferentes experimentos, repiques periódicos a partir do cultivo original foram realizados a cada três meses em câmara asséptica.

Tabela 4.1. Meio de manutenção (TSA)

Componente	Concentração (g/L)
Peptona de caseína	5.0
Peptona de soja	2.0
Cloreto de sódio	4.0
Fosfato dipotásico	2.5
Glicose	2.5
Ágar-ágar	30.0

Fonte: (FREY, 1992).

4.2.3. Observação microscópica

Após o crescimento bacteriano nos meios de cultura, foram retiradas amostras assepticamente com auxílio de uma alça de platina e, preparados esfregaços em lâminas para posterior coloração, segundo o método Gram. As lâminas com material microbiano foram analisadas em microscópio binocular com aumento de 1000x.

4.3. Meios empregados para ativação, propagação e fermentação

Em todos os experimentos, as células foram inicialmente ativadas em meio líquido e, posteriormente propagadas.

4.3.1. Meio de ativação para obtenção do pré-inóculo

Foram utilizados tubos Falcon ou frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 20mL de meio esterilizado (Tabela 4.2), mantidos em agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C, durante 12 horas (tempo necessário para que as células atingissem uma concentração apropriada ao final da fase exponencial de crescimento).

Tabela 4.2. Composição do meio utilizado para pré-inóculo

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	20.0
Extrato de Levedura	2.0
$MgSO_4$	1.0
$NaHCO_3$	12.0
K_2HPO_4	1.5

Fonte: VAN DER WERF *et al.*, (1997)

4.3.2. Inóculo

Para atingir o crescimento celular, o meio para o preparo de inóculo possui mesma composição descrita na Tabela 4.2, com exceção da fonte de carbono, que anteriormente fora realizada apenas com glicose. Cabe ressaltar, nesta etapa, que todos os experimentos foram realizados paralelamente para glicose e xilose como fontes de carbono, mantendo-se os mesmos valores de concentração inicial para os outros componentes presentes no meio.

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio (previamente esterilizado), foram inoculados com o volume total de pré-inóculo (20mL), para a obtenção do cultivo de inóculo. As condições de cultivo, em incubadora refrigerada orbital, foram às mesmas citadas anteriormente. Adicionalmente, foi realizado um cultivo em meio sintético para a obtenção de inóculo, contendo hidrolisado diluído, visando avaliar o comportamento celular diante de inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico (BETANCUR, 2005), que foi esterilizado separadamente, a 0,5 atm durante 10 min.

A Figura 4.1 apresenta um esquema representativo dos ensaios, conduzidos inicialmente em frascos agitados. Foram realizados à quantificação de células e posterior cálculo do volume a ser centrifugado, obtendo-se a quantidade de células requeridas para alcançar as concentrações desejadas, de acordo com os planejamentos experimentais para cada fermentação desenvolvida. A concentração celular foi determinada pela medida de densidade óptica a 600 nm (SPECTRUMLAB 22 PC), utilizando-se uma curva de calibração para absorvância.

Resumidamente, as estratégias adotadas para os ensaios em frascos agitados, correspondem às seguintes etapas:

a) Todos os ensaios tiveram início com o cultivo de meio de ativação, em frascos cônicos de 100 mL contendo 20 mL de meio (Tabela 4.2), sob agitação de 150 rpm e 37ºC. Cabe ressaltar que não foram realizadas etapas de pré-inóculo a partir de xilose, usando-se portanto apenas a glicose para esta finalidade;

b) Para o preparo de inóculo, a composição dos nutrientes, foi fundamentada segundo as exigências do meio de crescimento preconizado por GUETLER (1996), cuja composição encontra-se na Tabela 4.3. Alguns nutrientes foram retirados por serem considerados excessivos ou de presença redundante, caracterizando uma complexidade desnecessária na formulação do meio. Dentre os nutrientes retirados, estão alguns sais minerais e algumas vitaminas, como tiamina (B_1), riboflavina (B_2), cianocobalamina (B_{12}), biotina (B_7) e niacina (B_3);

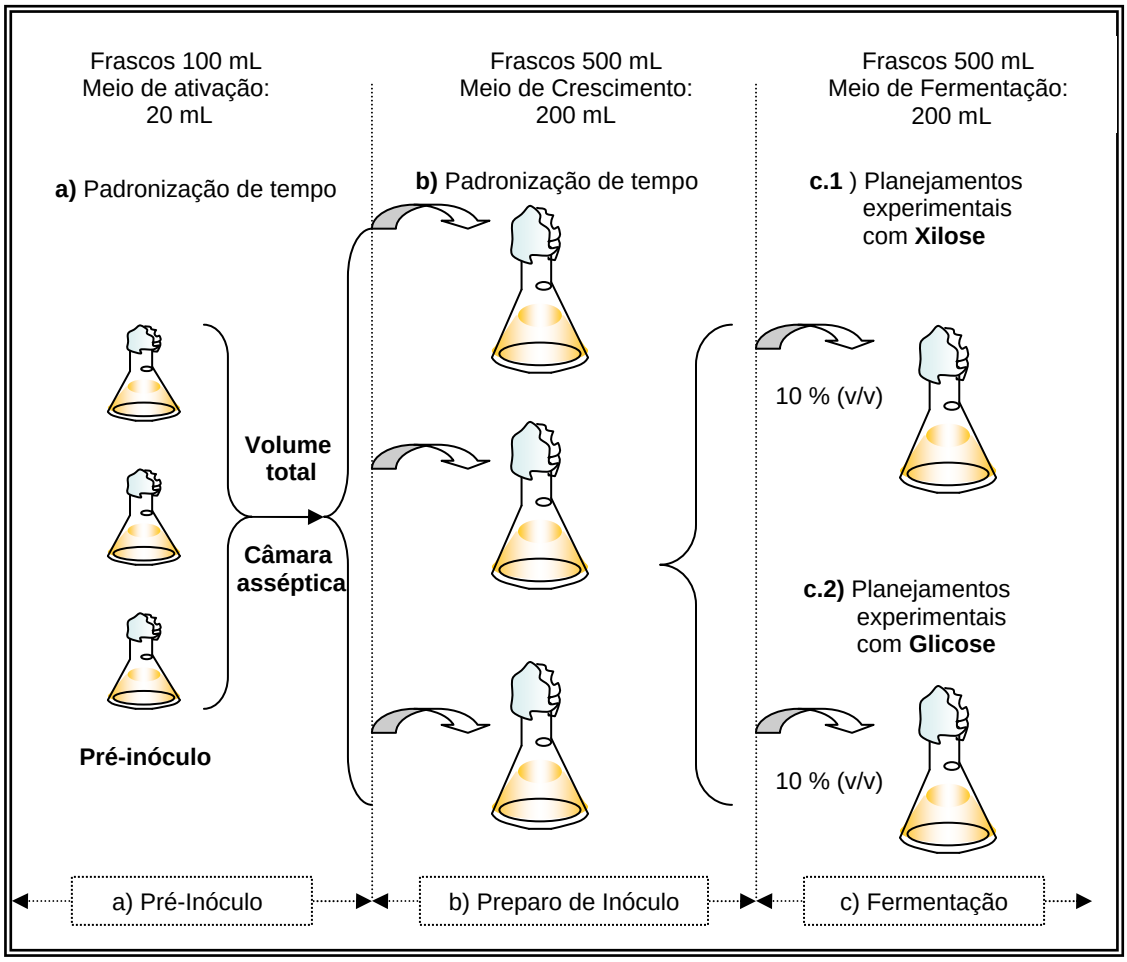

Figura 4.1. Esquema representativo das estratégias para a padronização do tempo de preparo de pré-inóculo (a), inóculo (b) e fermentação (c), dos experimentos iniciais, em frascos agitados. Todos os ensaios foram realizados para xilose e glicose, como fonte de carbono, sob as mesmas condições.

c) Em seguida, foram realizados estudos sobre a influência de cada nutriente presente no meio de fermentação e as condições de processo (pH, agitação e temperatura), visando a hierarquização das variáveis para alcançar melhores rendimentos sobre a produção de ácido succínico, de acordo com Gonzales *et al.* (2008). Para a análise do impacto dessas variáveis sobre a resposta de cada experimento, foi utilizado o Software Statistic 5.0 (Statsoft Inc. 2335, Easth 13th Street Tusla, OK, 74104, USA) e Design-Expert ver. 6.0 (Stat-Easem Minneapolis, MN), para ambas as fontes de carbono utilizadas (glicose e xilose). Os resultados obtidos nesta etapa foram posteriormente validados em biorreator, segundo as melhores condições determinadas com a execução do modelo, garantindo maior controle sob os parâmetros operacionais do processo.

Tabela 4 3. Composição do meio de crescimento preconizado por Guetler (1996).

Componentes	Concentração
Glicose	20 g
Extrato de levedura	5 g
$NaH_2PO_4 . H_2O$	1,16 g
Na_2HPO_4	0,31
NaCl	1,0 g
$MgCl_2 . 6 H_2O$	0,2 g
Vitamina B_{12}	10 mg
Biotina	200 mg
Ácido Fólico	200 mg
Tiamina	500 mg
Riboflavina	500 mg
Niacina	500 mg
Pantotenato	500 mg
P-aminobenzoato	500 mg
Ácido lipóico	500 mg
Vitamina B_6	1 mg
$MgCO_3$	80 g
Acetato de sódio	1,5 – 3,5 g
Dextrose	100 – 135 g

Fonte: GUETLER *et al*. (1996).

4.3.3. Meios de Fermentação

Para o preparo do meio sintético utilizado para os ensaios de fermentação, que antecederam a etapa de otimização mediante planejamento experimental (hierarquização dos efeitos das variáveis de processo), foi adotada a mesma sistemática descrita para o meio de crescimento celular (inóculo), alterando-se a concentração das fontes de carbono (xilose ou glicose), de acordo com os planejamentos sequenciais desenvolvidos, no decorrer do presente trabalho (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Composição do meio sintético para fermentação

Componente	Concentração (g/L)
Glicose ou Xilose	Variações*
Extrato de Levedura	2.0
$MgSO_4$	1.0
$NaHCO_3$	12.0
K_2HPO_4	1.5

* As concentrações de glicose ou xilose foram variadas de acordo com os planejamentos experimenatis sequenciais realizados

4.3.4. Processo de propagação mediante diferentes estratégias de aclimatação celular

Conforme mostra a Figura 4.2, com o objetivo de investigar o efeito da aclimatação celular, durante a conversão de xilose em ácido succínico, foram utilizadas três estratégias diferentes para a propagação celular para a obtenção do inoculo, a ser adicionado no biorreator contendo o hidrolisado hemicelulósico para fermentação. Estas estratégias estão descritas a seguir:

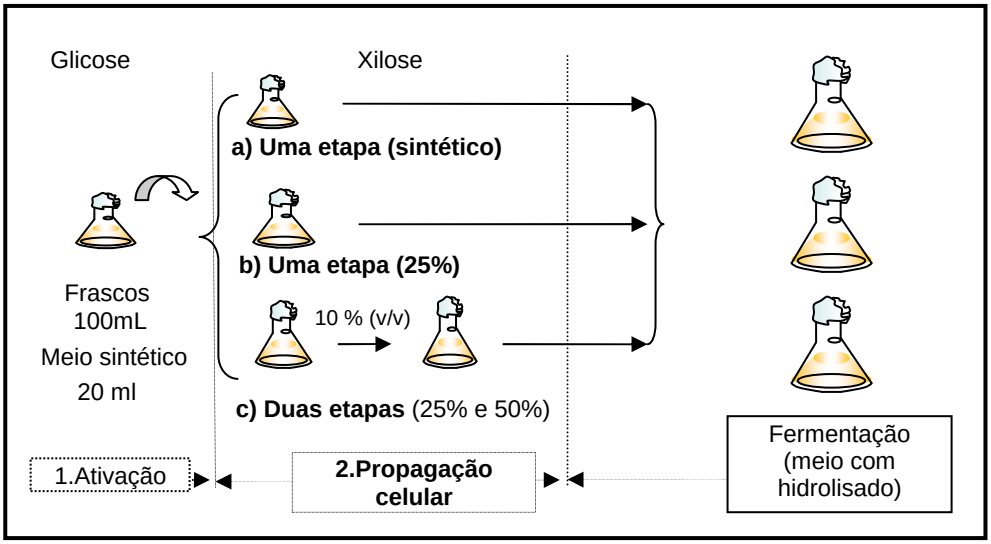

Figura 4.2. Metodologia para Propagação Celular. (a) crescimento em uma única etapa em meio sintético; (b) crescimento em uma única etapa em meio contendo 25% de hidrolisado e, (c) crescimento em duas etapas em meios contendo 25% e 50% de hidrolisado, respectivamente.

a) Para obtenção do inóculo, o processo de propagação celular em meio sintético em uma única etapa (propagação celular sem aclimatação) foi realizado, com a composição apresentada na Tabela 4.3, sendo esterilizado seguindo as mesmas condições anteriores. As duas etapas seguintes referem-se ao procedimento de aclimatação celular em meio contendo hidrolisado;

b) Aclimatação em uma única etapa: a composição do meio utilizado contém a mesma proporção de nutrientes descritos para o crescimento. Porém, a solução de xilose comercial foi substituída pelo hidrolisado, esterilizado durante 10 minutos a 0,5 atm, numa proporção de 25% do volume total, correspondentes a uma concentração de aproximadamente 20 g/L de xilose presente no meio;

c) Aclimatação em duas etapas: a metodologia é a mesma utilizada anteriormente, onde à propagação celular ocorre em um frasco cônico com 200 mL de meio contendo 25% de hidrolisado. Porém, em seguida, fracos cônicos contendo 200 mL com 50% de hidrolisado, foram inoculados com 10% (v/v) do meio obtido anteriormente. As células centrifugadas (3000 rpm/10 min) foram posteriormente ressuspensas no meio de fermentação contendo hidrolisado, com uma concentração de aproximadamente 3,0 g/L, mediante rigor estéril;

4.4. Processos de fermentação em frascos agitados

As fermentações foram realizadas em frascos cônicos de 500 mL contendo 200 mL do meio correspondente, com as concentrações de nutrientes definidas pelo planejamento experimental. O meio de fermentação foi inoculado, depois de esterilizado, com 10% (v/v) do inóculo e incubado em Shaker, sob agitação de 150 rpm, a 37ºC por aproximadamente 24h. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com uma solução de NaOH (2M) ou HCl (2M). Com a finalidade de evitar reações indesejadas entre os componentes do meio em altas temperaturas, uma solução contendo a fonte de carbono e outra com os demais nutrientes foram preparadas e esterilizadas separadamente, em todos os experimentos realizados no decorrer da pesquisa.

O crescimento celular, o consumo de substrato e a formação de produto foram acompanhados durante o tempo necessário, para verificar a estabilidade na concentração celular e/ou esgotamento da fonte de carbono.

A Figura 4.3 apresenta um esquema geral, visando facilitar a compreensão das etapas definidas para frascos agitados, onde podem ser vistos os pontos em que foram realizadas observações microscópicas para o monitoramento sob a pureza do cultivo.

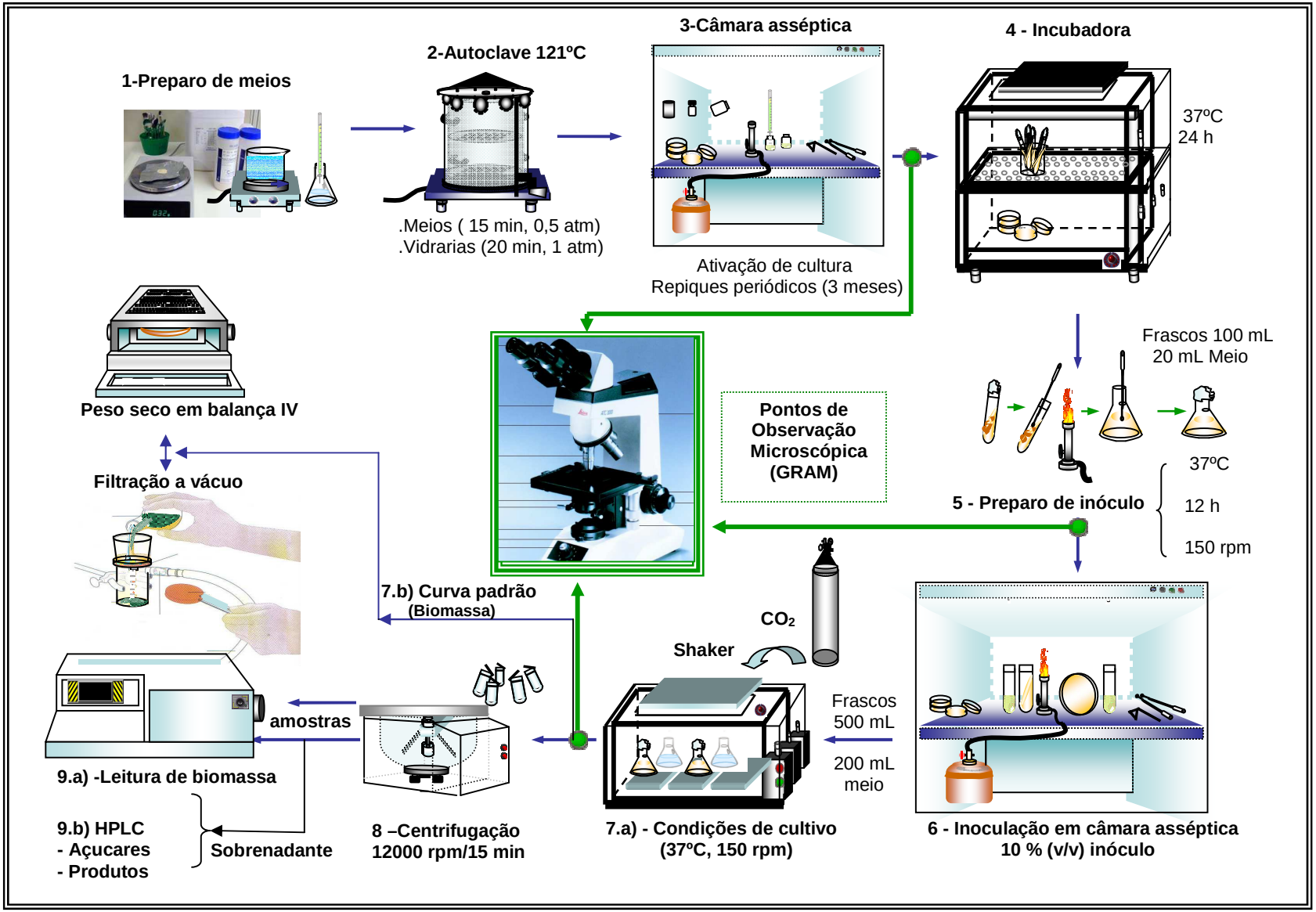

Figura 4.3. Esquema ilustrativo geral para crescimento celular e produção de ácido succínico, em frascos agitados. **1**-preparo de meio, **2**- esterilização de meios e vidrarias, **3**- ativação de células e repiques periódicos, **4**- condições de cultivo, **5**- preparo de inóculo, **6**- inoculação em meio de fermentação, **7. a)** Shaker e condições de cultivo, com ou sem presença de CO_2, **7.b)** filtração a vácuo de células para obtenção de curva padrão, correlacionando peso seco de células com absorvância, **8-** separação de biomassa e sobrenadante, **9 a)** quantificação de biomassa, **9.b)** quantificação de produtos e açucares em HPLC.

4.4.1. Fermentação em presença de CO_2 na fase gasosa

Os estudos de fermentação visando otimização do processo de obtenção de ácido succínico, foram realizados em frascos cônicos de 500 mL, contendo 200 mL do meio de crescimento, com suprimento externo de CO_2 na fase gasosa a 0,05 vvm (LEE *et al*., 1999), para garantir condições anaeróbicas, conforme mostra a Figura 4.4**.** Inicialmente, todo o material foi autoclavado e enviado para confecção do sistema de adição de CO_2, em câmara asséptica, para evitar contaminação. Dessa forma, após o desenvolvimento desta etapa, fundamental para se atingir a fase de crescimento celular exponencial, amostras foram coletadas para serem transferidas em novas placas, a partir das quais repiques periódicos foram realizados.

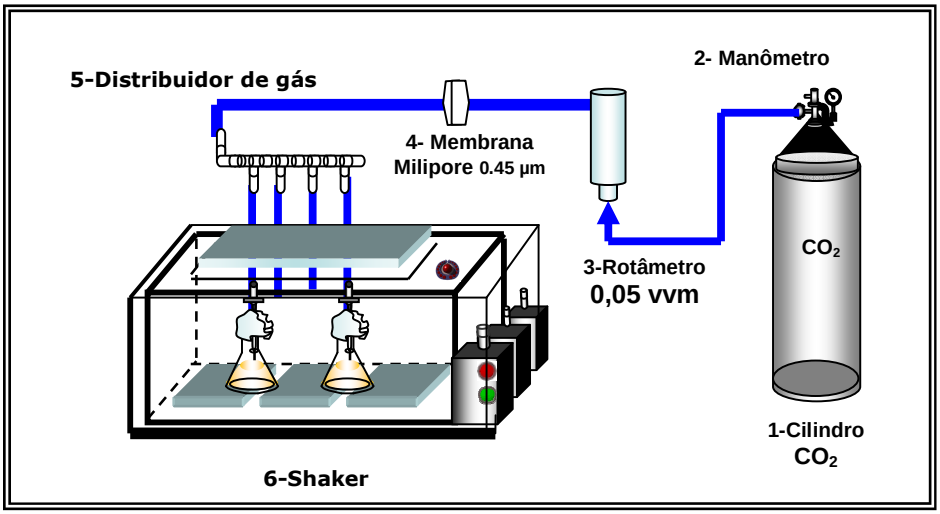

Figura 4.4. Esquema ilustrativo do sistema de adição de CO_2

O sistema projetado para disponibilizar o CO_2 no meio de fermentação foi constituído, basicamente, dos seguintes materiais: 1- cilindro de CO_2; 2- manômetro para controle de pressão; 3- rotâmetro para controle e monitoramento da vazão de gás; 4- membrana milipore para filtração do gás carbônico de entrada; 5- divisores plásticos, comumente empregados para distribuição de ar em aquários domésticos, dotados de controladores individuais de Vazão; 6 - mangueiras tygon para conexão entre os instrumentos utilizados e seringas descartáveis para permitir a passagem do gás carbônico para o interior dos frascos Erlenmeyer mantidos sob agitação em Shaker. Cabe ressaltar, que os experimentos desenvovidos ao longo do presente trabalho, foram realizados com células crescidas a partir de amostras obtidas durante a fase exponencial do perfil cinético de ensaios conduzidos, inicialmente, em presença de CO_2 (Figura 4.4). Este procedimento foi realizado para garantir o

bom desempenho em todos os ensaios posteriores, uma vez que tal exigência nutricional deve ser atendida de acordo com o que é reportado pela literatura.

4.5. Avaliação da relação C:N sobre o crescimento celular

Nesta etapa, o objetivo foi avaliar a melhor razão carbono/nitrogênio para o crescimento celular. Foram avaliados diferentes concentrações de glicose e xilose, mantendo-se fixa a quantidade de extrato de levedura, segundo metodologia desenvolvida por Gonzales *et al*. (2008), os quais estudaram também o uso de sacarose em seus experimentos. Porém, no presente trabalho foram avaliados apenas a glicose e xilose como fontes de carbono de interesse, além de um meio economicamente mais viável em relação à literatura. em um meio economicamente viável. Para a condução dos experimentos foram usados frascos cônicos de 500 mL contendo 200 mL de meio de crescimento com os seguintes componentes (em g/L de água deionizada): $MgSO_4$, 1.0; $NaHCO_3$, 12.0 e K_2HPO_4, 1.5 g. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH, após a esterilização. O meio de crescimento foi inoculado, depois de esterilizado com 10% (v/v) de inóculo e, em seguida, incubado a 150 rpm e 37ºC por 24h de fermentação. A Tabela 4.5, apresenta as diferentes razões de C:N.

Cabe ressaltar, que as fontes de carboidratos foram autoclavadas separadamente e adicionadas posteriormente no meio de cultiv, evitando possíveis reações de escurecimento, as quais promovem inibição do crescimento celular, inviabilizando o processo de fermentação..

Tabela 4.5. Composição química do meio líquido com diferentes razões C:N

Ensaio	Glicose e Xilose* (g/L)	C (g/L)	E.L (g/L)	N (g/L)	C:N
1	4,0	1,6	5	0,650	2,6:1
2	8,0	3,2	5	0,650	5,2:1
3	10,0	4,0	5	0,650	6,5:1
4	15,0	6,0	5	0,650	9,7:1
5	20,0	8,0	5	0,650	13:1
6	25,0	10,0	5	0,650	16,2:1
7	30,0	12,0	5	0,650	19,4:1
8	35,0	14,0	5	0,650	22,7:1
9	45,0	18,0	5	0,650	29,1:1
10	55,0	22,0	5	0,650	35,1:1

*Os valores encontram-se ligeiramente diferente daqueles usados por Gonzales *et al*. (2008), devido a imprecisão durante etapa de pesagem na quantidade de açucares, o que não inviabiliza estudos de comparação entre os resultados.

Segundo Gonzales *et al*. (2008), o estudo da influência da razão C:N pode ser baseado na composição química do meio de cultivo. Nesta etapa foram feitos dez meios com diferentes razões C:N, variando de 2.6 a 35.1, para cada carboidrato estudado (glicose,

xilose). Inicialmente foi determinada a quantidade de carbono e nitrogênio presentes nos açucares e no extrato de levedura

As massas de carbono na glicose e xilose tiveram como base a fórmula química dos açúcares ($C_6H_{12}O_6$, $C_5H_{10}O_5$ e $C_{12}H_{22}O_{11}$) sendo de 40% de C. Assim as quantidades de carbono foram calculadas multiplicando-se a concentração de carboidrato por 40%. A quantidade de nitrogênio foi calculada multiplicando-se a quantidade de extrato de levedura por 13,0%, dado determinado segundo metodologia usando o Kit da Hack, de acordo com Gonzáles *et al*. (2008).

4.5.1 Análise estatística

Os valores obtidos com os ensaios foram interpretados de acordo com a análise variância (ANOVA) e pelo teste de *Tukey* em $p<0,05$, disponível no software Statistica 5.0, permitindo visualizar as diferenças significativas entre as razões C:N estudadas, em termos de capacidade de crescimento de biomassa em cada fonte de carbono (BOX & HUNTER, 1978).

4.6. Planejamentos experimentais sequenciais para a otimização de parâmetros e condições de cultivo do processo de fermentação

Nesta etapa, os experimentos foram realizados de acordo com os princípios da metodologia estatística de superfície de resposta. O modelo estatístico é utilizado para o estudo dos efeitos agregados de variáveis com a finalidade de determinar as condições ótimas para sistemas de múltiplas respostas (RODRIGUES, 2010). Na maioria das vezes é mais interessante começar um experimento com um planejamento fatorial fracionado (PFF) ou Plackett-Burman (PB), analisar os efeitos principais das variáveis sobre as respostas e realizar outro planejamento, sequencialmente, reduzindo o número de variáveis e alterando as faixas de estudo em função do impacto que elas tiveram sobre as respostas, desde que a ausência de um dos parâmetros não comprometa a hierarquização (ordem dos efeitos) individual ou de interação entre eles. No final desta estratégia, pode-se realizar um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para elaborar o modelo preditivo (RODRIGUES, 2010). Portanto, no presente trabalho, três estratégias de planejamentos experimentais seqüenciais foram adotadas a seguir.

4.6.1 Avaliação da influência dos componentes do meio de fermentação na obtenção de ácido sucínico, através de Planejamento Experimental Fatorial Fracionado

Inicialmente, foi realizado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionário PFF 2^{4-1} (8 experimentos com adição de dois pontos centrais) para verificar o efeito estimado dos

seguintes componentes do meio de fermentação sob obtenção de ácido succínico: $NaHCO_3$, extrato de levedura, K_2HPO_4 e $MgS0_4$, conforme mostra a Tabela 4.6.

O meio de fermentação foi inoculado, depois de esterilizado, com 10% (v/v) de inóculo e incubado em Shaker, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 37ºC, por aproximadamente 24 horas. O pH foi ajustado para 7,0 mediante uso de solução de NaOH 0,1 M e a concentração da fonte de carbono foi igual a 20 g/L.

Tabela 4.6. Parâmetros e níveis usados no Planejamento Experimental Fatorial Fracionário PFF 2^{4-1}, com concentração inicial de 20 g/L para glicose e xilose respectivamente.

Parâmetros (g/L)	**Níveis**	
	Inferior	**Superior**
K_2HPO_4	0.0	10.0
$MgSO_4$	0.0	2.0
Extrato de levedura	0.0	5.0
$NaHCO_3$	0.0	10.0

O planejamento fatorial fracionado geralmente é escolhido por ser o mais apropriado na determinação dos efeitos lineares das variáveis, sendo os efeitos da curvatura e das possíveis interações excluídos da análise estatística. Porém, o fracionamento do planejamento experimental e a redução do número de experimentos realizados acarretam perdas quanto à análise da influência de interações entre as variáveis de estudo sobre a resposta de interesse (BRUNS, 1995). Dessa forma, em uma segunda estratégia, o planejamento experimental composto central (DCCR – delineamento composto central rotacional) foi necessário para visualização da curvatura com valor de máximo absoluto.

4.6.2. Planejamento Composto Central Rotacional

Nesta etapa, além dos níveis inferiores e superiores apresentados na matriz usada no Planejamento Experimental Fatorial Fracionário PFF 2^{4-1}, foram feitos o acréscimo dos pontos axiais (-α e + α), conforme mostra a Tabela 4.7, para obtenção da curvatura de máximo absoluto. Em seguida, foi realizado um estudo de otimização das condições de processo (pH, agitação, temperatura), para posterior validação dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais, em biorreator instrumentado.

Tabela 4.7. Parâmetros e níveis usados no Planejamento Composto Central Rotacional e para otimização produção de ácido succínico.

Parâmetros (g/L)	Níveis				
	Axial	**Inferior**	**CP**	**Superior**	**Axial**
	-α	-	0	+	+α
K_2HPO_4	2.5	5.0	7.0	10.0	12.5
$MgSO_4$	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
xtrato de levedura	0.0	1.0	3.0	5.0	7.0
$NaHCO_3$	1.5	5.0	10.0	15.0	20.0

4.6.3. Otimização das condições de cultivo do processo de fermentação através de um Planejamento Fatorial Fracionário

Nesta etapa do trabalho foram utilizadas condições semelhantes aquelas estudadas por Gonzales *et al*. (2008), com acréscimo de experimentos envolvendo a xilose como fonte de carbono, concomitante aos ensaios conduzidos a partir de glicose. Logo, para verificar a influência das variáveis: concentrações de glicose e xilose; extrato de levedura, temperatura, pH inicial e agitação, sob a concentração final de ácido succínico, foi utilizado um Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} (com adição de três réplicas no ponto central, totalizando 19 ensaios). Na Tabela 4.8 são mostrados os níveis reais e codificados das várias estudadas nesta etapa da pesquisa.

Tabela 4.8. Variáveis analisadas no planejamento fatorial fracionário e seus respectivos níveis codificados e reais.

Variáveis	Níveis		
	-1	**0**	**+1**
Extrato de Levedura (g/L)	5	8	11
Glicose e xilose (g/L)	20,0	30,0	40,0
Temperatura (ºC)	32	37	42
pH inicial	6	7	8
Agitação (rpm)	100	200	300

4.6.4. Análise estatística

Os efeitos estimados das variáveis e condições de processo sobre a concentração final de ácido succínico (variável de resposta) foram analisados em um intervalo de 90% de confiança, mediante a Análise de Variância (ANOVA), Diagrama de Pareto e Metodologia de

Superfície de Resposta (MSR), através do Software Statistic 5.0 (Statsoft Inc. 2335, Easth 13th Street Tusla, OK, 74104, USA), segundo BOX & HUNTER (1978).

4.7. Fermentação em biorreator instrumentado a partir de meio sintético

Para a realização das fermentações sob condições controladas foi utilizado um biorreator do modelo Biostat® (B. Braun Biotech International - Alemanha), agitado mecanicamente (Figura 4.5), empregando um vaso reacional de 2L, contendo 600 mL de meio de fermentação. Os experimentos conduzidos em batelada foram controlados automaticamente a uma temperatura de 37ºC, agitação de 150 rpm, e pH 7,0 monitorado utilizando-se um eletrodo de pH esterilizado e controlado mediante a adição de NaOH (2M) ou HCL (2M). Adicionalmente, um segundo processo de fermentação em biorreator foi conduzido, sob as mesmas condições, para avaliar a influência do suprimento externo de CO_2, através de uma distribuição constante de fluxo a 0,05 vvm. A operação em batelada foi conduzida com as variáveis significativamente mais favoráveis à produção de ácido succínico, de acordo com os experimentos em frascos agitados. O meio de fermentação (Tabela 4.9), foi preparado com 22, 52 e 80 g/L de xilose, simulando os valores de concentração utilizadas condução dos experimentos de fermentação em meio contendo hidrolisado. Para o início do processo foram inoculadas aproximadamente 3,0 g/L de células concentradas, após centrifugação (6000 rpm/ 10 min) e separação do sobrenadante.

Figura 4.5. Biorreator BIOFLO III (*New Brunswick*) utilizado na produção de ácido succínico

Tabela 4.9. Composição do meio de fermentação, após estudos de otimização

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	5.0
$MgSO_4$	3.0
$NaHCO_3$	10.0
K_2HPO_4	1.5

* As concentrações de xilose para cada ensaio foram: 22,0; 52.0 e 80,0 g/L.

4.8. Fermentação em biorreator instrumentado a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar

4.8.1. Pré-tratamento ácido

O Bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi cedido pela Destilaria Costa Pinto (SP-Brazil). Inicialmente, uma etapa de pré-tratamento ácido foi realizada para desorganizar a matriz lignocelulósica e remover a fração hemicelulósica. As condições para a realização do pré-tratamento ácido foram às seguintes: H_2SO_4, 1,09% (v/v); relação sólido-líquido 1:2.8 (g/ml) e temperatura de exposição do bagaço de 121°C, durante 27 minutos em autoclave (BETANCUR, 2010). O hidrolisado, licor resultante deste processo (hemicelulose), foi separado utilizando uma prensa hidráulica, e seu pH foi corrigido para 6,5 mediante a adição de $Ca(OH)_2$ (13,12 mg/mL) sob banho de água e gelo para evitar o aquecimento gerado em excesso, durante este procedimento. Em seguida, a solução foi filtrada (vácuo) para retirar o precipitado formado, resultando no material desejado para ser utilizado como base do meio de fermentação (FOGEL, 2005). As etapas descritas para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico pode ser visualizadas na Figura 4.6.

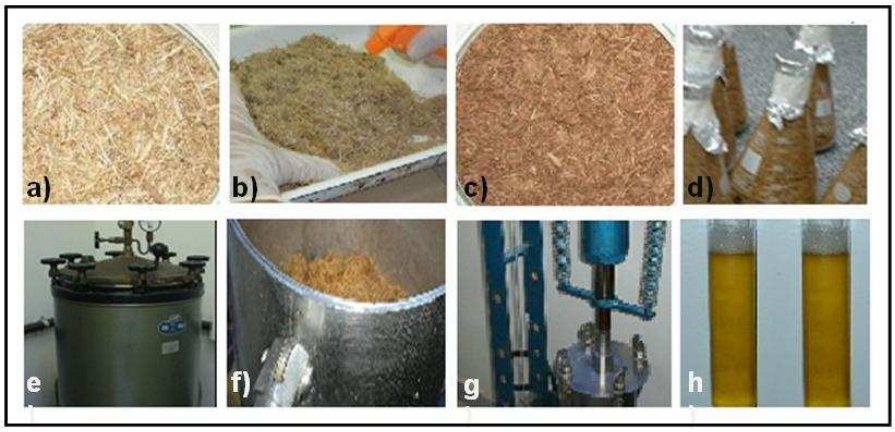

Figura 4.6. Etapas do pré-tratamento ácido: Bagaço in natura (a), Exposição do bagaço ao ácido (b,c), Distribuição em frascos (d), Tratamento térmico em autoclave (e), Distribuição em prensa hidráulica (f), Prensagem para separação do bagaço acidificado (celulignina) (g) da fração hemicelulósica (h).

4.8.2. Fermentação em biorreator instrumentado

As células foram crescidas em meio de ativação, seguindo a metodologia de aclimatação em duas etapas, descrita anteriormente. O processo foi conduzido em um biorreator do tipo BIOFLO III, com 600mL de meio de fermentação contendo os nutrientes necessários para fermentação, com exceção da xilose, que foi incorporada com a fração hemicelulósica do bagaço-de-cana, derivada da etapa de pré-tratamento ácido. Os ensaios foram desenvolvidos com 25%, 50% e 75% de hidrolisado, resultando em concentrações

iniciais de xilose de aproximadamente 22, 52 e 80 g/L, respectivamente. As condições de processo (agitação, temperatura, pH, composição de nutrientes e suprimento externo de CO_2) foram as mesmas descritas anteriormente (meio sintético). O inóculo foi obtido com uma concentração inicial de aproximadamente 3,0 g/L, após metodologia de aclimatação de células em duas etapas, em hidrolisado.

4.9. Experimentos empregando a estratégia SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

A fração sólida residual da hidrólise ácida de bagaço de cana possui um alto conteúdo de celulose que pode ser utilizada para a obtenção de ácido succíno por fermentação, mediante técnicas que possibilitem o aproveitamento de glicose contida no resíduo. Entre as técnicas que poderiam ser avaliadas encontrem-se a hidrólise enzimática e a aplicação do processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

4.9.1. Pré-tratamento alcalino

A celulignina, resultante da metodologia para obtenção de hemicelulose, foi submetida à deslignificação mediante tratamento alcalino, com 4% de NaOH e uma relação sólido-líquido 1:20, seguido de tratamento térmico a 121°C, durante 30 minutos em autoclave, conforme mostra a Figura 4.7 . Lavagens Seqüências de lavagens com água destilada foram feitas, garantindo a eliminação parcial da lignina, gerando a celulignina parcialmente deslignificada (VÁSQUES, 2007).

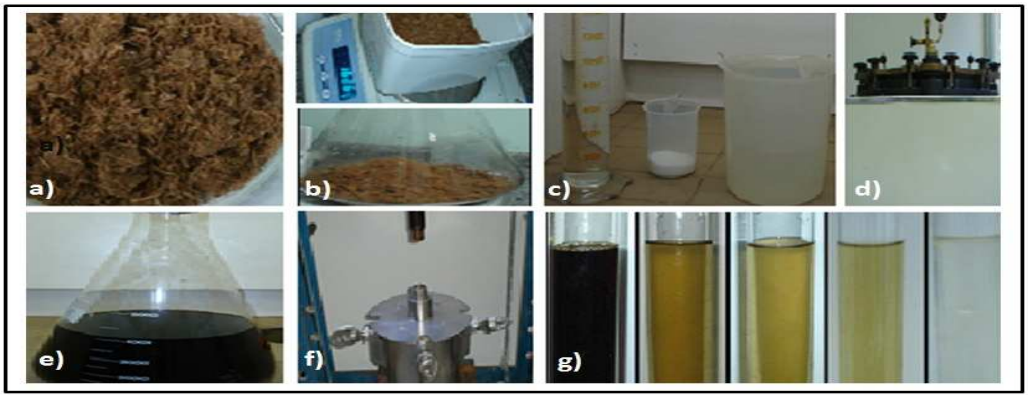

Figura 4.7. Etapas do tratamento alcalino: Celulignina sendo pesada (a,b); Tratamento alcalino com NaOH diluído (c); Tratamento térmico em autoclave (d); Celulignina obtida/licor alcalino (e); Separação em prensa hidráulica(f), Sequência de lavagens até clarificação da água utilizada para remoção da lignina (h).

4.9.2. Pré-hidrólise enzimática

A celulignina parcialmente deslignificada foi submetida à hidrólise enzimática através de preparados comerciais (Multifect, Genencor, USA), para facilitar o acesso à celulose. Com este procedimento, foi possível promover a lise da molécula da celulose para a geração da glicose. O experimento foi desenvolvido utilizando-se uma atividade enzimática de 25 FPU/g, sob temperatura constante de 50°C, relação sólido-líquido 3:10 durante 12 horas (SANTOS, 2009). As Figuras 4.8 e 4.9 apresentam a celulignina seca obtida após a deslignificação; após a adição da enzima e o meio obtido após o período de pré-hidrólise enzimática.

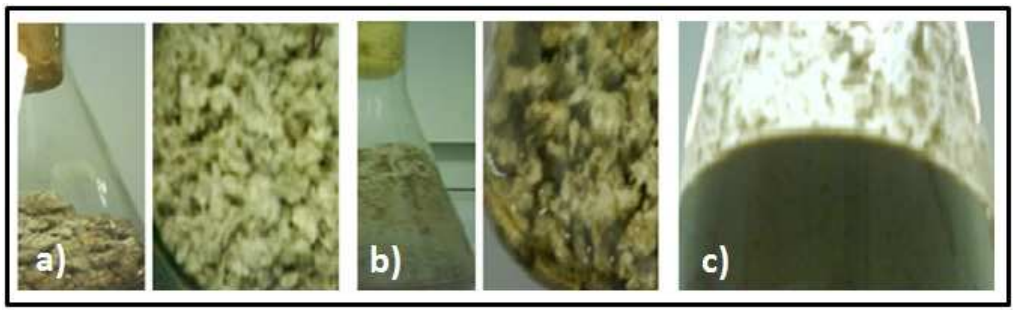

Figura 4.8. Aspecto da celulignina após a deslignificação (a); após a adição de enzimas e meio (b) e aspecto após a pré-hidrólise enzimática em frascos agitados (c).

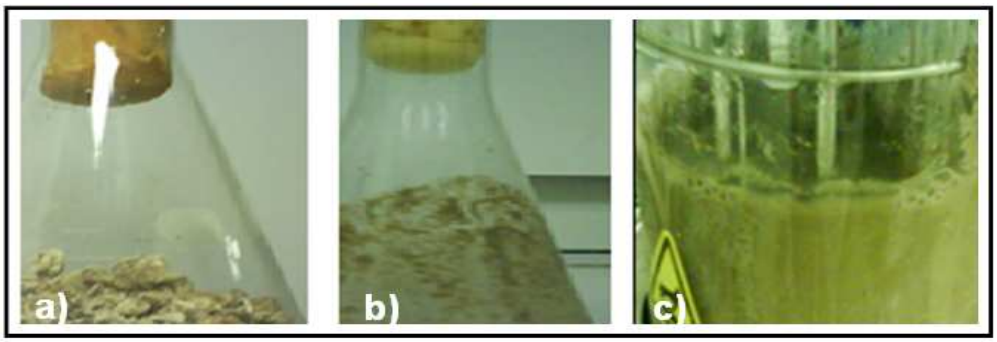

Figura 4.9. Celulignina após deslignificação (a), após a pré-hidrólise em frascos (b) e após a pré-hidrólise enzimática em biorreator (c).

Após o tratamento químico do bagaço-de-cana e do pré-tratamento enzimático, que resultou em aproximadamente 75,0 g/L de glicose, a cinética do processo *SSF* foi avaliada em frascos agitados, por 24-48 horas de fermentação, sob 150 rpm e 37ºC. Sem o número de fatores suficientes (mínimo de 3) para gerar os pontos centrais de um planejamento, não há como calcular o impacto das variáveis sobre as respostas, obtido pela distribuição de freqüência, necessária para obtenção de uma superfície de resposta (RODRIGUES, 2010). Dessa forma, foram adotadas as condições otimizadas por SANTOS (2009), para obtenção de aproximadamente 75 g/L de glicose e, em seguida, os ensaios em frascos agitados foram

operados com variação da concentração (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g/L), para avaliação da concentração final de ácido succínico e, posterior validação em biorreator.

4.9.3. Processo SSF em biorreator

Os ensaios de fermentação foram realizados em biorreator (BIOFLO III, New Brunswick), com volume nominal de 1,5 L. O processo foi operado com um volume de meio para fermentação de 600 mL, sob as mesmas condições anteriores, após inoculação de aproximadamente 3,0 g/L de células.

Adicionalmente, foi realizada uma fermentação em meio sintético visando padronizar uma referência de comparação com o processo SSF. Neste caso o meio de fermentação foi preparado simulando a composição em glicose obtida após a pré-hidrólise enzimática, de aproximadamente 81 g/L. A composição de meio utilizado, a exemplo da fermentação a partir do hidrolisado, foi previamente otimizado por planejamento experimental DCCR para glicose como fonte de carbono, resultando na mesma composição anterior: K_2HPO_4, 5.0 g/L; $MgSO_4$, 2.0 g/L, extrato de levedura, 3.0 g/L e $NaHCO_3$; 10 g/L. Cabe ressaltar que todos os experimentos através do processo SSF foram conduzidos com fluxo contínuo de suprimento externo de CO_2 meio de fermentação, a 0,05 vvm.

4.10. Desenvolvimento de um modelo para produção de ácido succínico

Os estudos preliminares desenvolvidos nesta etapa visaram o desenvolvimento de modelos determinísticos para representar o processo biotecnológico da síntese de ácido succínico, bem como elucidar os estudos do comportamento cinético do processo, identificar os parâmetros mais relevantes, com a finalidade de apresentar uma metodologia mais segura e eficiente a partir da linhagem selecionada, em trabalhos futuros (SCHMIDELL *et al*., 2001)

Inicialmente, mediante pesquisa bibliográfica, um modelo não estruturado do processo de fermentação de ácido succínico foi identificado para a linha *M. succiniciproducens* (SONG *et al*., 2008). O modelo encontrado foi utilizado no presente trabalho, para a linhagem *A. succinogenes* e os resultados foram comparados com a literatura.

Fermentações em diferentes concentrações iniciais de glicose foram conduzidas e os dados experimentais usados para estimar os parâmetros cinéticos preditos. Segundo Lunelli & Maciel (2007), a partir do estudo do modelo simplificado é possível obter o perfil de concentração apenas dos principais componentes do processo, como o crescimento celular, substrato consumido e produto(s) formado(s). Em seguida, os parâmetros operacionais obtidos com o modelo foram analisados e, comparados com os dados experimentais. Para a

resolução das equações diferenciais ordinárias do modelo foi usado, a exemplo dos modelos encontrados na literatura, o método de Runge-Kutta de 4ª ordem (LUNELLI & MACIEL, 2007).

4.10.1. Identificação dos parâmetros cinéticos

A síntese de ácido succínico, a partir de glicose, via rota biotecnológica se apresenta como uma heterofermentação. Portanto, um modelo não estruturado simples pode ser considerado para a obtenção dos parâmetros cinéticos (HYOHA & SEE, 2007). Os experimentos para o cálculo da taxa de crescimento específico máximo foram realizados mediante variação na concentração inicial de substrato, iguais a 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 70,0. Os dados experimentais foram usados para o cálculo de parâmetros cinéticos e o comportamento desenvolvido pela linhagem *A. succinogenes* durante a fermentação foi predito através do modelo proposto, e então comparados com os dados resultantes dos experimentos. De acordo com Bailey & Olis (1986), a cinética da fermentação pode ser descrita através da taxa de crescimento celular (r_X), taxa de formação de produto (r_P), e taxa de consumo de substrato (r_S). Considerando o efeito de inibição sobre o crescimento da bactéria *A. succinogenes* em excesso de substrato, o modelo de Monod que geralmente é usado para representar o crescimento microbiano sob condições de substrato limitante, pode ser modificado, a exemplo dos estudos de de Song *et al*. (2008), resultando na seguinte expressão:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{(S + K_S + (S^2 / K_I))} \qquad \text{(Equação 4.1)}$$

Onde,
μ_m : taxa de crescimento específico máximo (h^{-1}),
S : concentração de substrato (g/L),
K_S : constante de saturação do substrato (g/L),
K_I : constante de inibição do substrato (g/L)

Em determinados sistemas, o microrganismo pode sofrer uma inibição de forma gradual em seu crescimento devido a formação de produtos (HA *et al*., 2003; GE *et al*., 2006). Sendo assim, a equação 4.1 não pode ser aplicada, pois a formação de ácidos oriundos do metabolismo celular, em concentrações críticas, pode promover o declínio e/ou morte celular (KONG *et al*., 2006; vanNIEL *et al*., 2003). Uma equação não linear sugerida por LEVENSPIEL (1980), pode representar matematicamente essa dependência do crescimento celular com o produto formado.

Dessa forma, para valores de P< P_{CRIT}, a equação anterior pode ser representada da seguinte maneira:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{(S + K_S + (S^2 / K_I))} \times \left(1 - \frac{P}{P_{CRIT}}\right) \qquad \text{(Equação 4.2)}$$

E para valores de P ≥ P_{CRIT}, é válido a seguinte expressão:

$$\mu = -K_d, \qquad \text{(Equação 4.3)}$$

Onde,
μ_m : taxa de crescimento específico máximo (h^{-1}),
S : concentração de substrato (g/L),
P : soma das concentrações dos produtos (g/L),
P_{CRIT} : soma das concentrações críticas dos produtos na qual o crescimento celular cessa totalmente (g/L),
Kd : taxa específica de morte (h^{-1}), e
X : concentração de biomassa (g/L).

A bactéria *A. succinogenes* produz o ácido succínico como produto principal na fermentação e, simultaneamente, formam-se os ácidos acético, fórmico e lático como subprodutos (GUETLER *et al*., 1999). Considerando a soma dos produtos formados e valores de P > P_{CRIT}, de acordo com a equação anterior, o perfil cinético o crescimento pode ser representado através das seguinte expressão:

$$r_X = \left[\frac{\mu_m S}{(S + K_S + (S^2 / K_I))} \times \left(1 - \frac{P}{P_{CRIT}}\right)\right] X \qquad \text{(Equação 4.4)}$$

E considerando valores de P ≥ P_{CRIT}, a expressão para o perfil cinético de crescimento pode ser representado através da maneira:

$$r_X = -K_d X \qquad \text{(Equação 4.5)}$$

Onde, r_X é a taxa de formação de biomassa (g/L.h) e, *X* é a concentração de biomassa (g/L).

A formação dos ácidos succínico, acético, fórmico e lático pode ser descrita pelo modelo de Luedeking-Piret (KHAN *et al*., 2005), que mostra a relação dependente entre a taxa de formação de produto com r_X e X, a seguir:

$$r_P = \alpha_P r_X + \beta_P X \qquad \text{(Equação 4.6)}$$

Onde r_P denota a taxa de formação do produo(s), dado em g/L.h; α representa o parâmetro que está associados ao crescimento celular para formação de produto e β o parâmetro de perfil não-associados ao crescimento.

Sabe-se que o substrato utilizado (glicose) é convertido para formação de biomassa, produtos e também parte é direcionada para a manutenção energética da célula. Logo, a partir de um balanço de massa de carbono, a taxa de consume de substrato, pode ser obtida através da seguinte expressão:

$$-r_S = \frac{1}{Y_X} r_X + \frac{1}{Y_{AS}} r_{AS} + \frac{1}{Y_{AA}} r_{AA} + \frac{1}{Y_{AF}} r_{AF} + \frac{1}{Y_{AL}} r_{AL} + m_S X \qquad \text{(Equação 4.7)}$$

Sendo, $-r_S$ é a taxa de consumo de substrato (glicose), dado em g/L.h; Y_X, Y_{SA}, Y_{AA}, Y_{FA}, e Y_{LA} são os coeficientes estequiométricos de rendimento e substrato em biomassa e em ácidos succínico, acético, fórmico e lático, dados em g/g; m_S é o coeficiente de manutenção energética específica, dado em g/g.h. É válido ressaltar que, quanto mais distante a célula estiver do ótimo fisiológico para execução das funções metabólicas, maior será o requerimento de energia necessária para a manutenção celular (PEREIRA JR., 2008).

4.10.2. Modelo proposto para obtenção dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos dos modelos foram determinados através de uma expressão chamada Função Objetivo Z para garantir o minímo de erros possíveis, a partir dos dados experimentais obtidos através das fermentações conduzidas com a linhagem *A. succinogenes* (LUNELLI & MACIEL, 2007; SONG *et al*., 2008)

$$Z_X = \sum_{j=1}^{n} \left(X_{j.\exp} - X_{j.sim} \right)^2, \quad Z_P = \sum_{j=1}^{n} \left(P_{j.\exp} - P_{j.sim} \right)^2, \quad Z_S = \sum_{j=1}^{n} \left(S_{j.\exp} - S_{j.sim} \right)^2, \qquad \text{(Eq. 4.8)}$$

Cabe ressaltar que, os termos de Z representam as diferenciações quadráticas entre os dados experimentais (exp) e os simulados (sim) para os perfis cinéticos de crescimento celular (Z_X), produto (Z_p), e substrato (Z_s), respectivamente. O índice j quantifica o número de pontos dos dados experimentais.

Para facilitar a integração das equações do modelo, foi utilizado o método de Runge Kutta de 4ª ordem, contido na biblioteca IMSL, rotina DBCONF do *software* FORTRAN (LUNELLI & MACIEL, 2007) .

4.11. Amostragem

Em todos os experimentos foram retiradas alíquotas de 2 mL, em média, a cada três horas, com auxílio de pipetas estéreis do mesmo volume. As amostras eram centrifugadas a

12000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante destinado para dosagens de açúcares e produtos, após de filtração em membrana de celulose com uma porosidade de 0,22 μm.

O sedimentado foi lavado e completado até 2 mL com água destilada e homogeneizado em agitador tipo vortex, para promover a ressuspensão das células antes da quantificação. Todos os procedimentos de amostragem foram conduzidos com rigor asséptico, em cabine de fluxo laminar. A Figura 4.10 apresenta um diagrama de blocos com a metodologia utilizada para o processamento das amostras.

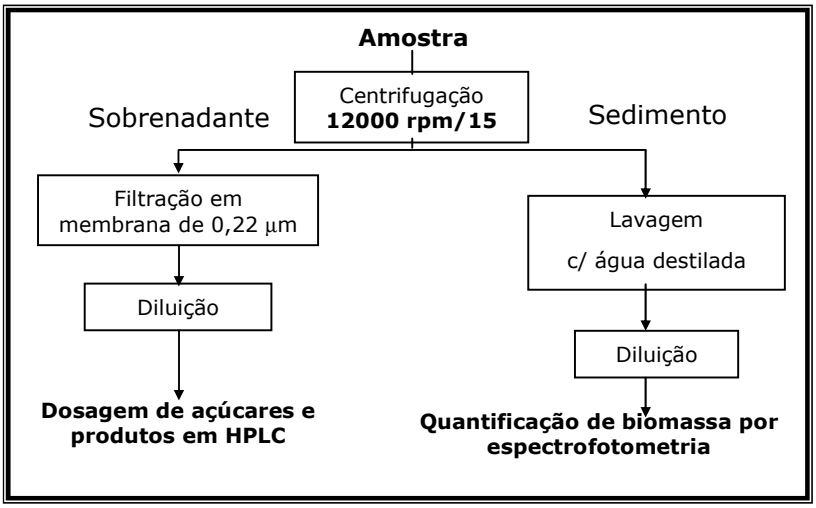

Figura 4.10. Diagrama de blocos para o tratamento das amostras.

4.12. Métodos Analíticos

4.12.1. Determinação de biomassa

A concentração de massa celular foi acompanhada por espectrofotometria a 600 nm (LEAL, 1998). Inicialmente, uma curva padrão correlacionando o peso da massa seca das células com a absorvância foi construída. As células utilizadas na construção da curva padrão foram cultivadas em frascos cônicos de 100 mL contendo 20 mL de meio de ativação, a 37°C em agitador rotatório a 150 rpm. Após 24 horas de incubação, as células foram colhidas, lavadas e resuspensas em água destilada. A determinação da concentração das células foi realizada filtrando 20 mL da suspensão, por filtração a vácuo, cujo procedimento foi desenvolvido em triplicata. A pesagem dos filtros, contendo a biomassa retida, foi realizada até a obtenção de peso constante durante secagem a 80°C, em balança de infravermelho.

A curva de calibração para quantificação de biomassa forneceu a concentração de massa celular, através da correlação entre concentração de células seca e absorvância, seguindo a seguinte equação:

$$X=(0,331*Abs)*f_d \qquad \text{(Equação 4.9)}$$

Onde,

X = concentração celular em peso seco (g/L) a 600 nm;
Abs = absorvância em 600 nm;
f_d = fator de diluição empregado na solução.

4.12.2. Determinações quantitativas

Inicialmente, a concentração de glicose e sacarose residual foram medidas no sobrenadante livre de células pelo método oxidase-peroxidase utilizando um kit enzimático (Laborclin, Pinhais, Brazil), e uso de curva padrão. A concentração de xilose residual dos experimentos foi determinada pelo método colorimétrico de Somogyi-Nelson, SOMOGY (1952). A quantificação das amostras, contendo glicose, xilose, arabinose, sacarose, celobiose e etanol, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo 'Waters' (Sistema de bombeamento modelo 510, injetor Rheodyne, detector de índice de refração modelo 410), acoplado a uma coluna de troca catiônica Aminex HPX-87P, fabricada pela Bio-Rad. As condições operacionais utilizadas para as análises encontram-se especificadas na tabela 4.10.

Tabela 4.10. Condições operacionais do cromatógrafo

Fase móvel:	Água MilliQ desgaseificada
Vazão de fase móvel:	0,6 mL/min
Pressão máxima:	2000 psi
Volume de amostra:	5 μL (amostra)
$T_{externa}$:	85°C (forno)
$T_{interna}$:	40°C (detector)

As concentrações de ácido succínico, ácido acético, ácido lático e ácido fórmico (Figura 4.11), foram determinadas por CLAE em cromatógrafo 'Waters' (Sistema de bombeamento modelo 510, injetor Rheodyne), acoplado a uma coluna C18 (250mm x 4,6 mm, 9 µm; StrodsII Peek), com índice de detecção no UV, à 210 nm, própria para quantificação de ácidos orgânicos. As condições operacionais utilizadas para as análises encontram-se na Tabela 4.11..

Tabela 4.11. Condições operacionais do cromatógrafo

Fase móvel:	**100% Tampão Fosfato**
Vazão de fase móvel:	0,9 mL/min
Pressão máxima:	2000 psi
Volume de amostra:	20 µL (amostra)
$T_{externa}$	50°C (forno)
$T_{interna}$	35°C (detector)

Fonte: MARTINS *et al.* (2004).

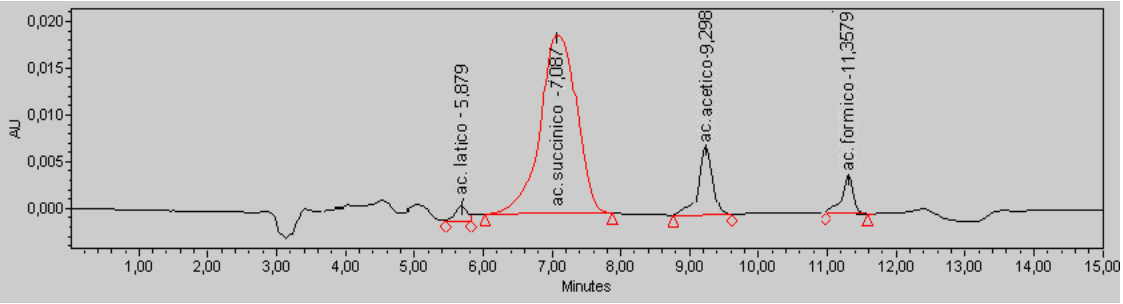

Figura 4.11. Cromatograma típico com identificação dos ácidos orgânicos

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento.

$$Conc.\ da\ amostra = \frac{Área\ da\ amostra \cdot conc.\ do\ padrão}{Área\ do\ padrão} \cdot diluição \qquad \text{(Equação 4.10)}$$

4.12.3. Medida do pH

O pH do meio livre de células foi determinado utilizando o potenciômetro da Marca Digimed, modelo MS-21, na temperatura de 25ºC.

4.13. Avaliação de resultados

4.13.1. Cálculo de eficiência do processo

A eficiência de ácido succínico é medida de acordo com a quantidade de ácido sucínico produzido/1 g de substrato consumido (expressos em porcentagem), a partir do valor de $Y_{p/s}$ teórico para *A. succinogenes.* Para cada 1 mol de substrato são produzidos 1,714 mols de ácido succínico (LIU *et al.,* 1999). Logo, a partir da razão 1,714 x $MM_{AS}/MM_{SUBSTRATO}$, têm-se o rendimento máximo teórico.

Cálculo de eficiência :

$$Ef = \frac{Y_{P/S}(processo)}{Y_{P/S}(Teórico)} x100 \qquad \text{(Equação 4.11)}$$

Onde, $Y_{p/s}$ (Teórico) para glicose = 1,12 $g.g^{-1}$,

$Y_{p/s}$ (Teórico) para xilose = 1,34 $g.g^{-1}$

(MM_{Gl}) Massa molecular da glicose = 180 g

(MM_{Xl}) Massa molecular da xilose = 150 g

(MM_{AS}) Massa molecular do ácido succínico = 118,09 g

4.13.2. Taxa instantânea específica de crescimento microbiano

Durante o intervalo de tempo (*dt*), o aumento de números de microrganismos (*dx*), na fase exponencial, onde as células absorvem os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando, pode ser representado por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \Rightarrow \mu = \frac{1}{X}.\frac{dX}{dt} \Rightarrow \mu = d.\frac{LnX}{dt}\left[T^{-1}\right] \qquad \text{(Equação 4.12)}$$

Onde: μ é a taxa instantânea específica de crescimento por unidade de tempo = μ_x (taxa específica de crescimento, na fase exponencial). Ao plotar o gráfico Ln X versus Tempo, a tangente a cada ponto da curva obtida fornece o valor de μ, durante a fase exponencial de crescimento. Analogamente, as taxas específicas para formação de produto e consumo de substrato, em g/g.h, são representados por:

$$q_p = \frac{1}{X}.\frac{dP}{dt} \quad \text{e} \quad q_s = -\frac{1}{X}.\frac{dS}{dt} \qquad \text{(Equação 4.13)}$$

Os valores das taxas de crescimento celular (r_x), de consumo de substrato (r_g), formação dos ácidos succínico (r_s), ácido acético (r_a) e ácido fórmico (r_s), foram obtidas plotando-se a concentração celular, substrato ou produto com o tempo.

4.13.3. Tempo de duplicação

Tempo de geração (tg) que é o tempo de duplicação da massa celular pode ser representado por:

$$Ln\ 2X_0/X_0 = \mu_x\, t_g \Rightarrow t_g = Ln\ 2 / \mu_m \Rightarrow \mathbf{t_d} = 0{,}693/\ \mu \qquad \text{(Equação 4.14)}$$

4.13.4. Variáveis de Resposta

Os parâmetros próprios de processos de fermentação foram considerados da seguinte forma:

a) Fator de rendimento de produção de ácido succínico (g/g)

$$Y_{P/S} = -(\Delta P/\Delta S) = (P - P_o)/(S_o - S) \qquad \text{(Equação 4.15)}$$

Sendo:

P: Concentração final de ácido succínico (g/L)
P_o: Concentração inicial de ácido succínico (g/L)
S: Concentração final de substrato (g/L)
S_o: Concentração inicial de substrato (g/L)

b) fator de rendimento para crescimento celular (g/g)

$$Y_{X/S} = -(\Delta X/\Delta S) = (X - X_o)/(S_o - S) \qquad \text{(Equação 4.16)}$$

Sendo:

X: Concentração final de biomassa (g/L)
X_o: Concentração inicial de biomassa (g/L)
S: Concentração final de substrato (g/L)
S_o: Concentração inicial de substrato (g/L)

c) Produtividade volumétrica (g/L.h)

$$Q_P = (P - P_o)/t_f \qquad \text{(Equação 4.17)}$$

Sendo:

P: Concentração final de ácido succínico (g/L)
P_o: Concentração inicial de ácido succínico (g/L)
t_f: Tempo de fermentação (h)

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo foi destinado à exposição e discussão dos resultados, obtidos a partir da conclusão dos experimentos planejados para elaboração da tese. Nos estudos sobre a otimização dos parâmetros operacionais, foram desenvolvidos planejamentos experimentais sequenciais e os efeitos de impacto sob a variável de resposta foram analisados a partir de metodologias de superfície de resposta (MSR), definindo as condições ótimas para a condução do processo. Para finalizar, foram iniciados estudos preliminares de modelagem, através de analogias abstratas que possibilitam a predição de fenômenos inerentes ao processo, como a inibição pelo substrato e pelo produto. Para visualizar os estudos acerca do modelo gerado, os perfis cinéticos para o consumo de substrato, formação de produto e o crescimento celular foram apresentados.

5.1. Levantamento de informações e panorama geral das pesquisas sobre ácido succínico

A partir de pesquisas realizadas pela base de dados do software *SciFinder*, que inclui modelos de estrutura química e pesquisas pela combinação e reação entre elementos, que podem ser empregados para verificar informações em atividades de pesquisa, na pós-graduação, um levantamento de informações pertinentes foram sumarizadas na presente seção. Ao utilizar o software, foram encontradas 212 referências correlacionando o termo "ácido succínico" com "*Actinobacillus succinogenes" e,* 110 especificamente, sobre a "produção de ácido succínico".

A Figura 5.1.mostra que o número de depósitos de patentes, sobre a produção de ácido succínico, até 2009 ainda é relativamente baixo, enquanto o número de trabalhos publicados aumentou exponencialmente nos últimos quatro anos.

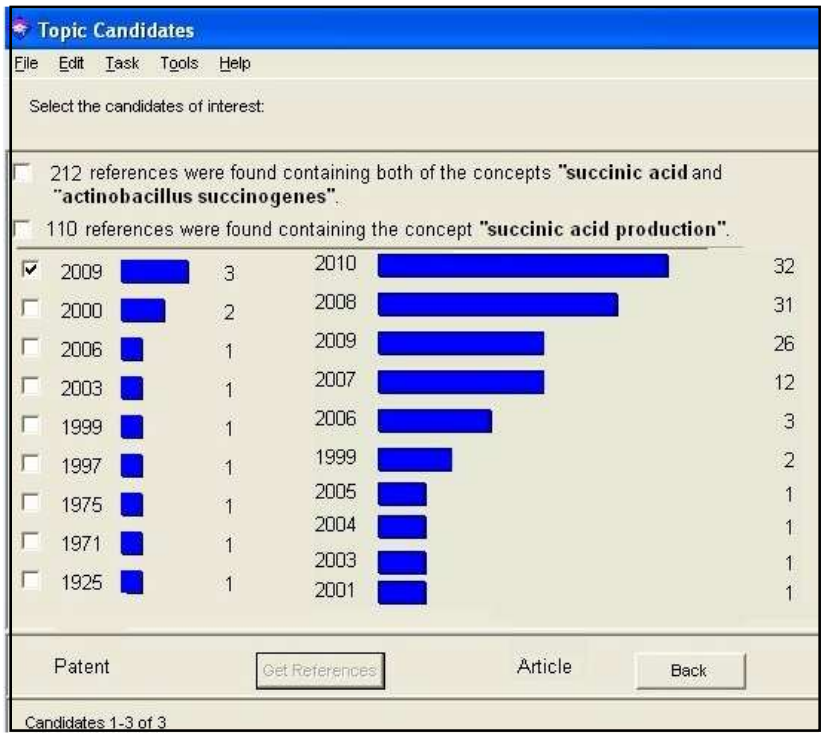

Figura 5.1. Número de patentes (*Patent*) e Trabalhos publicados (*Article*), sobre a produção de ácido succínico, até o ano de 2010. Fonte: *ScienceFinder* (2011)

Em 2003, foi depositada a primeira patente abordando o tema "aproveitamento de materiais lignocelulósicos", com os resultados obtidos por LEE *et al.* (2003). Em 2006, os estudos envolvendo o uso de microrganismo geneticamente modificado (*E.coli*), para produção de ácido succínico, foram patenteados por BENNET *et al.* (2006). Em 2009 podem ser encontrados os trabalhos patenteados por LAURENTE & BENNET (2009), que apresentaram um *review,* abordando os diversos processos já estudados para a produção de ácido succínico; os resutados obtidos por LEE *et al.* (2009), onde foram realizadas

modificações genéticas em *M. succiniproducens* e, também, o trabalho envolvendo estudos de mutação com *Sacharomyces cerevisiae* e *Aspergilus Níger* por RENE *et al*. (2009).

A Figura 5.2 mostra que a maioria dos trabalhos foi publicada nos seguintes periódicos, em ordem decrescente: *Applied Microbiology and Biotechnology* (15), *Applied Biochemistry Biotechnology* (11) e *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* (9), que inclui uma das publicações do presente trabalho.

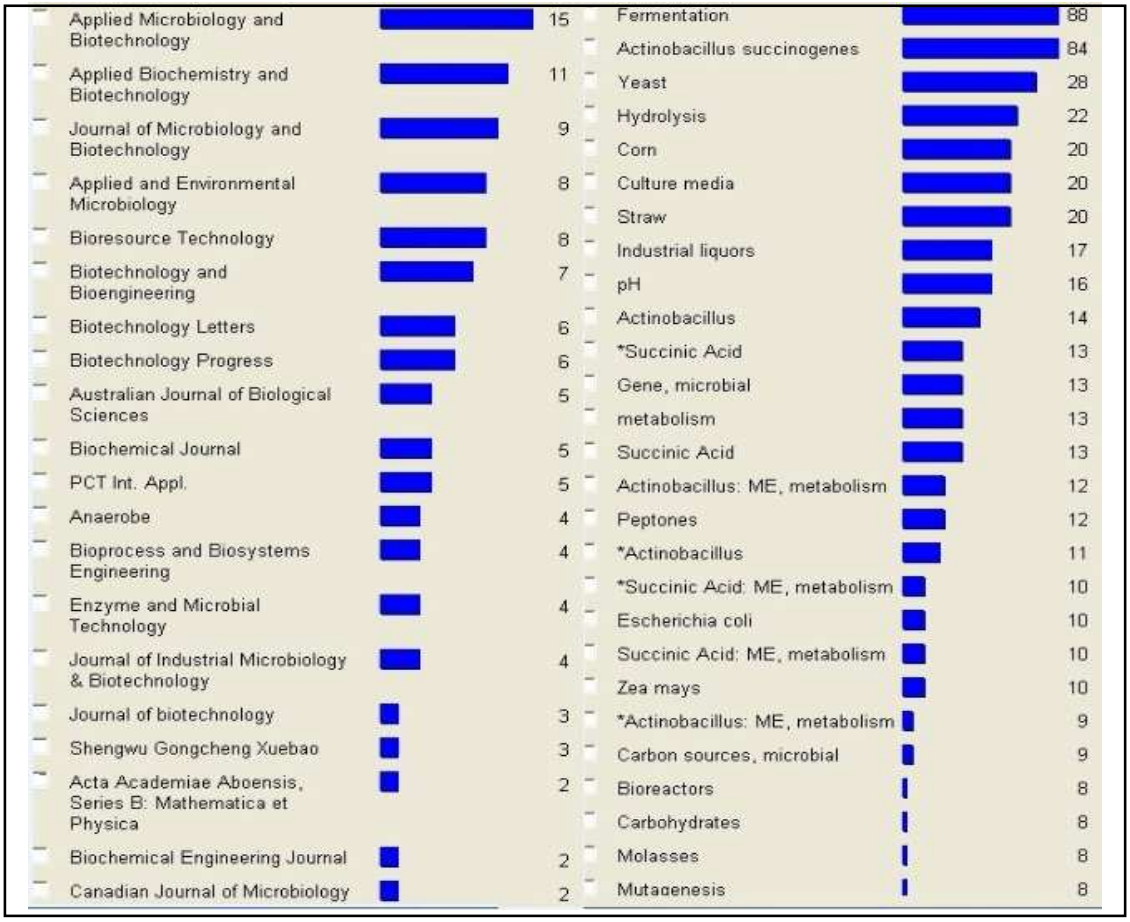

Figura 5.2. Periódicos com maior número de publicações (a) e os temas mais estudados (b), até o ano de 2010. Fonte: *ScienceFinder* (2011)

Entre outras informações, como nome de autores e regiões (países, universidades) com maior quantidade de publicações (artigos, patentes e teses), o *software* também apresenta os temas mais recorrentes acerca desta temática, onde a área de processos fermentativos e o uso de *Actinobacillus succinogenes* encontram-se entre os mais discutidos na literatura.

5.2. Morfologia da linhagem *Actinobacillus succinogenes*

Os experimentos tiveram início após a ativação das células, armazenadas em ampolas de liofilização. Por se tratar de uma linhagem recentemente descoberta (GUETLER *et al*., 1996), as características morfológicas (formato, dimensão e arranjo celular) foram rotineiramente observadas em microscopia, durante os estudos de crescimento celular. Cabe ressaltar, que as observações microscópicas foram efetuadas apenas para motitorar a pureza da cultura, pois o foco do presente trabalho estava voltado para a engenharia do bioprocesso, conforme mencionado anteriormente.

A Figura 5.3a, mostra uma microfotografia de uma colônia de células, mediante o uso da técnica colorimétrica Gram. Através da coloração rosa foi possível confirmar a composição e textura do tipo Gram (-), de acordo com a parede celular da bactéria *Actinobacillus succinogenes* CIP 106512.

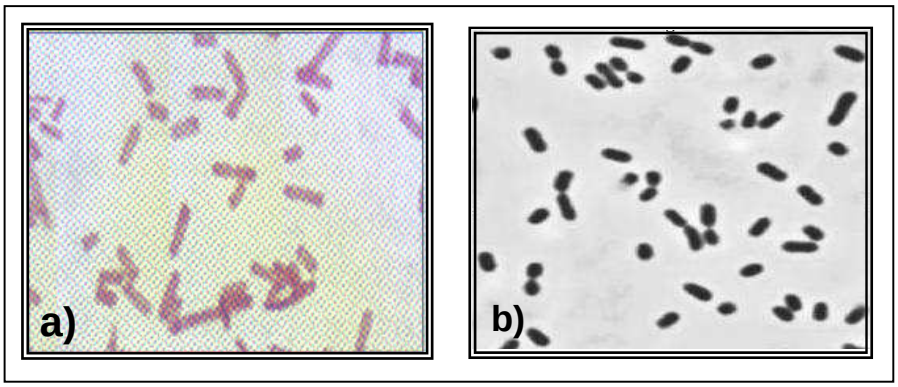

Figura 5.3. Observação microscópica das linhagens com aumento de 1000 vezes. a) *Actinobacillus succinogenes* **CIP 106512**; b) *Actinobacillus succinogenes* **130Z** (DATTA, 1992)

Além da existência de uma camada peptideoglicana, as bactérias Gram (-) apresentam uma membrana externa (lipopolissacarídeos e proteínas) a sua parede celular (TORTORA & FUNKE, 2004). As dimensões de bactérias do genêro *Actinobacillus* variam de 0,4 a 1,0 µm, podendo atingir, ocasionalmente, 6,0 µm quando presentes em um meio contendo glicose, xilose, sacarose ou maltose. Possuem respiração anaeróbica facultativa, com crescimento ideal a 37ºC, podendo apresentar variações quanto a sua morfologia, visualmente esférica, oval ou, de maneira geral, em forma de bacilos (BERGEY & HOLT, 1994).

Tais mudanças morfológicas na bactéria ocorrem de acordo com a fase de crescimento, com formato bacilo na fase lag e exponencial, para formas de espiral na fase de desaceleração do crescimento. DATTA *et al*. (1992) observaram a mesma variação morfológica em estudos realizados com *Actinobacillus succinogenes* 130Z, a partir de glicose como fonte de carbono.

5.3. Padronização da metodologia para ativação celular e preparo de inóculo

A etapa de propagação celular é um procedimento de suma importância para ampliação em escala, durante processos fermentativos. Para evitar o período marcado por uma fase de aclimatação, durante o cultivo de novas células, repiques realizados 24 horas antes de cada experimento foi desenvolvido.

Com o objetivo de padronizar o tempo utilizado em cada uma das etapas de propagação celular (cultura de ativação e obtenção de inóculo) foi realizado o monitoramento das principais variáveis do processo: crescimento celular e concentração de ácido succínico.

5.3.1. Cultivo de ativação em meio sintético

Inicialmente, os ensaios para obtenção de células viáveis (pré-inóculo) foram realizados em meio sintético, conforme mencionado no capítulo anterior. As concentrações da fonte de carbono (glicose), ácido succínico e de biomassa, foram analisadas. Cabe ressaltar, que todos as etapas de pré-inóculo do presente trabalho foram realizadas a partir de glicose, devido a estequiometria para manutenção de potencial redox do metabolismo, garantindo um bom desempenho face ao crescimento celular.

Uma quantidade suficiente de experimentos foi desenvolvida para constatar e padronizar o tempo necessário para o preparo do pré-inóculo. Para garantir uma alta concentração de células e um estado metabólico adequado, foi escolhido um tempo final para o cultivo de ativação de 24 horas para todos os ensaios iniciais. Nesse período as células já alcançavam a fase final da faixa de crescimento exponencial.

De acordo com a Figura 5.4, o tempo de aclimatação (fase lag) foi praticamente inexistente, tendo a concentração celular aumentado com o correspondente consumo de substrato e formação de ácido succínico. Observa-se o esgotamento da fonte de carbono após 15 horas de fermentação, tendo a biomassa se estabilizado em 0,74 g/L e com uma concentração final de ácido succínico de 4,16 g/L.

O tempo de duplicação (Equação 4.17) foi de 3,72 horas e taxa específica de crescimento (μ_x) de 0,186 h^{-1}. Após as 12 horas, a fermentação ficou caracterizada pelas fases de desaceleração e estacionária do crescimento celular, para ambas as fontes de carbono utilizadas.

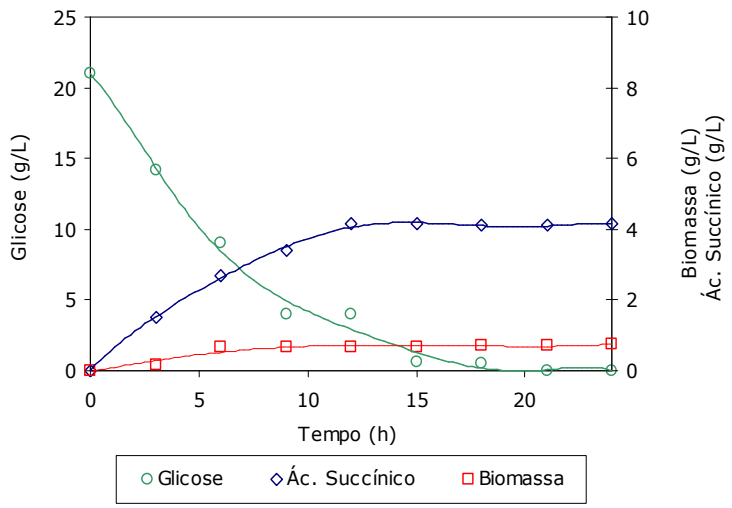

Figura 5.4. Cinética de crescimento do cultivo de ativação da bactéria *A. succinogenes* CIP 106512 em meio sintético, para glicose (20 g/L).

5.3.2. Cultivo de crescimento para obtenção de inóculo

As células ativadas, nas condições descritas anteriormente, foram utilizadas para a obtenção do inóculo. Cabe ressaltar, que dois tipos de meio foram avaliados para essa etapa, um meio que continha xilose comercial (meio sintético) e outro onde foi utilizado hidrolisado hemiceululósico em proporções apropriadas para obter uma concentração de xilose próxima à utilizada no meio sintético (20 g/L).

Cabe ressaltar que a metodologia usada para propagação celular foi realizada de forma semelhante para o uso de glicose, em ensaios paralelos, uma vez que a utilização de celulignina, para obtenção de ácido succínico, também foi investigada no decorrer da tese.

Nas Figuras 5.5 e 5.6 são apresentados os perfis cinéticos do inóculo em meio sintético com 20 g/L de fonte de carbono (xilose e glicose), onde a formação de produto ocorreu de forma associada ao crescimento, para ambos os casos. Nesta etapa, a exemplo do que ocorreu no ensaio anterior, não houve uma fase de aclimatação, sendo também observado um perfil de crescimento exponencial da bactéria desde o início do processo, constatado pela linearização desta fase. Este comportamento é característico de cultivos nos quais as células foram devidamente ativadas, validando-se assim as condições utilizadas para o cultivo de ativação descrito anteriormente.

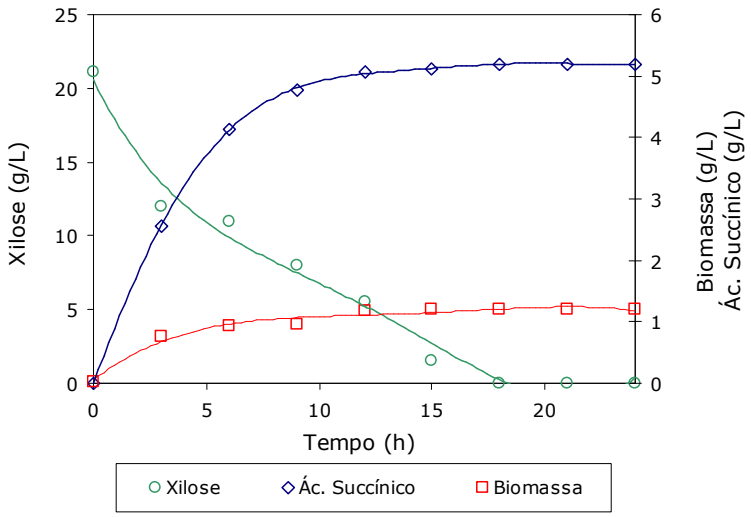

Figura 5.5. Cinética de crescimento do inóculo (*A. succinogenes* CIP 106512) em meio sintético, para xilose (20 g/L)

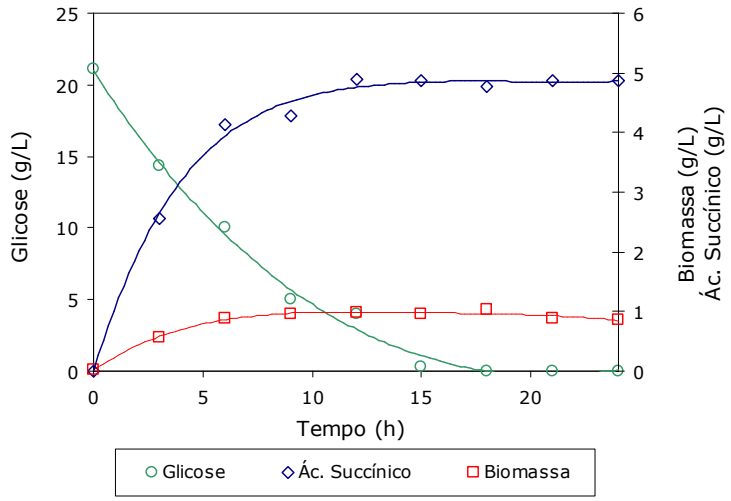

Figura 5.6. Cinética de crescimento do inóculo (*A. succinogenes* CIP 106512) em meio sintético, para glicose (20 g/L)

Em aproximadamente 18 horas de fermentação, a xilose foi totalmente esgotada, com uma concentração de 5,20 g/L de ácido succínico e 1,20 g/L de biomassa. Para o perfil com glicose, a concentração de biomassa se estabilizou em 0,98 g/L, com uma concentração de 4,85 g/L de ácido succínico, em aproximadamente 14 horas de fermentação.

A Figura 5.7 mostra o comportamento observado para o cultivo de inóculo em meio contendo o hidrolisado hemicelulósico diluído, cujo perfil foi semelhante ao obtido anteriormente, porém, o esgotamento de xilose ocorreu de forma mais lenta, sendo consumida em aproximadamente 23 horas de fermentação. De toda forma, os resultados sinalizam para importantes deslocamentos tecnológicos, como o aproveitamento e utilização da fração

hemicelulósica, oriunda do pré-tratamento de biomassa residual de composição lignoeclulósica.

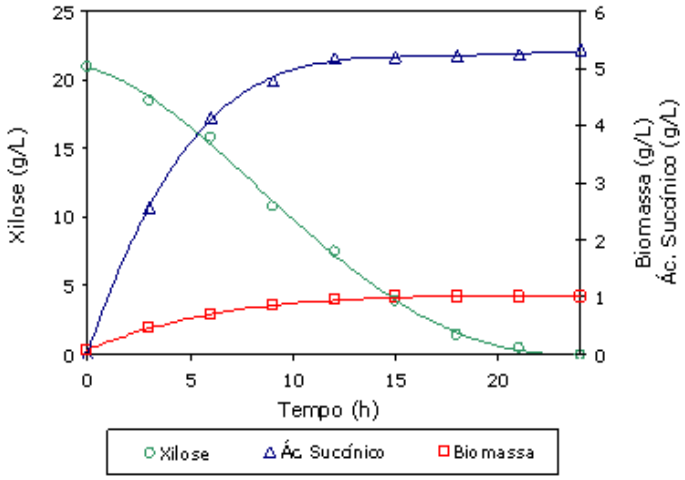

Figura 5.7. Cinética de crescimento do inóculo (*A. succinogenes* CIP 106512) contendo hidrolisado diluído

Para o crescimento celular, também foi observado um tempo maior para atingir a estabilização, de aproximadamente 18 horas. Após esse período as concentrações de ácido succínico e biomassa foram de 5,3 g/L e 1,0 g/L, respectivamente.

Na Tabela 5.1 estão sumarizados os resultados mais relevantes obtidos com o processo do crescimento celular (inóculo), analisados no final da fase exponencial de crescimento, para cada ensaio, durante o processo de fermentação proposto por um período de 24 horas de processo.

Tabela 5.1. Parâmetros relevantes nos processos de propagação de células de *A. succinogenes* CIP 106512 (cultivo de inóculo) obtidos com um tempo total de fermentação de 24 horas.

Processo	S_0 (g/g)	T (h)	X (g/L)	μ_x (h^{-1})	t_d (h)	*Q_P (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	AS (g/L)
Cultivo de Ativação em Meio Sintético (Glicose)	21,5	24	0,82	0,186	3,72	0,346	0,454	0,0396	4,16
Inóculo em Meio Sintético (Glicose)	21,0	24	0,98	0,273	2,53	0,415	0,240	0,0476	4,98
Inóculo em Meio Sintético (Xilose)	20,9	24	1,2	0,305	2,13	0,433	0,261	0,0462	5,20
Inóculo em Hidrolisado Diluído	22,0	24	0,9	0,278	2,49	0,378	0,252	0,0379	5,30

*O tempo utilizado como base de cálculo para obtenção do valor de produtividade refere-se ao tempo de esgotamento total da fonte de carbono, necessário para obtenção do valor máximo de concentração final de ácido succínico (AS) e crescimento celular, em cada perfil descrito.

Observa-se que o fator de rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) foi ligeiramente inferior no ensaio com hidrolisado hemicelulósico, durante o preparo do inóculo, possivelmente pela presença de inibidores no hidrolisado. Porém, de uma forma geral, as concentrações finais de biomassa mantiveram-se bastante próximas. Cabe destacar que em nenhum dos casos avaliados houve fase lag, indicando que os procedimentos de ativação e propagação celular foram adequados. Com estes resutlados iniciais, foi possível registrar a capacidade da linhagem em consumir xilose e glicose, abrindo uma oportunidade para o aproveitamento e a utilização das frações hemicelulósica e celulósica, oriundas do pré-tratamento de biomassa residual de composição lignocelulósica.

5.4. Processo de fermentação mediante estratégias de aclimatação celular

Na Figura 5.8 é apresentado o perfil cinético para fermentação em meio sintético, que foi utilizado como referência para as fermentações realizadas em presença do hidrolisado, ou seja, com concentração inicial de xilose de aproximadamente 52 g/L. O esgotamento da fonte de carbono ocorreu após 22 horas, com uma concentração final de ácido succínico igual a 15,5 g/L, com concentração celular de aproximadamente 2,8 g/L.

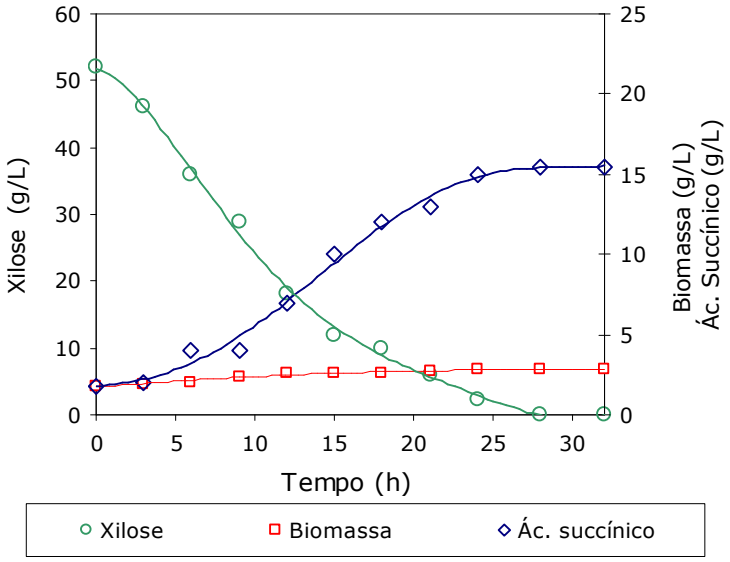

Figura 5.8. Cinética de fermentação de em meio sintético

A Figura 5.9 apresenta o perfil cinético para o crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, separadamente, para facilitar a compreensão de desempenho entre as fermentações desenvolvidas com hidrolisado hemicelulósico, mediante a metodologia de aclimatação, para ambos os casos.

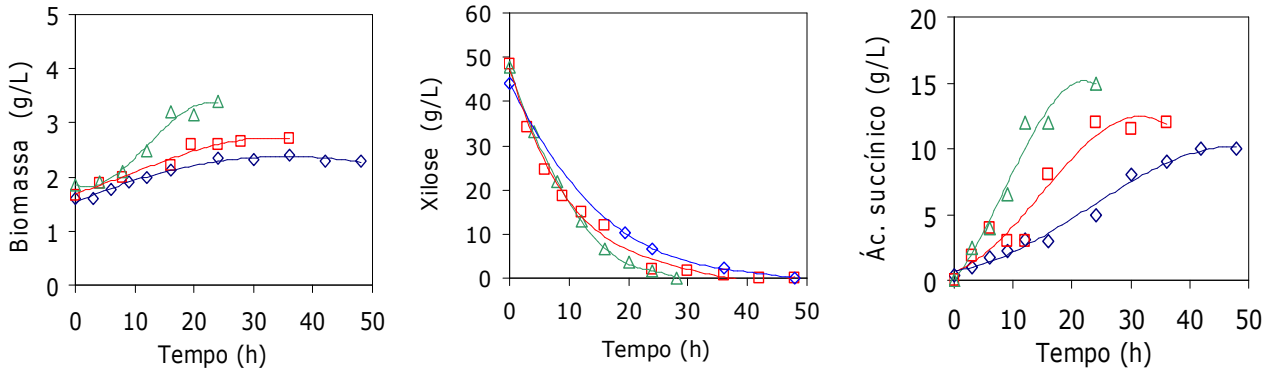

Figura 5.9. Perfil de crescimento celular (a), de consumo de xilose (b) e de formação de produto (c), em fermentações de hidrolisado hemicelulósico utilizando células previamente cultivadas em diferentes estratégias de propagação: aclimatação celular em duas etapas, com 25 e 50% de hidrolisado (Δ); uma etapa, 25% de hidrolisado (□) e não aclimatadas (◊)

Pela análise do crescimento celular, nota-se que ocorreu um aumento da concentração de células conforme foram implementadas as etapas de aclimatação durante o processo de propagação celular. No caso em que foram utilizadas duas etapas de aclimatação foi alcançada a máxima concentração celular (3,4 g/L), em um período de fermentação menor em relação às outras estratégias, as quais apresentaram valores de concentração celular inferiores. De acordo com BETANCUR *et al*. (2010), os microrganismos consomem de forma mais eficiente o substrato, quanto maior o grau de aclimatação, a exemplo de processos de fermentação, por *Pichia stipitis* a partir de licor sulfítico.

Para o consumo de substrato, um comportamento similar também foi observado. A taxa de consumo foi semelhante durante as primeiras 8 horas, para todos os casos. Porém, para a fermentação a partir de células aclimatadas em duas etapas, a taxa de consumo foi mantida durante todo o processo, levando um tempo total de fermentação de 28 horas, próximo ao observado no processo realizado em meio sintético, de 26 horas (Figura 5.8). Nos experimentos com células não aclimatadas e aclimatadas, em uma única etapa, a taxa de consumo caiu com o decorrer do tempo, sendo o substrato completamente esgotado em 48 e 36 horas de fermentação, respectivamente.

No perfil de formação de produto, o processo com células aclimatadas em duas etapas apresentou o melhor resultado, com uma concentração final de produto (16,0 g/L) e a produtividade volumétrica em ácido succínico (0,61 g/L.h) superiores aos respectivos valores encontrados para os perfis com uma única etapa de aclimatação celular (12,0 g/L e 0,33 g/L.h) ou com células sem aclimatação (10,0 g/L e 0,20 g/L.h).

A Tabela 5.2 apresenta os parâmetros analisados de forma mais objetiva, como: tempo de fermentação (t_f), concentração final de ácido succínico (P) e biomassa (X), fator de

rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$), em produto ($Y_{P/S}$), e produtividade volumétrica de ácido succínico (Q_P).

Tabela 5.2. Variáveis de Resposta na Avaliação do Efeito da Aclimatação.

Fermentação	S_0	*t_f (h)	P (g/L)	X (g/L)	**$Y_{P/S}$ (g/g)	**$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)
Em Hidrolisado com Células Não Aclimatadas	51,0	48	10,0	2,3	0,195	0,014	0,20
Em Hidrolisado com Células Aclimatadas Em Uma Etapa	50,5	36	12,0	2,7	0,259	0,024	0,33
Em Hidrolisado com Células Aclimatadas em Duas Etapas	49,8	28	16,0	3,4	0,330	0,033	0,61
Em Meio Sintético	51,4	26	15,0	2,8	0,284	0,020	0,67

* t_f :Tempo necessário para o esgotamento total de xilose e crescimento celular
** Cálculos de rendimento em função do consumo de xilose

O fator de rendimento em produto ($Y_{P/S}$) apresentou um aumento com as etapas de aclimatação no processo de propagação celular, ultrapassando o valor obtido com a fermentação conduzida em meio sintético, realizada como controle comparativo. Cabe ressaltar, que além da xilose, foram detectados no hidrolisado, glicose, em concentrações de até 3 g/L, e arabinose, em concentrações de até 8 g/L. A glicose foi consumida durante as primeiras horas de cultivo sem influenciar à fermentação, enquanto o consumo de arabinose não foi constatado no decorrer de ambos os processos analisados. Além disso, nota-se que a concentração final de ácido succínico para aclimatação em duas etapas foi muito próxima do valor obtido em meio sintético, com uma diferença de apenas 9 %.

A produtividade volumétrica (Q_P) aumentou de 0,20 g/L.h com células não aclimatadas, para 0,33 g/L.h com células aclimatadas em uma etapa e, finalmente, atingiu o valor de 0,61 g/L.h no caso de células aclimatadas em duas etapas. Este incremento deve-se ao o aumento progressivo da concentração final de ácido succínico e, principalmente, à queda no tempo no tempo de fermentação do processo.

Dessa forma, pode-se concluir que a inclusão de duas etapas de aclimatação, durante o processo de propagação celular, permitiu a redução do tempo de fermentação, além de aumentar a concentração de ácido succínico, com efeitos positivos sobre a produtividade.

Normalmente, o meio de cultivo é importante para o rendimento dos produtos da fermentação. Fatores tais como concentração inicial de açúcar, fontes complexas de nitrogênio, concentrações de íons carbonato, pH e temperatura do meio de crescimento são reportados como os fatores mais críticos que afetam tanto o crescimento celular como a formação de produto (SAMUELOV *et al*., 1991; NGHIEM *et al*., 1997; LEE *et al*., 1999a, b).

5.5. Avaliação do efeito da fonte de carbono e influência da relação C:N no crescimento celular

De acordo com Gonzales *et al*. (2008), a razão carbono-nitrogênio (C:N) no meio é um dos fatores mais importantes que influenciam o crescimento celular e a produção de metabólitos de muitos processos fermentativos. Portanto, para a otimização dos processos de fermentação, devem ser estudadas as melhores razões de C:N presentes no meio (MADIHAH *et al*., 2001; ROSFARIZAN & ARIFF, 2000; NDEGWA & THOMPSON, 2000).

Os ensaios realizados nesta etapa foram baseados nos estudos sobre os efeitos da razão C:N e da fonte de carbono de Gonzales *et al*. (2008), com diferenças em relação à composição do meio de cultivo e condições de processo (metodologia de incorporação de CO_2). Foram utilizadas como fontes de carbono glicose e xilose e realizados um total de 10 ensaios com meios apresentando diferentes razões C:N, que variaram entre 2.6:1 até 35.1:1. A Figura 5.10 mostra os efeitos de xilose glicose sobre o crescimento celular da linhagem *Actinobacillus succinogenes*. A priori, nota-se que os valores com concentrações celulares ligeiramente maiores foram obtidas com os experimentos envolvendo o uso de xilose como substrato. Resultados com este perfil cinético também foram encontrados por Gonzales *et al*. (2008), onde os autores estudaram também o uso de sacarose como fonte de carbono.

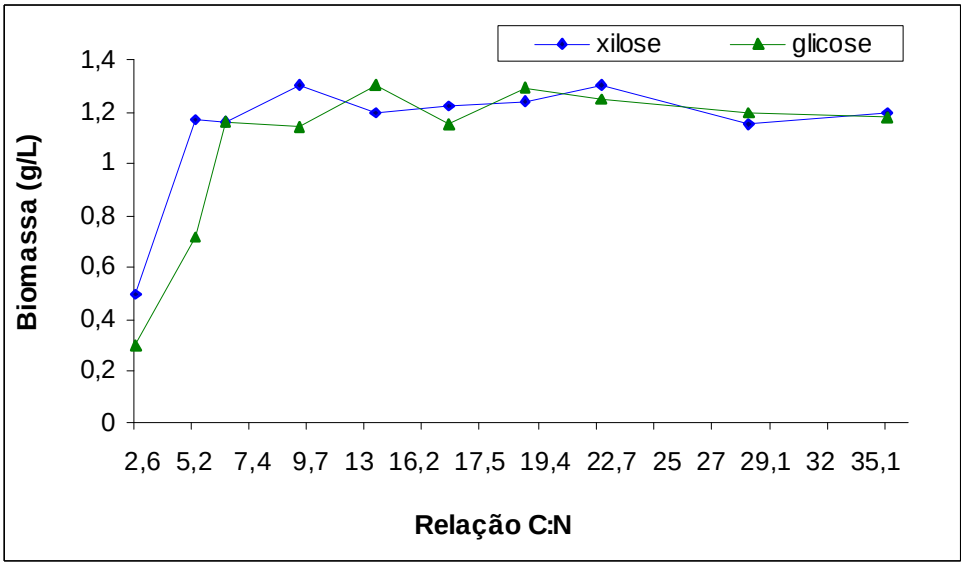

Figura 5.10. Efeitos de diferentes fontes de carbono sobre a produção de biomassa

Os maiores valores de concentração celular a partir de xilose e glicose, em 24 horas de processo foram iguais a 1,3 e 1,28 g/L, respectivamente. As Figuras 5.11 e 5.12 mostram os efeitos da razão C:N no crescimento celular e verifica-se que os resultados mais próximos estão entre 12,5 e 25:1. No entanto, diferença pouco significativa foi observada entre os valores de máximas concentrações de biomassa.

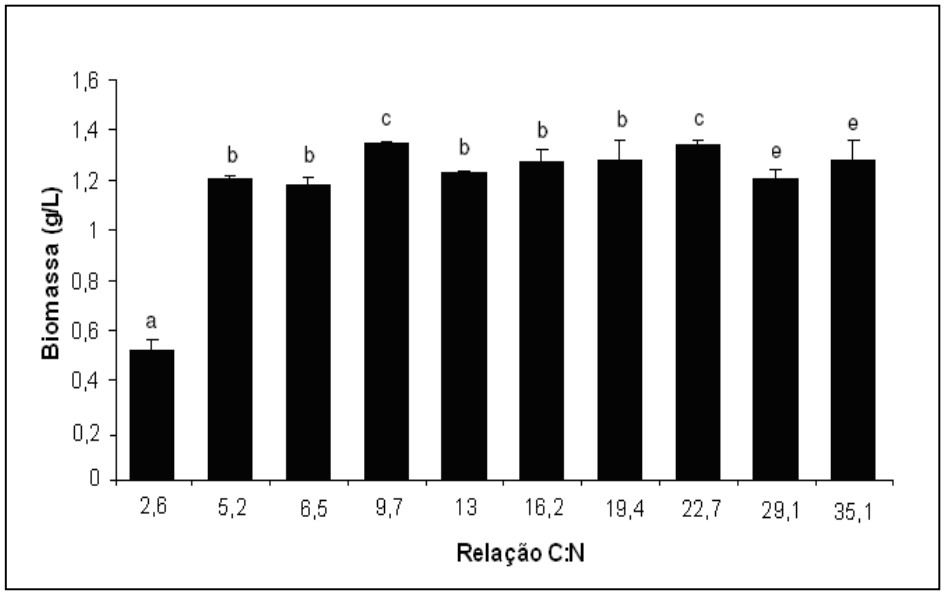

Figura 5.11. Crescimento celular em presença de **xilose** ecomo fonte de carbono.
* Colunas com diferentes letras representam diferença significativa em um intervalo de confiança de 95%, pelo teste de Tukey.

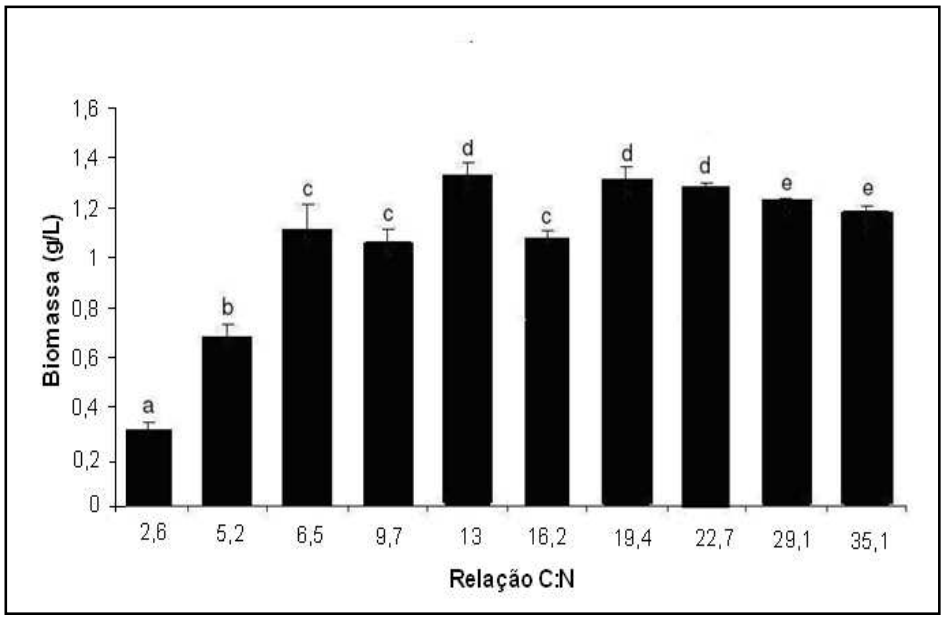

Figura 5.12. Crescimento celular em presença de **glicose** ecomo fonte de carbono.
* Colunas com diferentes letras representam diferença significativa em um intervalo de confiança de 95%, pelo teste de Tukey

Valores ligeiramente maiores do que estes foram encontrados por Gonzales *et al*. (2008), porém semelhantes. Os autores encontram até 1,6 g/L de biomassa ao realizar os ensaios com xilose. Pode-se notar que uma reduzida quantidade de nitrogênio nos ensaios com elevadas razões C:N não limitou o crescimento bacteriano, sinalizando para uma maior influência por parte da fonte de carbono em relação a fonte de nitrogênio (MADIHAH *et al.,* 2001). HEERDE & RADLER (1978) investigaram a produção de ácido succínico, sob condições anaeróbicas, através de *Saccharomyces cerevisiae*, e verificaram que as fontes de nitrogênio tiveram maior influência sobre a conversão de glicose em ácido succínico.

A maioria dos microrganismos sofre inibição do crescimento celular em concentrações iniciais de glicose como fonte de carbono acima de 20,0 g/L (GONZALES *et al*., 2008; CORONA *et al.,* 2008). Porém, observando-se a Tabela 5.3 e as figuras anteriores, nota-se que não houve inibição do crescimento celular nos experimentos com xilose, indicando que a bactéria *Actinobacillus succinogenes* se desenvolve adequadamente em concentrações de até 55,0 g/L conforme também foi constatado por Gonzales *et al*., 2008. Porém, quando utilzada a glicose como fonte de carbono verifica-se um relativa redução do crescimento celular, sugerindo um começo de inibição para concentrações acima de 36 g/L (C:N 22.5:1-29.1:1). Comportamento semelhante foi observado por outros autores, além de Gonzales *et al.* (2008) durante experimentos com variação na concentração inicial de glicose, entre 10 e 90 g/L, por CHEN *et al*. (2010), onde efeitos de inibição sobre o crescimento de *Actinobacillus succinogenes* NJ113 foram observados em 50 g/L de glicose.

Verifica-se que para os diferentes ensaios, os resultados foram semelhantes nos dois experimentos (glicose e xilose), principalmente para as razões C:N entre os números de ensaios (N.E) 5 e 8, com exceção da razão C:N de 16.2:1 para glicose como fonte de carbono.

Tabela 5.3. Influência da concentração inicial de substrato e da razão C:N no crescimento celular e concentração de ácido succínico.

N.E	**Glicose e Xilose (g/L)**	**C:N**	**Biomassa (g/L)**		**Ácido succínico (g/L)**	
			Xilose	Glicose	Xilose	Glicose
1	4,0	2,6:1	0,5	0,3	1,7	1
2	8,0	5,2:1	1,17	0,72	3,2	2,6
3	10,0	6,5:1	1,16	1,16	5,3	4,8
4	15,0	9,7:1	**1,3**	1,14	5	5
5	20,0	13:1	1,2	1,3	6,5	5,7
6	25,0	16,2:1	1,22	1,15	6	5,5
7	30,0	19,4:1	1,24	**1,29**	5,7	5,2
8	35,0	22,7:1	1,3	1,25	6,1	5,8
9	45,0	29,1:1	1,15	1,2	5,3	4,9
10	55,0	35,1:1	1,2	1,18	7,5	4,4

N.E: Número de ensaios

Pode-se verificar ainda que, na maioria dos ensaios, houve um sinergismo entre o crescimento celular e a produção do ácido succínico. Estes resultados mostram que os limites toleráveis de C:N para o máximo crescimento celular apresentam uma ampla faixa, possibilitando o uso de diferentes razões C:N (WU *et al*., 2004), confirmando a adequação da linhagem face à utilização diversas fontes de carbono, como xilose e glicose.

Adicionalmente, as Figuras 5.13 e 5.14, mostram os efeitos das diferentes relações C:N na produção ácido succínico, para xilose e glicose, respectivamente.

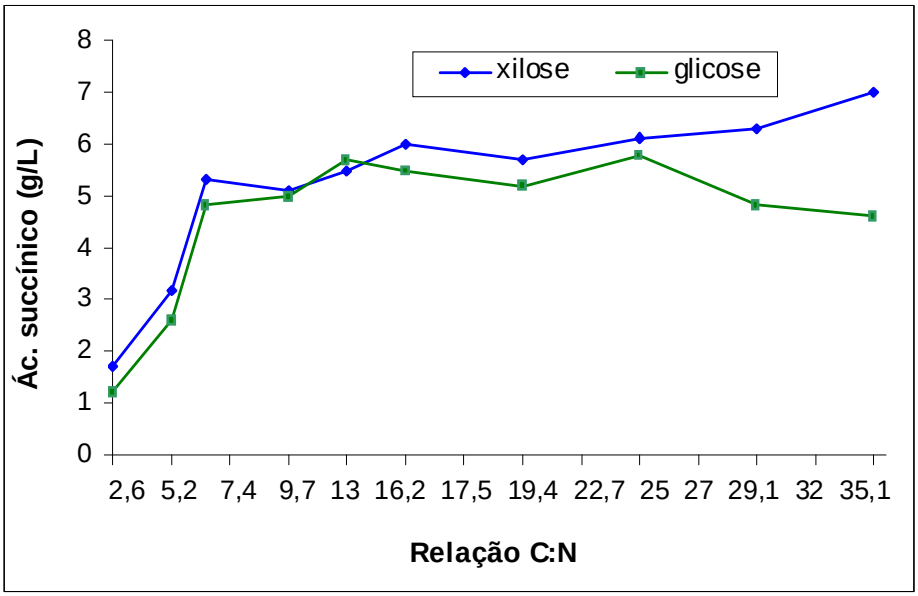

Figura 5.13. Efeitos de diferentes fontes de carbono sobre a concentração final de ácido succínico

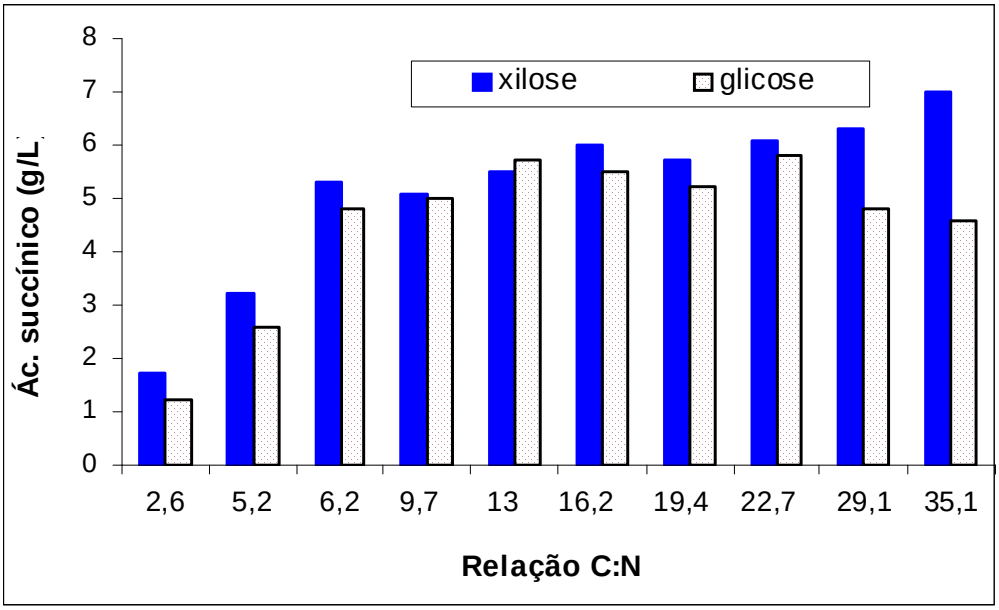

Figura 5.14. Efeitos de diferentes fontes de carbono sobre a concentração final de ácido succínico

Foi possível concluir que o crescimento celular e a produção de ácido succínico foram reduzidos em presença de glicose, com concentração acima de aproximadamente 40 g/L. Os resultados obtidos estão de acordo com as afirmações reportadas na literatura, a respeito da habilidade da bactéria *A. succinogenes* para a produção de ácido succínico a partir de uma variedade de substratos, como celobiose, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, manose, sorbitol, glicose, xilose e sacarose, em condições adequadas de processo (GUETLER *et al*., 1998).

As etapas seguintes referem-se aos estudos de otimização. Para desenvolver um processo com a máxima produção de ácido succínico, deve-se delinear um planejamento experimental e padronizar as condições de produção e meio de cultivo (ISAR *et al.,* 2006a).

5.6. Planejamentos experimentais seqüenciais para otimização das condições do processo

Para avaliar a influência de dos nutrientes utilizados para a composição do meio de fermentação, foi realizado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionário PFF 2^{4-1}, seguido de um Delineamento Composto central Rotacional (DCCR).

5.6.1. Planejamento Experimental Fatorial Fracionado 2^{4-1}

As Tabelas 5.4 e 5.5, apresentam os resultados obtidos a partir do Planejamento Fatorial Fracionário PFF 2^{4-1} (8 experimentos com adição de dois pontos centrais), tendo como variável de resposta a concentração final de ácido succínico, após 24 horas de fermentação para xilose e glicose, respectivamente.

Tabela 5.4. Matriz experimental do PFF 2^{4-1} e concentração final de ácido succínico, para **xilose** como fonte de carbono

Ensaios	Parâmetros e níveis reais				Resposta
	A	B	C	D	Ácido succínico (g/L)
	K_2HPO_4 (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	$NaHCO_3$ (g/L)	
1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.53
2	10.0	0.0	0.0	10.0	4.74
3	0.0	2.0	0.0	10.0	8.36
4	10.0	2.0	0.0	0.0	5.96
5	0.0	0.0	5.0	10.0	7.66
6	10.0	0.0	5.0	0.0	4.96
7	0.0	2.0	5.0	0.0	6.08
8	10.0	2.0	5.0	10.0	9.02
9 (PC)	5.0	1.0	2.5	5.0	7.16
10 (PC)	5.0	1.0	2.5	5.0	7.58
11 (PC)	5.0	1.0	2.5	5.0	7.23

Total: 8 ensaios com 3 repetições do ponto central - PC

Tabela 5.5. Matriz experimental do PFF 2^{4-1} e concentração final de ácido succínico, para **glicose** como fonte de carbono

Ensaios	Parâmetros e níveis reais				Resposta
	A	B	C	D	Ácido succínico (g/L)
	K_2HPO_4 (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	$NaHCO_3$ (g/L)	
1	0.00	0.00	0.00	0.00	4.06
2	10.00	0.00	0.00	10.00	3.21
3	0.00	2.00	0.00	10.00	6.83
4	10.00	2.00	0.00	0.00	4.43
5	0.00	0.00	5.00	10.00	6.13
6	10.00	0.00	5.00	0.00	3.43
7	0.00	2.00	5.00	0.00	4.55
8	10.00	2.00	5.00	10.00	7.49
9 (PC)	5.00	1.00	2.50	5.00	6,15
10 (PC)	5.00	1.00	2.50	5.00	6.38
11 (PC)	5.0	1.0	2.5	5.0	6,12

Total: 8 ensaios com 3 repetições do ponto central - PC

A análise estatística dos modelos foi realizada usando ANOVA. Os valores obtidos mostram que a concentração de ácido succínico variou de 4.74 a 9.02 g/L e 3,21 a 7,49 g/L para os ensaios conduzidos a partir de xilose e glicose, respectivamente.

Para as duas fontes de carbono, os resultados apresentaram comportamento semelhante. As maiores concentrações de ácido succínico tiveram como característica a presença de $NaHCO_3$ no meio de fermentação. No caso do experimento 2, onde também foi utilizada $NaHCO_3$, a baixa concentração de ácido succínico pode ser explicada pela ausência tanto de extrato de levedura como de $MgSO_4$.

Nas fermentações em que foi utilizado extrato de levedura, a concentração de ácido succínico esteve acima de 7,0 e 6,0 g/L (experimentos 3, 5, 8, 9 e 10) para xilose e glicose, respectivamente; exceto para os ensaios de número 6. Nesses experimentos, apesar de ter sido utilizado o maior nível de extrato de levedura, a ausência de $MgSO_4$ e $NaHCO_3$ pode ter levado à baixa concentração de ácido succínico obtida, sinalizando para a importância de interação entre estes componentes do meio.

Concentrações acima de 5,96 e 4,43 g/L (xilose e glicose) de ácido succínico foram obtidas sempre que a solução de $MgSO_4$ foi adicionada ao meio de fermentação, com exceção do experimento 5. No entanto, para este ensaio, o extrato de levedura e $NaHCO_3$ estiveram presentes em níveis superiores. Os maiores valores de concentração final de ácido succínico (9,02 e 7,49 g/L para xilose e glicose, respectivamente) foram obtidos coma adição de todos os nutrientes nas dosagens estimadas em nível superior (ensaio 8): K_2HPO_4, 10.0 g/L; $MgSO_4$ 2.0 g/L; extrato de levedura 5.0 g/L e $NaHCO_3$ 10.0 g/L.

Para o processo de fermentação, usando xilose como fonte de carbono, a concentração de ácido succínico foi relativamente maior do que o valor encontrado por KIM *et al.* (2004), que obtiveram aproximadamente 7,0 g/L de ácido succínico, em condições de cultivo similares.

A adição de fosfato di-básico de potássio (K_2HPO_4) no meio de fermentação não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a concentração final de ácido succínico. Apesar disso, cabe ressaltar que as menores concentrações de ácido succínico, foram resultantes das fermentações que continham fosfato no nível superior (experimentos 2 e 6), sendo estas concentrações menores que aquela apresentada no ensaio 1, onde não há adição de nutrientes e, foi produzido 5,53 e 4,06 g/L de ácido succínico para xilose e glicose, respectivamente.

Os resultados sugerem também a necessidade da adição conjunta de solução de $MgSO_4$ e $NaHCO_3$ (corridas 3 e 8, por exemplo) para a alcançar bons resultados. Essa interação é constatada com as baixas concentrações obtidas nas fermentações em que foram adicionadas de forma exclusiva a solução de $MgSO_4$ ou $NaHCO_3$, apesar da presença de KH_2PO_4 no meio (corridas 1, 2 e 4).

A seguir, a análise de variância (ANOVA) apresenta importantes dados do experimento, como os valores de Probalidade de *Fisher*, que indica a significância estatisica dos fatores avaliados, as suas interações, erros e a falta de ajuste do experimento. A soma dos quadrados (SM) dos fatores, interações e resíduos (*Lack of fit* somado ao erro puro) também representam alternativas para a avaliação do experimento e a escolha do modelo. Quanto maior o valor da soma dos quadrados maior é o efeito estimado dos fatores avaliados sobre a resposta do processo (RODRIGUES, 2010)

De acordo com a análise de variância (Tabelas 5.6 e 5.7), em ambos os casos, nota-se que o modelo quadrático reduzido apresentou um ajuste adequado aos resultados experimentais, para este tipo de planejamento, com um coeficiente de correlação R^2 de 0.992 e 0,994; um baixo erro puro (0.064 e 0,088) e, uma falta de ajuste (*Lack of fit* de 0,120 e 0,184) sem significância para o intervalo de confiança de 90% (p-level $< 0,1$) para xilose e glicose, respectivamente. Ambos os modelos gerados foram significativos, com valores de Fisher (F) iguais a 29.85 e 25,93, respectivamente.

Tabela 5.6. Análise de variância (ANOVA) da concentração de ácido succinico, no PFF 2^{4-1} para **xilose** como fonte de carbono

Efeito	SM	DF	QM	F valor	*p* > F
Modelo	18.0797875	7	1.80797875	29.85843805	< 0.0001
A	1.9110125	1	1.9110125	19.49093364	0.1159
B	3.0876125	1	3.0876125	47.64834105	0.0916
C	2.9701125	1	1.9701125	41.40297068	0.0982
D	7.7815125	1	7.7815125	120.0850694	0.0579
AB	0.8385125	1	0.8385125	12.94000772	0.1726
AC	2.4090125	1	2.4090125	31.17611883	0.0922
AD	0.0820125	1	0.0820125	1.265625	0.4626
Curvature	1.3140625	1	1.3140625	30.27874228	0.0952
Lack of Fit	45.641850	9	4.564185	27.43712	0.1204
Pure Error	1.5634	5	0.0648		
Cor Total	19.04526	19			

[Ácido succínico]: [R-Squared = 0.9926, Adj R-Squared = 0.9399]

Tabela 5.7. Análise de variância (ANOVA) da concentração de ácido succinico, no PFF 2^{4-1} para **glicose** como fonte de carbono

Efeito	SM	DF	QM	F valor	*p* > F
Model	21,6841796	7	2,16841796	39,48785425	<0.0001
A	2,4875931	1	2,4875931	29,49093364	0.1035
B	4,0578431	1	4,0578431	47,64834105	0.0816
C	2,8549831	1	2,8549831	42,45687068	0.0956
D	9,1205431	1	9,1205431	131,0845264	0.0542
AB	0,9452131	1	0,9452131	12,94000772	0.1978
AC	3,5589231	1	3,5589231	39,58611883	0,0987
AD	0,0975231	1	0,0975231	1,265625	0.5246
Curvature	1.3140625	1	1.3140625	40,1568944	0.0862
Lack of Fit	50,489560	9	5,048956	29.45268	**0.1845**
Pure Error	1.35764	5	0.0881		
Cor Total	20,145878	19			

[Ácido succínico]: [R-Squared = 0.9946, Adj R-Squared = 0.9399]

A: K_2HPO_4, B:$MgSO_4$, C: Extrato de Levedura; D: $NaHCO_3$.
SQ: Soma Quadrática (Sum of Squares); MQ: Média Quadrática (Mean square); F= Fisher Calculado; *p* >F= Probabilidade de Fisher.
Os valores em vermelho são os correspondentes as variáveis que apresentaram significância estatística (p-Level < 0,1)

A magnitude do efeito estimado de cada variável é apresentada pelo histograma de influência das variáveis (Figura 5.15) ou através do diagrama de Pareto (Figura 5.16), mostrando a importância estatística mais relevante dos fatores e interações entre os mesmos.

A influência das variáveis, para ambos os processos desenvolvidos (xilose e glicose) apresentaram a mesma ordem de efeito significativo estatisticamente, com maiores valores da soma quadrática para os resultados obtidos a partir da glicose.

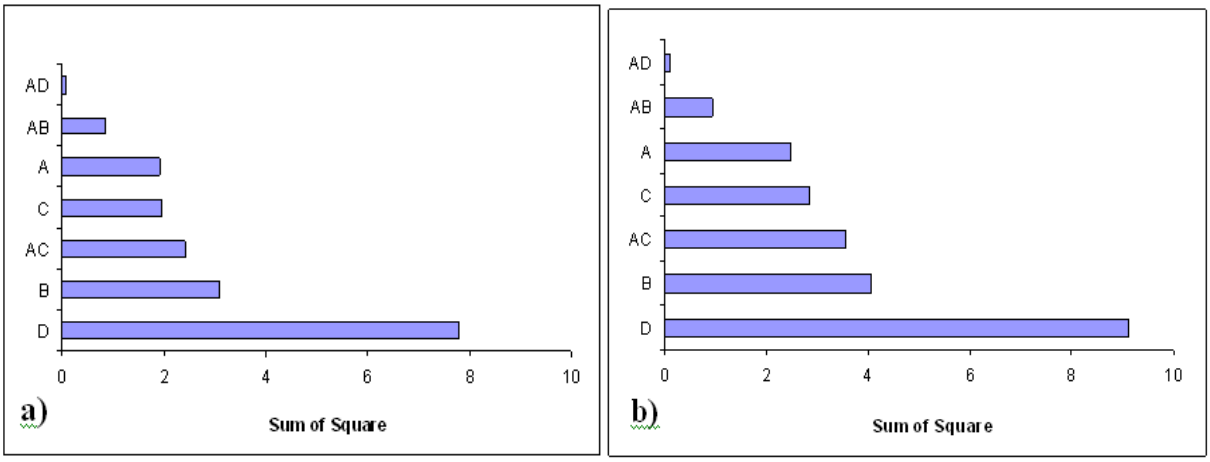

Figura 5.15. Histograma de influência das variáveis e suas interações, de acordo com a soma quadrática (Sum of Squares), do PFF 2^{4-1} para xilose (a) e glicose (b), respectivamente, considerando o intervalo de confiança de 90% (p<0,1). A: K_2HPO_4, B:$MgSO_4$, C: Extrato de Levedura, D: $NaHCO_3$.

Devido à similaridade entre os dois casos, a apresentação de apenas um Diagrama de Pareto, mostra-se suficiente para visualização da ordem de efeitos estimados pelas variáveis analisadas.

O Diagrama de Pareto revela que o maior efeito positivo é gerado pelo $NaHCO_3$, seguido pelo efeito da solução de $MgSO_4$, ambos com significância estatística, sugerindo um aumento na concentração destes em um próximo planejamento. Em seguida, o extrato de levedura apresentou um efeito positivo próximo do limite estabelecido para o modelo (*p*-level = 0,1). O K_2HPO_4 mostrou um efeito negativo sobre a concentração final de ácido succínico, sendo também o efeito de menor significância estatística, com valores de *p*=0,1159 e 0,1035 a *p*<0,1; sugerindo a eliminação deste componente na formulação do meio, em ensaios futuros. Porém, a interação entre K_2HPO_4 e extrato de levedura (AC) mostrou ser significativa estatisticamente (p = 0,0922 e 0,0987), a *p*<0,1 (Tabelas 5.6 e 5.7). Por conter magnésio e fósforo, o $MgSO_4$ e o K_2HPO_4 representam um papel importante na fisiologia e morfologia celular (GUETLER *et al*., 1999). O fósforo tem uma função importante para as vias metabólicas, que são iniciadas com uma fosforilação do substrato, sendo um elemento constituinte das moléculas de ATP, que estão presentes no mecanismo energético das células. O $MgSO_4$ é a umas das melhores fontes de enxofre, por servir também, como de fonte de magnésio, uma vez que o magnésio é responsável pela estabilidade estrutural de

diversas enzimas e, também por prevenir a formação de vesículas na membrana externa da célula (PEREIRA JR, 1991).

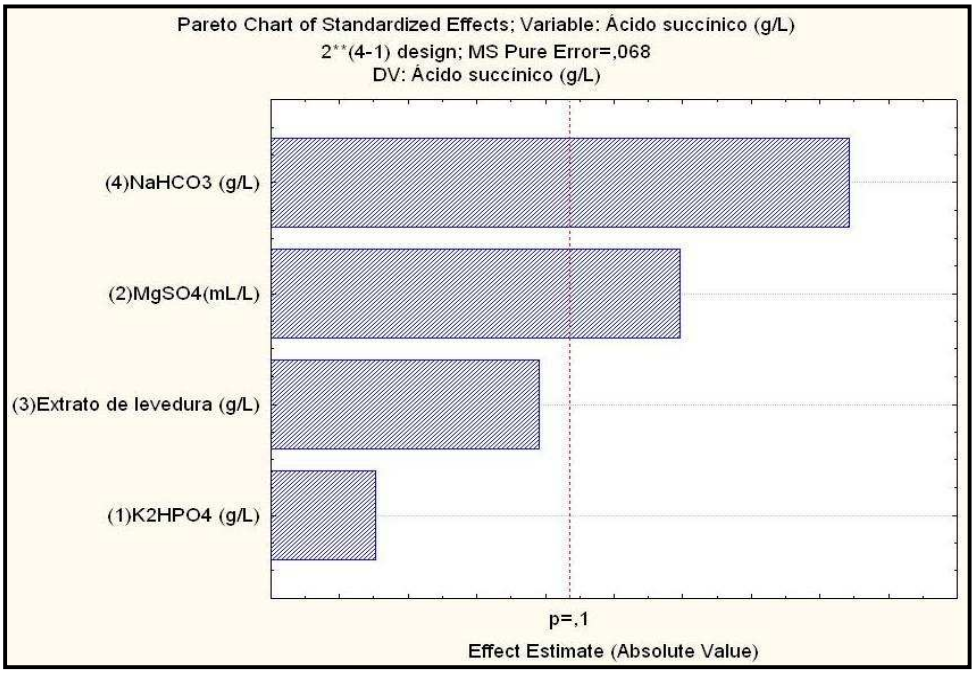

Figura 5.16. Diagrama de Pareto para o efeito estimado das variáveis sob a concentração final de ácido succínico, pelo PFF 2^{4-1}, considerando o intervalo de confiança de 90% (p<0,1). A: K_2HPO_4, B:$MgSO_4$, C: Extrato de levedura, D: $NaHCO_3$.

Em termos gerais, a fermentabilidade do processo foi aumentada com a adição da fonte de CO_2 ($NaHCO_3$), Magnésio e de Nitrogênio. Porém, o uso em conjunto de pelo menos $NaHCO_3$ ou $MgSO_4$ com a fonte de nitrogênio permitiu melhorar a eficiência da fermentação. Com a adição de KH_2PO_4 foi observado um comportamento contrário. De acordo com os resultados, a maior concentração de ácido succínico (9,02 e 7,49 g/L) foi obtida quando foram adicionados ao meio todos os nutrientes no seu nível superior (ensaio 8), para ambos os processos, usando xilose e glicose.

A análise de ANOVA mostrou que maiores valores de concentração final ocorreram quando os parâmetros B e C estiveram em seus níveis superiores, combinados com uma baixa concentração de K_2HPO_4, indicando a existência de um valor de máximo absoluto, conforme pode ser visto na Figura 5.17, pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).

Quando se utiliza do planejamento fatorial fracionado, informações importantes acerca dos efeitos principais individuais e das interações de primeira ordem entre as variáveis podem ser obtidos (BRUNS, 2003). Entretanto, efeitos das interações de segunda ordem e superiores são aceitas como desprezíveis. Em outras palavras, embora esta seja uma ferramenta de grande importância quando se deseja analisar a influência de um grande número de variáveis sobre determinada resposta, o fracionamento do planejamento experimental e a redução do

número de experimentos realizados acarretam perdas quanto à análise da influência de interações entre as variáveis de estudo sobre a resposta de interesse, sem a possibilidade de visualização do ponto de máximo absoluto, devido à inexistência de uma superfície de resposta e curvas de contorno (RODRIGUES, 2010).

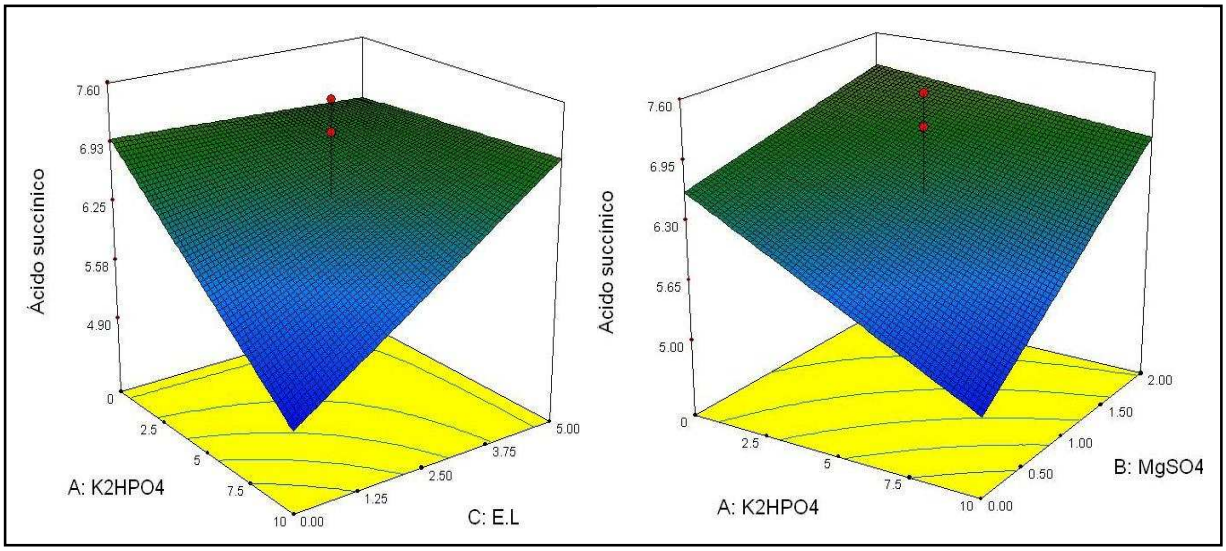

Figura 5.17. Superfície de resposta mostrando o efeito da interação entre AC e AB.
A: K_2HPO_4, B: $MgSO_4$ e C: Extrato de Levedura

Os valores na concentração final de ácido succínico podem ser aumentados com o acréscimo dos pontos axiais, na medida em que aumentam a tendência em direção ao máximo absoluto. Como todas as variáveis analisadas foram significativas (valores de F elevados), elas serão mantidas no modelo seguinte, inclusive o K_2HPO_4, respeitando a hierarquia das interações.

5.6.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma das mais importantes metodologias utilizadas em estudos de otimização de processos, cujo objetivo é desenvolver um modelo empírico para o processo estudado e obter respostas mais com maior precisão para determinação de condições ótimas (BRUNS, 1995)

De acordo com os resultados do planejamento PFF^{4-1}, os níveis de $NaHCO_3$ e $MgSO_4$ podem ser aumentados, enquanto os níveis de K_2HPO_4 podem ser reduzidos. Em concentrações elevadas, a presença do K_2HPO_4 pode reduzir a produção de ácido succínico e outros ácidos orgânicos, como os ácidos acético e fórmico e, os sais (HPO_4^{--}) podem causar uma diminuição no rendimento da extração do ácido succínico, em etapas posteriores de separação da fase aquosa, devido a fatores de força iônica (GAMEZ *et al.*, 2006, HU *et al.*, 2006).

Os resultados do planejamento DCCR, são apresentados nas Tabelas 5.8 e 5.9 para xilose e glicose, respectivamente. Um total de 27 ensaios e 3 repetições no ponto central, foi gerado.

Avaliando ambos os planejamentos experimentais seqüenciais, foi possível perceber um aumento na concentração final de ácido succínico de 9.02 e 7,48 g/L (ensaios de número 8, PFF^{4-1}) para 12.8 e 10,86 g/L (ensaios de número 2, DCCR) para xilose e glicose, respectivamente.

A concentração final de ácido succínico variou entre 6.04 e 12.8 g/L (xilose) e entre 5,07 e 10,86 g/L (glicose). A máxima concentração de ácido succínico foi obtida segundo a seguinte composição, de acordo com o ensaio 2: fonte de carbono 20 g/L; K_2HPO_4 5.0 g/L; $MgSO_4$ 2.0 g/L; extrato de levedura 3.0 g/L e $NaHCO_3$ 10 g/L.

Dessa forma, a metodologia estatística de superfície de resposta pelo DCCR foi usada para otimizar a produção de ácido succínico, através do monitoramento dos efeitos interativos entre as variáveis, acrescidas de seus respectivos pontos axiais. O efeito da concentração de 10 g/L de $NaHCO_3$ foi similar ao obtido com o uso de $MgCO_3$, por VEMURI *et al.* (2002), que obtiveram uma concentração final de ácido succínico igual a 10.53 g/L. Os autores verificaram ainda que concentrações de $NaHCO_3$ ou $MgCO_3$, não promovem diferenças significativas sob a produção de ácido succínico, mediante resultados obtidos com um planejamento fatorial completo.

Tabela 5.8. Matriz experimental do DCCR investigando os efeitos de K_2HPO_4, $MgSO_4$, extrato de levedura e $NaHCO_3$ na concentração final de ácido succínico, para **xilose** como fonte de carbono

Ensaios	Parâmetros e níveis reais				Resposta
	A	B	C	D	
	K_2HPO_4 (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	$NaHCO_3$ (g/L)	Ácido Succínico (g/L)
1	5.0	4.0	3.0	5.0	11.55
2	5.0	2.0	3.0	10.0	12.85
3	10.0	3.0	5.0	15.0	11.12
4	10.0	3.0	1.0	15.0	11.42
5	7.5	2.0	0.0	10.0	6.04
6	7.5	4.0	3.0	1.5	10.45
7	5.0	4.0	1.0	5.0	10.26
8	7.5	2.0	3.0	10.0	9.42
9	10.0	2.0	1.0	15.0	9.10
10	10.0	1.0	5.0	15.0	8.45
11	10.0	4.0	5.0	5.0	12.15
12	10.0	3.0	1.0	5.0	12.10
13	12.5	4.0	3.0	10.0	12.27
14	10.0	4.0	3.0	20.0	12.45
15	5.0	2.0	5.0	15.0	7.85
16	7.5	2.0	3.0	10.0	7.12
17	7.5	3.0	3.0	10.0	12.20
18	5.0	4.0	1.0	15.0	12.41
19	5.0	3.0	5.0	5.0	11.02
20	7.5	3.0	5.0	5.0	10.78
21	5.0	4.0	1.0	5.0	7.56
22	10.0	3.0	1.0	5.0	10.23
23	2.5	2.0	3.0	10.0	8.86
24	5.0	2.0	1.0	15.0	6.54
25	5.0	3.0	5.0	15.0	7.45
26	7.5	3.0	7.0	10.0	11.24
27	7.5	2.0	3.0	10.0	9.25
28 (CP)	7.5	3.0	3.0	10.0	10.15
29 (CP)	7.5	3.0	3.0	10.0	11.23
30 (CP)	7.5	3.0	3.0	10.0	11.12

Total: 27 ensaios com 3 repetições do ponto central - PC

Tabela 5.9. Matriz experimental do DCCR investigando os efeitos de K_2HPO_4, $MgSO_4$, extrato de levedura e $NaHCO_3$ na concentração final de ácido succínico, para **glicose** como fonte de carbono

Ensaios	Parâmetros e níveis reais				Resposta
	A	B	C	D	
	K_2HPO_4 (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	$NaHCO_3$ (g/L)	Ácido Succínico (g/L)
1	5.0	4.0	3.0	5.0	9,55
2	5.0	2.0	3.0	10.0	10,86
3	10.0	3.0	5.0	15.0	9,02
4	10.0	3.0	1.0	15.0	9,31
5	7.5	2.0	0.0	10.0	5,07
6	7.5	4.0	3.0	1.5	8,42
7	5.0	4.0	1.0	5.0	8,23
8	7.5	2.0	3.0	10.0	7,31
9	10.0	2.0	1.0	15.0	7,01
10	10.0	1.0	5.0	15.0	6,44
11	10.0	4.0	5.0	5.0	10,05
12	10.0	3.0	1.0	5.0	10,00
13	12.5	4.0	3.0	10.0	10,10
14	10.0	4.0	3.0	20.0	10,41
15	5.0	2.0	5.0	15.0	5,94
16	7.5	2.0	3.0	10.0	5,13
17	7.5	3.0	3.0	10.0	10,14
18	5.0	4.0	1.0	15.0	10,40
19	5.0	3.0	5.0	5.0	9,04
20	7.5	3.0	5.0	5.0	8,67
21	5.0	4.0	1.0	5.0	5,75
22	10.0	3.0	1.0	5.0	8,25
23	2.5	2.0	3.0	10.0	6,78
24	5.0	2.0	1.0	15.0	5,47
25	5.0	3.0	5.0	15.0	5,87
26	7.5	3.0	7.0	10.0	9,14
27	7.5	2.0	3.0	10.0	7,62
28 (CP)	7.5	3.0	3.0	10.0	8,15
29 (CP)	7.5	3.0	3.0	10.0	8,22
30 (CP)	7.5	3.0	3.0	10.0	8,10

Total: 8 ensaios com 3 repetições do ponto central - PC

Corroborando com os resultados obtidos pelo PFF 2^{4-1}, as Tabelas 5.10 e 5.11 mostram que o modelo mais adequado para o ajuste dos fatores, foi Modelo Quadrático Reduzido, baseado nos altos valores de R^2, indicando 99 % de viabilidade da resposta, para ambos os experimentos.

Tabela 5.10. Análise de variância (ANOVA) para concentração de ácido succínico no delineamento composto central rotacional (DCCR), para **xilose** como fonte de carbono

Efeito	SM	DF	QM	F valor	*p* > F
Model	149.903075	14	14.9903075	34.81492204	<0.0001
A	0.88166667	1	0.881666667	0.624275956	0.4418
B	22.0800164	1	22.0800164	45.63405313	0.0013
C	8.40166657	1	8.40166657	35.948913221	0.0276
D	87.1645267	1	88. 1645267	62.42759559	< 0.0001
AB	7.1824	1	7.1824	5.085595039	0.0395
AC	0.126025	1	0.126025	10.089233698	0.7693
AD	1.177225	1	1.177225	20.833550014	0.3757
BC	4.3264	1	4.3264	33.06336578	0.1000
BD	4.2849	1	4.2849	8.033981146	0.1020
CD	0.912025	1	0.912025	0.645771583	0.4342
Residual	21.1845416715		1.412302778		
Lack of Fit	39.18699167	9	3.918699167	35.80263114	0.0486
Pure Error	5.99755	5	0.39951		
	[Ácido succínico]:	[R-Squared = 0.995, Adj R-Squared = 0.9699]			

A: K_2HPO_4, B:$MgSO_4$, C: Extrato de Levedura; D: $NaHCO_3$.
SQ: Soma Quadrática (Sum of Squares); MQ: Média Quadrática (Mean square);
F= Fisher Calculado; *p* >F= Probabilidade de Fisher.
Os valores em vermelho são os correspondentes as variáveis que apresentaram significância estatística (p-Level < 0,1)

O modelo quadrático reduzido mostrou um bom ajuste aos dados experimentais, apresentando valores elevados de Fisher iguais a 34.81 e 40,17, para os ensaios conduzidos a partir de xilose e glicose, respectivamente. A falta de ajuste não foi significativa, com *p* > 0.1, confirmando o ajuste do modelo aos dados experimentais, em um intervalo de confiança de 90%.

Conforme foi observado, anteriormente, no PFF^{4-1}, a combinação entre K_2HPO_4 e extrato de levedura foi mantida no DCCR, confirmando o efeito significativo da interação entre ambos, com valores de probabilidade de Fisher iguais a 0,039 e 0,021 para xilose e glicose, respectivamente.

Tabela 5.11. Análise de variância (ANOVA) para concentração de ácido succínico no delineamento composto central rotacional (DCCR), para **glicose** como fonte de carbono

Efeito	SM	DF	QM	F valor	*p* > F
Model	151.17895	14	15,117895	40,17589563	<0.0001
A	1,04529163	1	1,045289163	0,421589630	0.47859
B	25,1459564	1	25.14589564	48,24526333	0.00089
C	9,25487667	1	9,254879667	41.94785966	0.01969
D	92,154263	1	92,1548263	67,1254896	< 0.0001
AB	8,5479625	1	8,5479625	6,457812568	0.02147
AC	0,3457894	1	0,3457894	11,145878962	0.84563
AD	2,2458963	1	2,2458963	22,0457896	0.47867
BC	6,154889	1	6,154889	40,147891	0.1000
BD	5,12789	1	5,12789	39,145789	0.1020
CD	1,120589	1	1,120589	0,8495662	0,5124
Residual	19,452789	15	1.2145868		
Lack of Fit	34,125789	9	3,4125789	31,4587896	0.0315
Pure Error	4,124566	5	0.247851		
	[Succinic acid]: [R-Squared = 0.992, Adj R-Squared = 0.9588]				

A: K_2HPO_4, B:$MgSO_4$, C: Extrato de Levedura; D: $NaHCO_3$.
SQ: Soma Quadrática (*Sum of Squares*); MQ: Média Quadrática (*Mean square*);
F= *Fisher* Calculado; *p* >F= Probabilidade de *Fisher*.
Os valores em vermelho são os correspondentes as variáveis que apresentaram significância estatística (p-Level < 0,1)

O modelo obtido pela análise estatística da fermentação realizada por *A. succinogenes* é representado pelas equações ajustadas (1) e (2), que equivalem à concentração de ácido succínico, em g/L, para os ensaios a partir de xilose e glicose, respectivamente.

[Ác. Succínico] = +12.02 +3.13 * A +0.60 * B+0.32 * C+0.75 * D+0.88 * A * B+0.91 * A * +1.31 * A * D-0.39 * B * C+0.73 * B * D+0.38 * C * D+0.55 * A^2-0.58 * B^2-0.50 * C^2+0.29* D^2 (1)

[Ác. Succínico] = +10.42 +2.48 * A +0.45 * B+0.24 * C+0.67 * D+0.72 * A * B+0.78 * A * +1,04 * A * D-0.27 * B * C+0.63 * B * D+0.25 * C * D+0.42 * A^2-0.47 * B^2-0.39 * C^2+0.18* D^2 (2)

O histrograma de influência das variáveis individuais e interações, analisadas pelo planejamento DCCR, é apresentado na Figura 5.18 para xilose e glicose, respectivamente. De forma similar ao PFF^{4-1}, o parâmetro D ($NaHCO_3$) apresentou maior influência na concentração final de ácido succínico, seguido do parâmetro B ($MgSO_4$) e do parâmetro C (extrato de levedura). Somado a isso, as combinações que apresentaram maior influência foram entre AB, seguido de BC, AD e CD, os quais apresentaram maior influência do que o parâmetro A (K_2HPO_4), quando analisado de forma isolada.

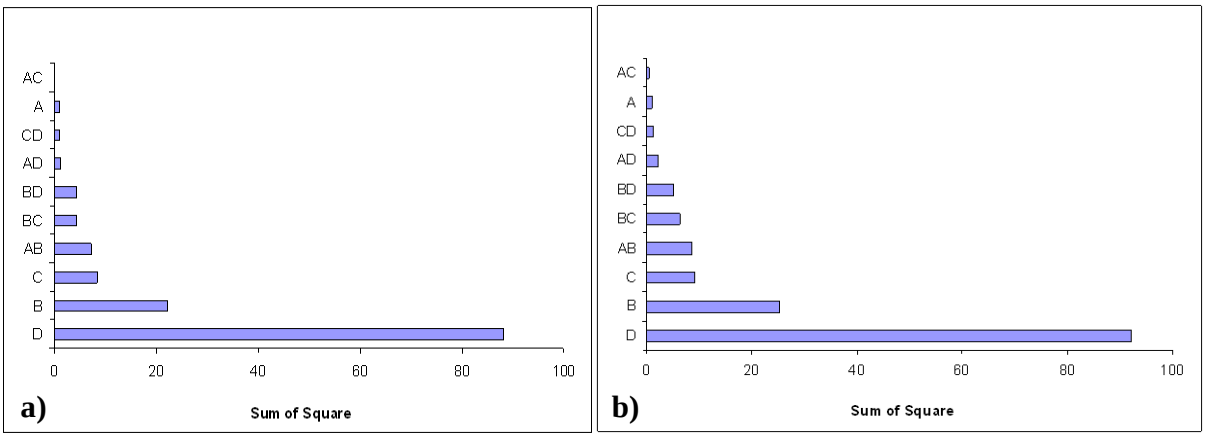

Figura 5.18. Histograma de influência das variáveis e suas interações, de acordo com a soma quadrática (*Sum of Squares*), para o DCCR com **xilose** (a) e **glicose** (b), respectivamente, considerando o intervalo de confiança de 90% (p<0,1). A: K_2HPO_4, B:$MgSO_4$, C: Extrato de Levedura, D: $NaHCO_3$.

As Figuras 5.19 e 5.20 mostram o contorno da superfície de resposta, em três dimensões (3-D), que representam as equações ajustadas para concentração final de ácido succínico para xilose e glicose, respectivamente. Ambos apresentaram o mesmo comportamento, como era de se esperar, com alterações apenas na concentração final de ácido succínico.

Em ambas as Figuras, 5.19a e 5.20a, podemos observar que o aumento das concentrações de $MgSO_4$ e extrato de levedura contribuem para aumentar a concentração final de ácido succínico. Analisando as Figuras 5.19c e 5.20c, o aumento na concentração de K_2HPO_4 contribui exerce efeito negativo, reduzindo a concentração final de ácido succínico. Porém, conforme pode ser visto nas Figuras 5.19b e 5.20b, há uma interação com efeito estatisticamente significativo entre K_2HPO_4 e extrato de levedura (AC).

A combinação entre as quatro variáveis mostram também um alto valor de Fisher, como foi mencionado nas tabelas de ANOVA, indicando um amplo grau de sinergismo entre estes nutrientes durante a fermentação por *A. succinogenes*, resultando em variações na concentração de ácido succínico, dependendo da concentração utilizada no meio. As Figuras 5.19d e 5.20d, mostram uma elevada interação entre $MgSO_4$ e $NaHCO_3$, confirmando a análise estatística.

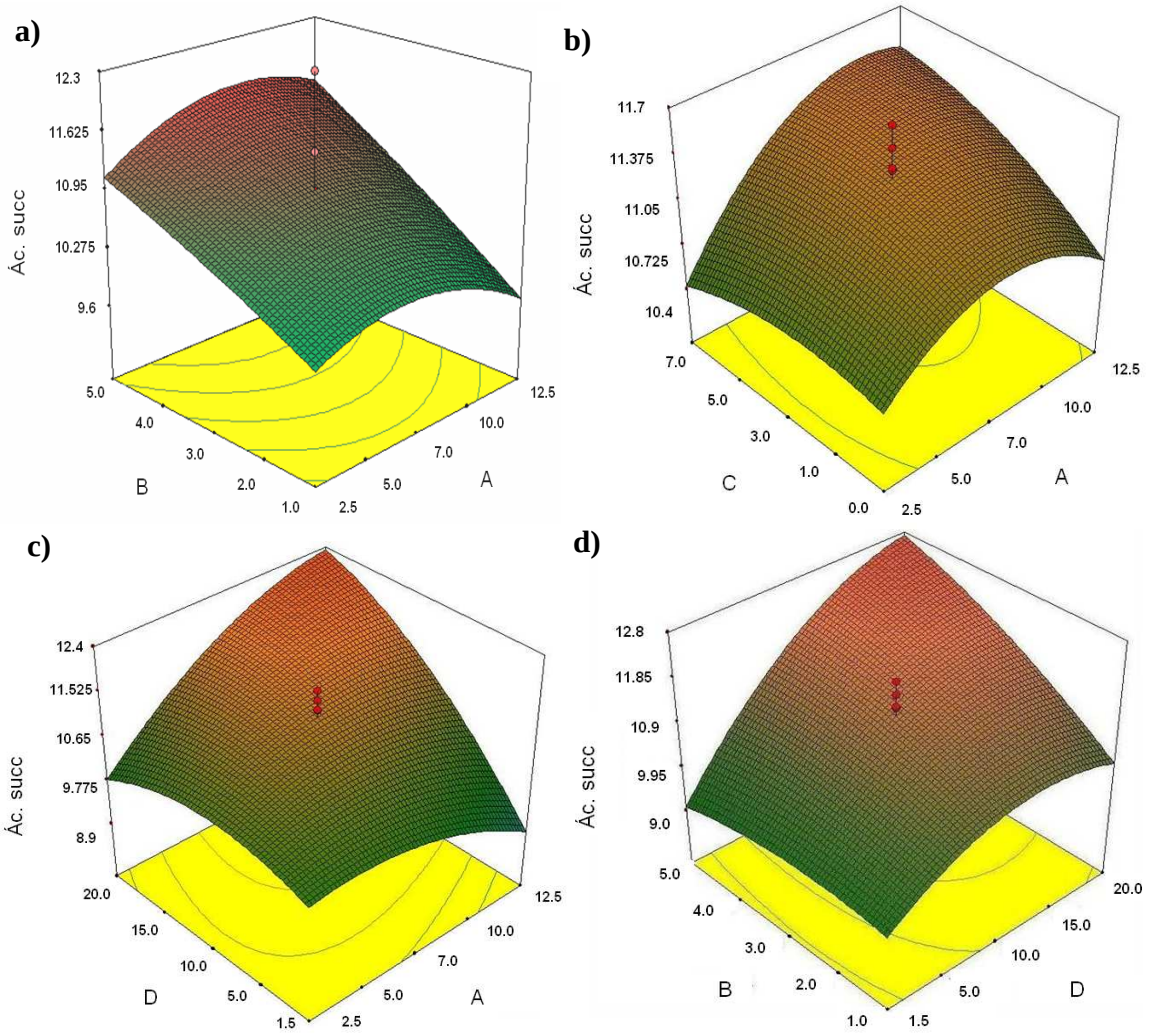

Figura 5.19. Superfície de resposta dos efeitos combinados entre os parâmetros sobre a concentração final de ácido succínico, pelo DCCR para **xilose**, como fonte de carbono. Interação entre os parâmetros AB (a); AC (b); AD (c); BD (d). A:K_2HPO_4, B: $MgSO_4$, C: extrato de levedura, D $NaHCO_3$.

A produção de ácido succínico por *A. succinogenes* foi incrementada quando a combinação de todos os nutrientes foi utilizada. Avaliando o fator de resposta (concentração final de ácido succínico), verifica-se que o ensaio de número 2 foi o mais eficiente, para ambos os açucares utilizados.

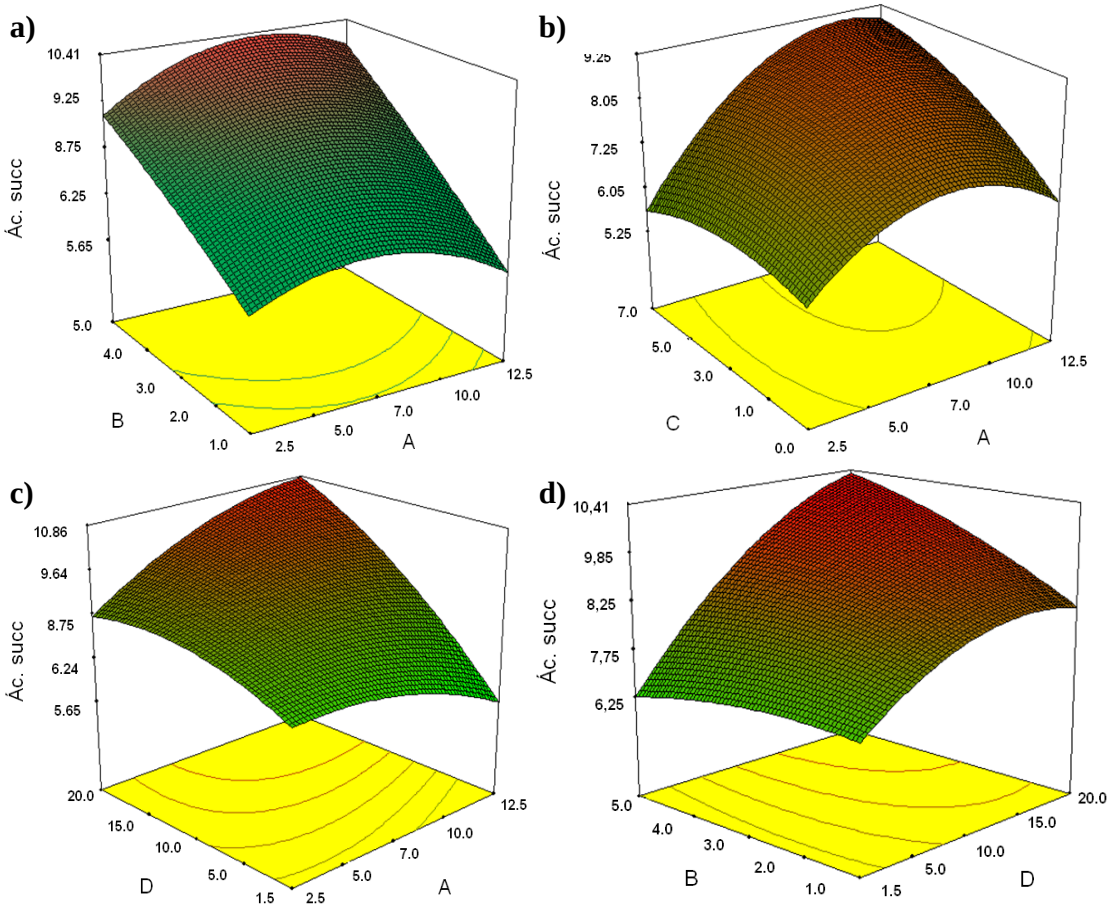

Figura 5.20. Superfície de resposta para os efeitos combinados dos parâmetros sobre a concentração final de ácido succínico, pelo DCCR para **glicose** como fonte de carbono. Interação entre os parâmetros AB (a); AC (b); AD (c); BD (d). A:K_2HPO_4, B: $MgSO_4$, C: extrato de levedura, D $NaHCO_3$.

Mantendo $MgSO_4$ em seu nível inferior (2.0 g/L) e extrato de levedura no ponto central (3.0 g/L), o ponto de máximo na concentração final de ácido sucínico pode ser obtido quando $NaHCO_3$ encontra-se em seu nível superior (10.0 g/L). Todavia, quando a fermentação ocorre em presença de níveis elevados de K_2HPO_4, a concentração final de ácido succínico é afetada. Como todos os nutrientes são necessários e essenciais para o metabolismo, em concentrações adequadas, os resultados mostraram a faixa ideal para cada variável, principalmente do extrato de levedura (fonte de nitrogênio), $NaHCO_3$ (íons sódio e fonte de CO_2) e $MgSO_4$ (fonte de magnésio e enxofre), de forma semelhante ao encontrado por SONG & LEE (2007). LIU *et al*. (2008) demonstraram que não houve inibição significativa do crescimento celular ou na produção de ácido succínico por íons de magnésio, em meio contendo K_2HPO_4 por *A. succinogenes* CGMCC1593. Dessa forma, à análise de variância mostrou que o modelo quadrático reduzido escolhido, foi adequado para o ajuste dos dados experimentais, tornando possível a validação de resultados em biorreator, segundo condições otimizadas.

Em suma, os componentes do meio, após esta etapa de otimização e estudo da influência das variáveis foram definidos com a seguinte composição: xilose e glicose 20 g/L; extrato de levedura 5.0 g/L, $MgSO_4$ 3.0 g/L, $NaHCO_3$, 10 g/L e K_2HPO_4 5.0 g/L.

Com relação ao extrato de levedura, LIU e*t al*. (2008) obtiveram respostas diferentes, pois observaram que ao aumentar a concentração deste nutriente no meio de cultivo havia um aumento na concentração do ácido succínicio. Vale ressaltar que estes autores isolaram uma nova cepa de *Actinobacillus succinogenes* diferente da utilizada neste trabalho. De qualquer forma, o efeito da concentração de extrato de levedura será re-avaliado no próximo planejamento experimental, em concentrações maiores, associado aos efeitos da fonte de carbono (glicose e xilose) e das condições de cultivo do processo: pH, agitação, temperatura.

5.7. Planejamento Experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1}

Foi desenvolvido um Planejamento Experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} (PFF), baseado em Gonzales & Ubeda (2008), com dois níveis (inferior, -1 e superior, +1), totalizando 19 ensaios (16 ensaios independentes e 3 repetições do ponto central – PC), para avaliar o efeito das seguintes variáveis: concentração das fontes de carbono (glicose e xilose), concentração de extrato de levedura, temperatura, pH inicial e agitação. Cabe ressaltar, que a composição dos outros componentes do meio de fermentação são diferentes daqueles propostos por Gonzáles & Ubeda (2008), além do acréscimo de ensaios paralelos com xilose como fonte de carbono, durante os estudos com o presente trabalho.

A hierarquização dos efeitos foi estimada, de forma similar aos estudos anteriores, mediante análise de variância (ANOVA), diagrama de Pareto e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

As Tabelas 5.12 e 5.13 apresentam os resultados da matriz dos experimentos realizados por um período de 24h e 48h de fermentação, para glicose e xilose, respectivamente. Observou-se que, na maioria dos ensaios, houve uma correlação entre o crescimento celular e a produção do ácido succínico.

Analisando estes resultados, verifica-se que a concentração final de ácido succínico variou de 2,75 a 14,18 g/L e 4,18 a 15,12 g/L para glicose e xilose, respectivamente.

Os maiores valores de concentração final de ácido succínico foram obtidos nos ensaios 1 e 4, para cada caso, respectivamente, porém sob as mesmas condições: fonte de carbono 40 g/L; extrato de levedura 11g/L; temperatura 41^0C; pH 8,0 e agitação de 300rpm, num tempo de 48h de fermentação. Estes resultados estão de acordo com alguns encontrados na literatura, tendo comportamento semelhante a Gonzáles & Ubeda (2008), conforme esperado, aumentando o grau de confiabilidade destes estudos.

Tabela 5.12. Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado PFF 2^{5-1} e resultados correspondentes para a concentração final de ácido succínico, para **glicose** como fonte de carbono, em 24 e 48 horas de fermentação

Ensaios	Glicose (g/L)	E.L (g/L)	Temperatura (ºC)	pH	Agitação (rpm)	Ác. succínico (g/L)	
						24 h	48 h
1	40	11	42	8	300	14,18	13,61
2	40	11	42	6	100	4,72	4,93
3	40	11	32	8	100	8,79	11,34
4	40	11	32	6	300	4,58	4,48
5	40	5	42	8	100	11,30	10,68
6	40	5	42	6	300	4,18	4,16
7	40	5	32	8	300	8,26	12,66
8	40	5	32	6	100	4,47	4,77
9	20	11	42	8	100	10,98	10,60
10	20	11	42	6	300	2,91	3,08
11	20	11	32	8	300	8,08	8,75
12	20	11	32	6	100	4,31	4,74
13	20	5	42	8	300	11,27	11,83
14	20	5	42	6	100	4,58	5,65
15	20	5	32	8	100	8,6	8,72
16	20	5	32	6	300	2,8	2,75
17 (PC)	30	8	37	7	200	9,65	9,63
18 (PC)	30	8	37	7	200	8,10	8,44
19 (PC)	30	8	37	7	200	9,45	10,23

Tabela 5.13. Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} e resultados correspondentes a concentração final de ácido succínico, para **xilose** como fonte de carbono, em 24 e 48 horas de fermentação

Ensaios	Xilose (g/L)	E.L (g/L)	Temperatura (ºC)	pH	Agitação (rpm)	Ác. succínico (g/L)	
						24 h	48 h
1	40	11	32	6	300	6,11	5,94
2	40	5	42	8	100	9,98	9,51
3	40	5	42	6	300	5,71	5,62
4	40	11	42	8	300	15,01	15,12
5	40	11	42	6	100	5,25	5,93
6	40	11	32	8	100	10,32	11,00
7	20	11	42	6	300	5,44	5,54
8	20	11	32	8	300	8,51	9,24
9	20	11	32	6	100	6,84	6,2
10	40	5	32	8	300	8,79	9,66
11	40	5	32	6	100	5,00	5,96
12	20	11	42	8	100	12,89	12,16
13	20	5	32	8	100	10,13	9,52
14	20	5	32	6	300	4,33	4,18
15	20	5	42	8	300	10,08	10,06
16	20	5	42	6	100	6,11	10,65
17 (PC)	30	8	37	7	200	11,08	11,73
18 (PC)	30	8	37	7	200	10,52	10,23
19 (PC)	30	8	37	7	200	9,6	9,44

Com 20 g/L de concentração inicial de glicose foram obtidos aproximadamente 11,0 g/L de ácido succínico (Tabela 5.12), valor similar ao encontrado por CORONA *et al*. (2007), de 10,5 g/L, durante 32 horas de fermentação, a 37ºC, pH 7.0 e 200 rpm.

ISAR *et al.* (2006), estudando a produção de ácido de succinico por *E. coli*, sob condições anaeróbicas, a partir do Delineamento Composto Central de Faces-centradas (DCCCF) na avaliação das condições de cultivo, encontraram uma concentração final de ácido succínico de, aproximadamente, 14 g/L, sob agitação de 250 rpm, em 48 horas, com uma composição de meio de cultivo que incluia $MgCO_3$ ao invés de $NaHCO_3$.

Foi possível verificar que as maiores concentrações de ácido succínico, acima de 8,08 g/L e 8,51 g/L para glicose e xilose, respectivamente, tiveram como característica o ajuste de pH para 7,0 ou 8,0 no meio de fermentação. VAN DER WERF *et al*. (1997) relataram que o crescimento celular é afetado de forma negativa em valores de pH inferiores a 6,0, resultando em maiores gastos de energia durante as atividades metabólicas do microrganismo.

As Tabelas 5.14 e 5.15 apresentam os efeitos das cinco variáveis estudadas e seus respectivos erros, obtidos a partir de análise estatística, na concentração final de ácido succínico, em 24 horas de fermentação para glicose e xilose, respectivamente. Uma alternativa interessante para simplificar o modelo, realizada com amplo aval da literatura, consiste em excluir os parâmetros com pequena ou nenhuma influência sobre o resultado do ajuste final. Com isso teremos um modelo com número reduzido de dados, portanto mais simples, , também utilizado por Gonzales & Ubeda (2008), ao qual denominamos Modelo Reparametrizado Reduzido da tabela ANOVA (RODRIGUES, 2010).

Tabela 5.14. Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} sob a concentração de ácido succínico, em 24 horas de processo a partir de **glicose**.

Parâmetros	Efeito	Erro Padrão	t(2)	*p*-valor
MÉDIA	7,01	0,51	14,1	<0,0001
Glicose	0,22	1,57	0,15	0,96
Extrato de Levedura	0,20	1,57	0,06	0,962
Temperatura[a]	3,15	1,57	2,65	0,0485
pH[a]	7,25	1,57	6,02	<0,0001
Agitação	-0,48	1,57	-0,46	0,6015

[a] $p < 0,1$

Pela tabela ANOVA, o ajuste mais adequado com os dados experimentais foi obtido, novamente, modelo quadrático reduzido, com valores de R^2 iguais a 0.992 e 0,995, erro padrão de 0,51 e 0,58, para glicose e xilose, respectivamente.

Tabela 5.15. Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} sob a concentração de ácido succínico, em 24 horas de processo a partir de **xilose.**

Parâmetros	Efeito	Erro Padrão	t(2)	*p*-valor
MÉDIA	7,56	0,58	14,55	<0,0001
Xilose	0,31	2,06	0,19	0,97
Extrato de Levedura	0,29	2,03	0,21	0,99
Temperatura[a]	3,45	2,06	3,42	0,0416
pH[a]	7,41	2,04	6,57	<0,0001
Agitação	-0,65	2,09	-0,63	0,6485

[a] $p < 0.1$

Analisando os efeitos principais de cada parâmetro, verifica-se que as variáveis pH e temperatura foram estatisticamente significativas a $p<0.1$, com efeito positivo, sinalizando para um aumento nos respectivos valores para condução do processo. Comparando a média dos efeitos, o pH foi a variável que apresentou maior influência, indicando um aumento de até 7,25 e 7,41 g/L na concentração de ácido succínico para tempo de fermentação de 24h, quando altera-se o valor do nível -1(pH 6.0) para o +1(pH 8.0) para glicose e xilose, respectivamente. Gonzáles & Ubeda (2008) encontraram valores iguais a 6,97g/L. O mesmo comportamento foi detectado em vários estudos envolvendo avaliação das melhores condições de processo para microrganismos produtores de ácidos orgânicos, com valores de pH iguais a 7.2 (LEE *et al*., 1998; SAMUELOV *et al*., 1991).

O efeito estimado para o extrato de levedura apresentou uma pequena variação na concentração de ácido succínico, de 0,20 e 0,29 g/L para glicose e xilose, respectivamente. A agitação não promoveu influência estatisticamente significativa, e ainda apresentou efeito negativo sobre a produção de ácido succínico de -0,48 e -0,65g/L para glicose e xilose, respectivamente. Isto ocorre quando a velocidade de agitação é alterada do nível inferior (100 rpm) para o nível superior (300 rpm).

A concentração de glicose e xilose apresentaram um efeito positivo, em 24 horas de fermentação, porém um efeito negativo para 48 horas, mas não significativo, de p=0,3897 e 0,3004 (Tabelas 5.16 e 5.17).

Tabela 5.16. Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} sobre a concentração de ácido succínico como resposta (48h) para **glicose**

Parâmetros	Efeito	Erro Padrão	t(2)	*p*-valor
MÉDIA	7,62	0,50	19,48	<0,0001
Glicose	-1,42	1,05	-1,06	0,3897
Extrato de Levedura	-1,56	1,05	-1,42	0,2001
Temperatura[a]	1,30	1,05	1,15	0,3112
pH[a]	7,10	1,05	7,75	<0,0001
Agitação	-0,90	1,05	-0,84	0,4998

[a] $p < 0.1$

Tabela 5.17. Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário PFF 2^{5-1} sobre a concentração de ácido succínico como resposta (48h) para **xilose**.

Parâmetros	Efeito	Erro Padrão	t(2)	*p*-valor
MÉDIA	8,52	0,55	20,12	<0,0001
Xilose	-1,19	1,12	-1,64	0,3004
Extrato de Levedura	-1,21	1,12	-1,23	0,1102
Temperatura[a]	1,42	1,12	1,42	0,2986
pH[a]	7,22	1,12	8,06	<0,0001
Agitação	-0,94	1,12	-0,95	0,5102

[a] $p < 0.1$

Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Gonzales & Ubeda (2008) e mostraram que a produção de ácido succínico, no tempo de 48horas, teve influência positiva e significativa (p<0.1) apenas do pH inicial, promovendo um aumento na concentração de ácido succínico de 7,10 e 7,22 g/L para os processos com glicose e xilose, respectivamente. Assim como ocorrido em 24 horas de fermentação, o extrato de levedura não foi significativo, além de gerar efeitos negativos sobre a produção de ácido succínico, iguais a -1,56 e -1,21 g/L para glicose e xilose, respectivamente.

O efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a concentração final de ácido succínico, em 24 horas de processo, pode ser visto no diagrama de Pareto (Figura 5.21), que estabelece do mesmo modo que a tabela ANOVA, quais destes efeitos encontram-se dentro do grau de confiança estabelecido para a análise (90%).

Para 24 horas, a ordem dos efeitos, sobre a produção de ácido succínico é iniciada pelo pH, seguida da temperatura, fonte de carbono e extrato de levedura, que apresentou pouca influência sobre a variável de resposta. Mesmo que a influência do extrato de levedura não seja estatisticamente significativa, de acordo com valores de p, o efeito foi negativo, indicando uma redução da concentração de extrato de levedura (nível inferior).

.

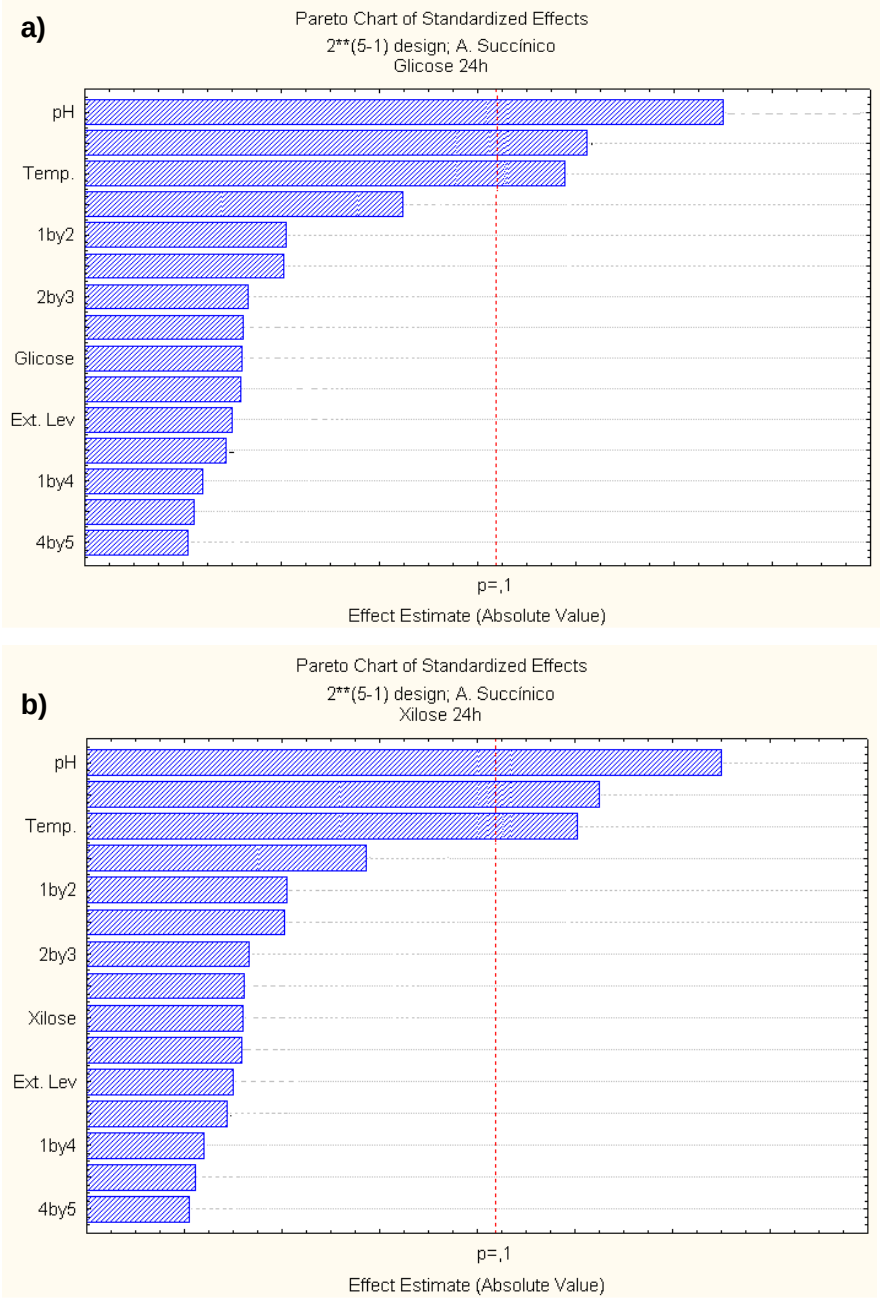

Figura 5.21. Diagrama de Pareto para os efeitos estimados pelo PFF 2 $^{5-1}$ para **glicose** (a) e **xilose** (b), em 24 horas de fermentação

Normalmente, a bactéria *A. succinogenes* é caracterizada por ser um microrganismo exigente em relação à composição dos nutrientes. Sendo assim, o extrato de levedura, contendo proteínas, lipídeos, vitaminas e outros, é considerado um nutriente importante para o crescimento celular e, consequentemente para a obtenção de ácido succínico (JIANG *et al.,* 2010). Porém, o seu uso pode aumentar os custos do processo (URBANCE *et al.,* 2003). Por outro lado, estudos recentes demonstram que a deficiência da fonte de nitrogênio estimula a síntese de outros metabólitos secundários, como o ácido acético e ácido fórmico, que podem inibir o crescimento celular (PAPANIKOLAOU *et al.,* 2004). Sendo assim, o modelo proposto

sugere o uso de extrato de levedura em concentrações inferiores, uma vez que os outros parâmetros exercem maiores efeitos sob a concentração final de ácido succínico. Para 48 horas de fermentação, a ordem de efeitos estimados foi semelhante ao caso anterior, conforme mostra a Figura 5.22, onde o pH foi a variável de efeito majoritário, seguido da temperatura que não foi significativa a $p<0,1$ mas seu efeito foi positivo, para glicose e xilose, respectivamente, indicando a condução do processo em níveis superiores de pH.

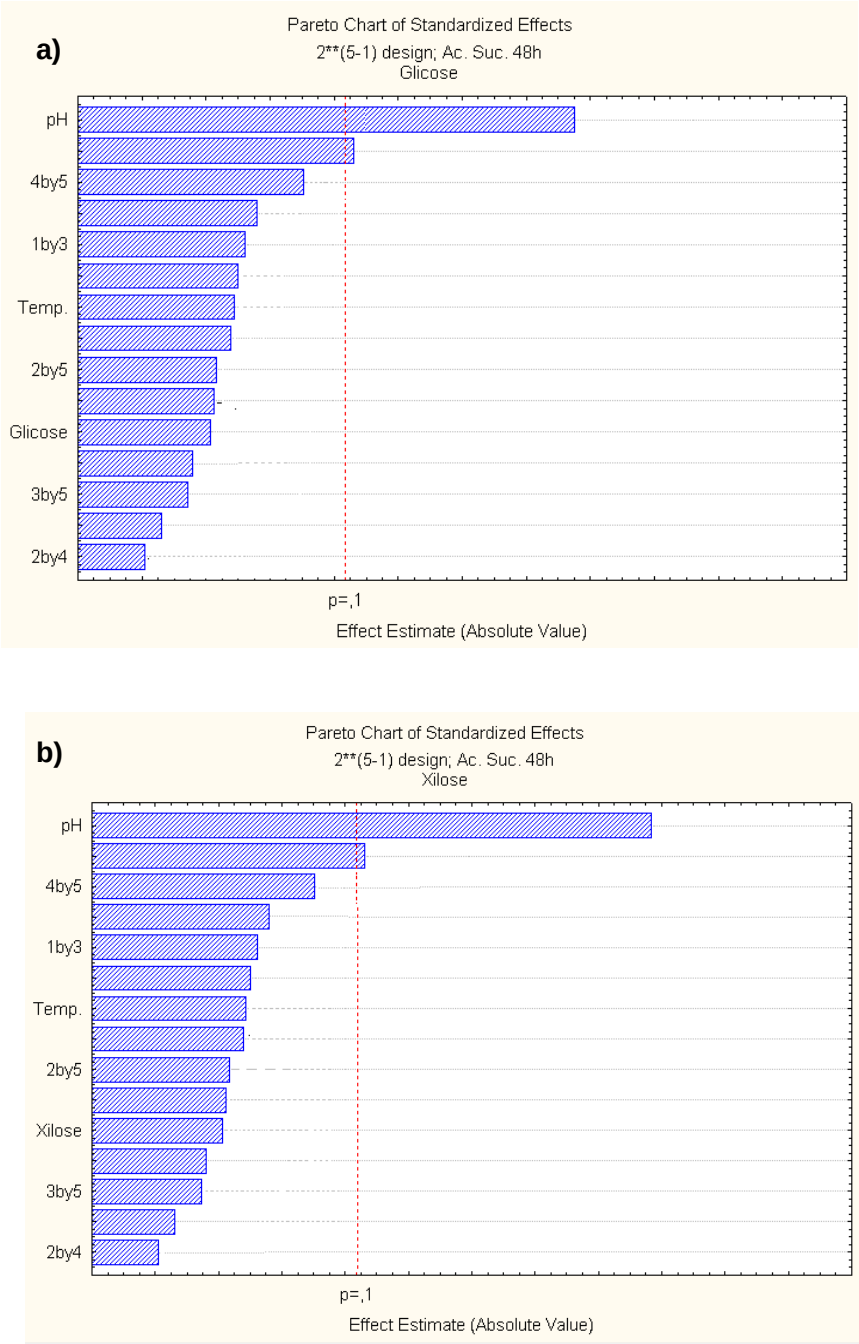

Figura 5.22. Diagrama de Pareto para os efeitos estimados pelo PFF 2^{5-1} para **glicose** (a) e **xilose** (b), em 48 horas de fermentação

Nas Figuras 5.23 e 5.24 estão apresentados os resultados, obtidos segundo Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), para a concentração de ácido succínico em função da interação entre a temperatura e o pH, que foram as variáveis com os maiores efeitos estimados, segundo a tabela ANOVA e o Diagrama de Pareto.

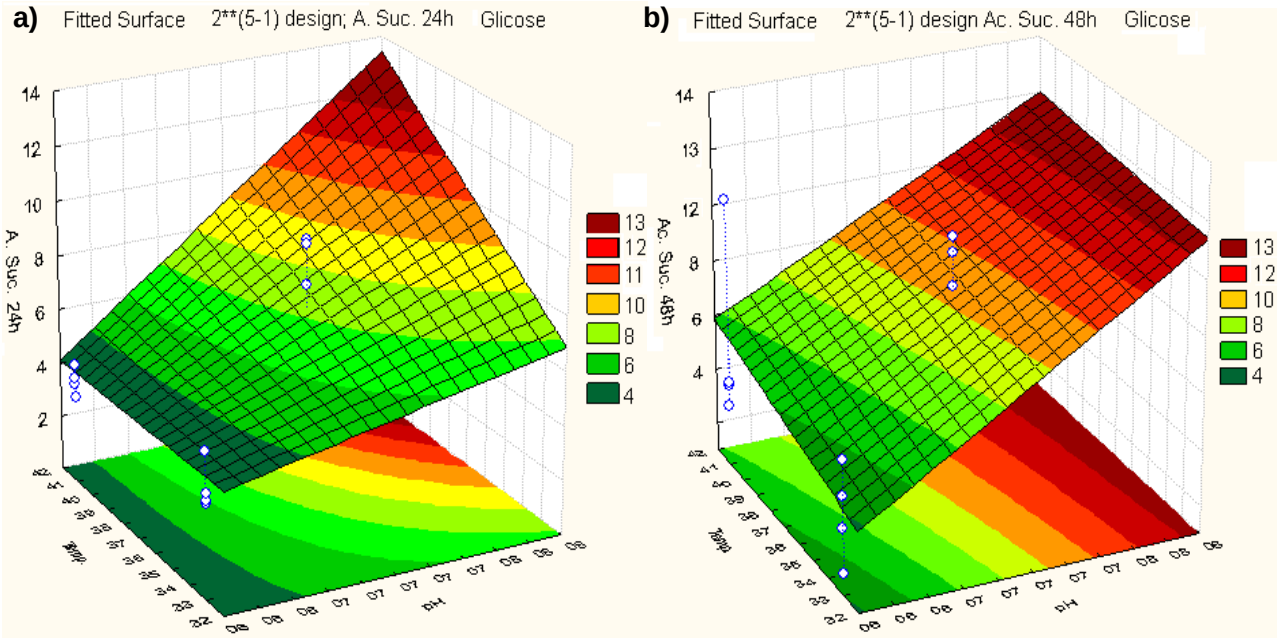

Figura 5.23. Superfície de resposta da concentração de ácido succínico a partir de **glicose**, em função das variáveis pH e temperatura, em 24 (a) e 48 (b) horas de fermentação.

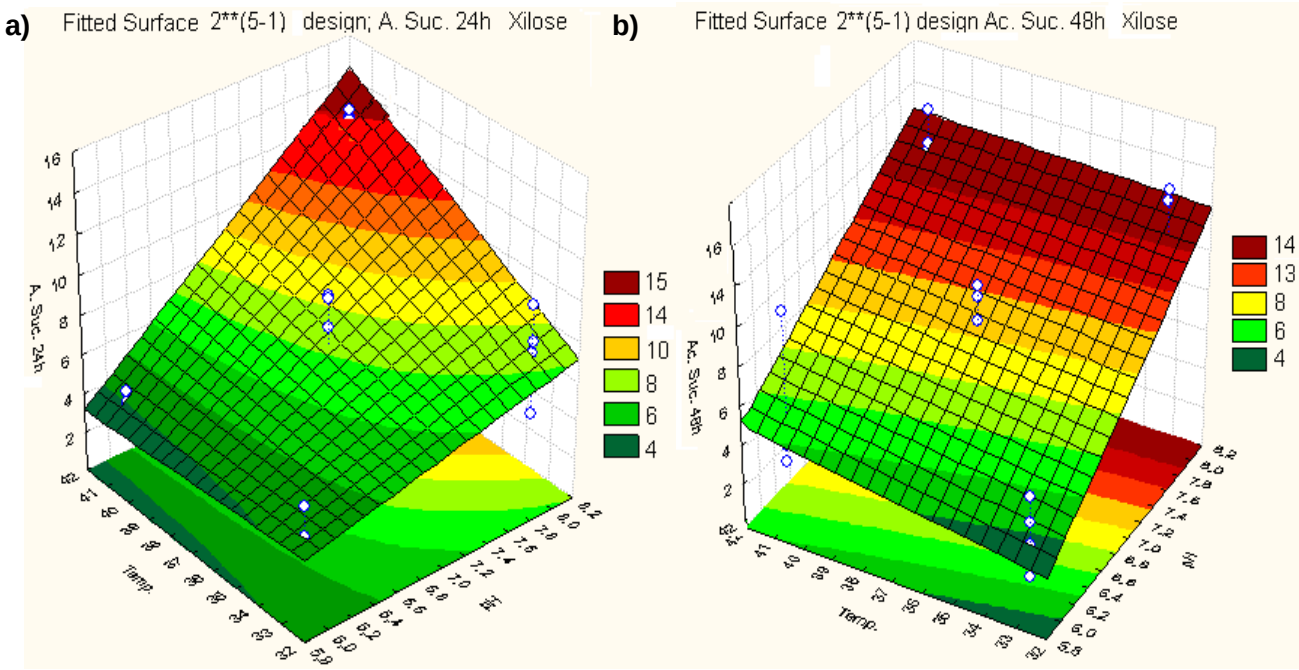

Figura 5.24. Superfície de resposta da concentração de ácido succínico a partir de **xilose**, em função das variáveis pH e temperatura, em 24 (a) e 48 (b) horas de fermentação.

Resultados similares a este foram observados durante estudos com *M. succiniciproducens* KCTC 0769, nos quais a produção de ácido succínico apresentou um ligeiro acréscimo com uma temperatura de 39ºC, ao passo que os efeitos combinados de pH e temperatura sobre a atividade enzimática contribuiram para a obtenção de maiores rendimentos em produto (HU *et al.*, 2004).

Pela análise dos resultados, uma etapa posterior, envolvendo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), poderia ser desenvolvida para a avaliação de apenas três variáveis: pH, temperatura e extrato de levedura. Porém, mesmo sem a visualização da curvatura com valor de máximo absoluto, a superfície de distibuição de frequência (plana) mostrou-se suficiente e significativa, indicando o aumento na concentração de ácido succínico, nas regiões onde o pH e temperatura são fixados em seus npiveis inferiores (24 horas), não havendo a necessidade do desenvolvimento de uma etapa seqüencial (DCCR).

Com os resultados apresentados até esta etapa, foi possível registrar a capacidade da linhagem em consumir xilose e glicose, abrindo uma oportunidade para o aproveitamento e a utilização das frações hemicelulósica e celulósica, oriundas do pré-tratamento da biomassa residual, de composição lignocelulósica.

5.8. Ensaios experimentais em biorreator

Os resultados obtidos com as variáveis e valores significativamente mais favoráveis à produção de ácido succínico, segundo os experimentos conduzidos anteriormente em frascos agitados, foram validados em biorreator.

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em meio sintético, com concentrações iniciais de nutrientes anteriores e posteriores aos estudos de otimização, para facilitar a avaliação dos possíveis ganhos em termos de concentração final de ácido succínico, produtividade volumétrica (Q_p), rendimento em produto ($Y_{p/s}$) e eficência de conversão em produto (E_f), de acordo com o tempo para o esgotamento do substrato e crescimento celular. Adicionalmente, foram desenvolvidos os ensaios em meio contendo o hidrolisado hemicelulósico, obtido após a etapa de pré-tratamento da matéria-prima.

As concentrações iniciais de xilose, adotadas para a condução dos experimentos de fermentação, foram de 22, 52 e 80 g/L, simulando os valores de concentração inicial de xilose presentes na fração hemicelulósica do bagaço de cana, obtida de acordo com a metodologia de BETANCUR (2010).

Para cada ensaio, o processo foi desenvolvido em ausência e presença de suprimento externo de CO_2, visando avaliar sua imprescindibilidade na formação de produto e subprodutos. A Figura 5.25 apresenta os perfis cinéticos de fermentação para a obtenção de

ácido succínico em meio sintético, com os valores de concentração de nutrientes anteriores aos estudos de otimização do processo. Os ensaios foram realizados em 24 horas de fermentação, a 37ºC sob 150 rpm, com concentração inicial de xilose igual a 20 g/L e concentração inicial de células de aproximadamente 2,0 g/L, em ausência e presença de suprimento externo de CO_2 a 0,05 vvm, respectivamente.

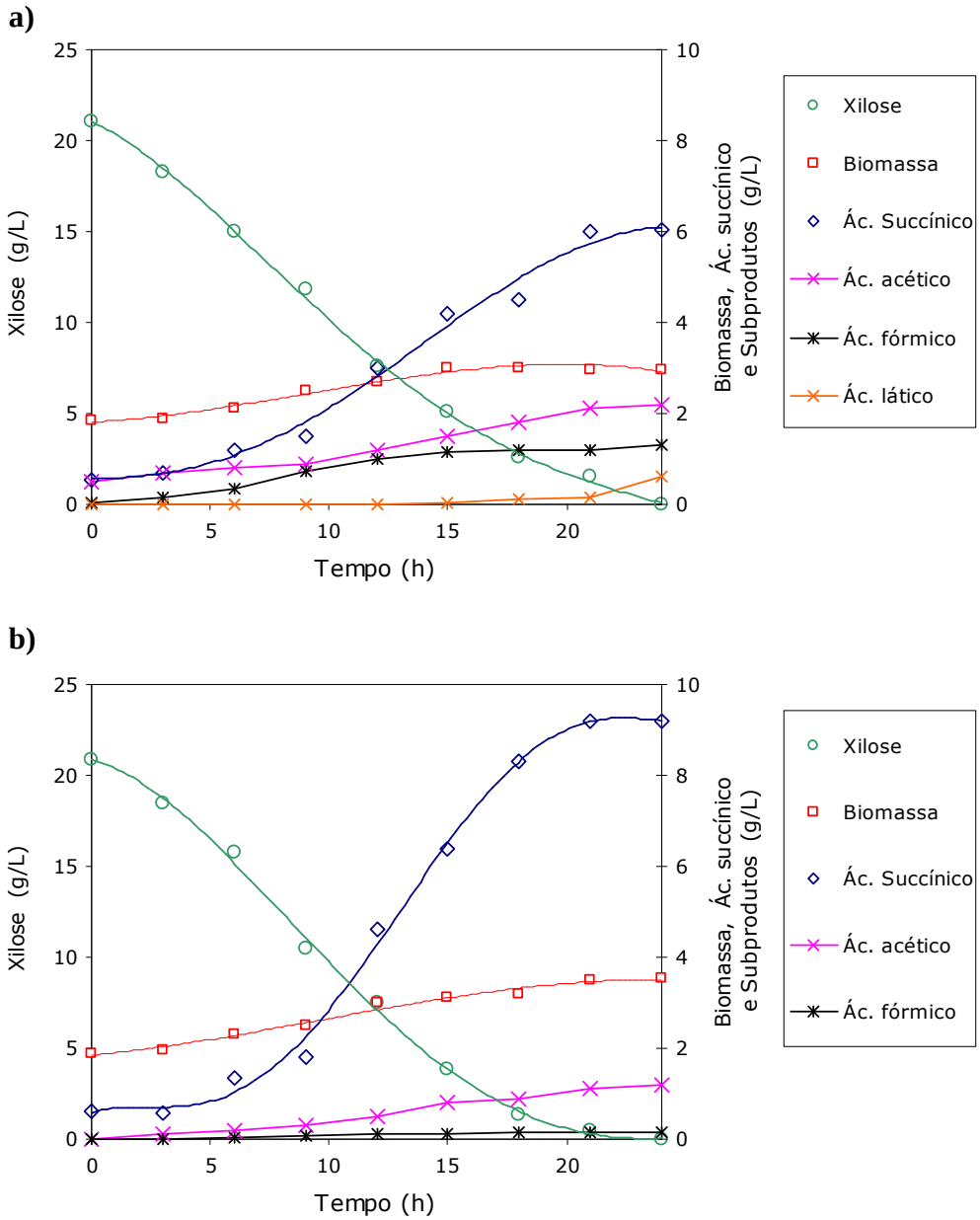

Figura 5.25. Fermentação em meio sintético, com 22,0 g/L de **xilose**, sob condições controladas (37℃, pH 7.0, 150 rpm). Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0.05 vvm.

Os valores para a concentração final de ácido succínico, produtividade volumétrica, Qp; rendimento em produto, (Yp/s) e para a eficiência, em relação ao rendimento máximo teórico ($Yp/s_{teórico}$, 1,12g ácido succínico/g xilose consumido), mostraram um acréscimo de 6,04 para 9,2 g/L, 0,25 para 0,41g /L.h, 0,23 para 0,36 g/g e de 17,1 para 26,9% para os processos

realizados em ausência e presença de suprimento externo de CO_2, respectivamente. Neste último, houve uma redução na concentração de ácido acético, de 2,2 para 1,2 g/L, enquanto a formação de outros subprodutos não foi identificada, com exceção de ácido fórmico (0,15 g/L). Nota-se ainda que, o tempo de esgotamento de xilose foi relativamente menor, de aproximadamente 22 horas, com efeito positivo sobre a produtividade volumétrica. Além disso, nota-se um acréscimo na concentração final de células para 3,5 g/L. No ensaio isento de suprimento externo de CO_2, a concentração de ácido acético continua aumentando (2,2 g/L), após aproximadamente 15 horas de fermentação, enquanto a concentração de ácido fórmico (1,3 g/L) manteve-se constante. A concentração de ácido lático apresentou um ligeiro aumento (0,67 g/L), não associado ao crescimento celular.

Estes resultados sugerem que, além da presença de presença de $NaHCO_3$ (fonte de CO_2) no meio de cultivo (WIDELL *et al.,* 1992), as estratégias para o desenvolvimento de um processo para a produção de ácido succínico, devem incluir o suprimento externo de CO_2 puro, para aumentar a concentração final de produto (GUETLER *et al.*, 1996). A ação de enzimas (PEP carboxiquinase), presentes no metabolismo de *A. succinogenes*, induzem a rota metabólica preferencialmente para a formação de succinato, dependendo do nível de CO_2 presente no sistema (VEMURI *et al*., 2002), conforma foi evidenciado na Figura 2.16.

A Figura 5.26 apresenta os perfis cinéticos de fermentação para a obtenção de ácido succínico, em meio com a concentração dos nutrientes definida após os estudos de otimização, em 24 horas de fermentação. Os ensaios foram conduzidos com uma concentração inicial de xilose igual a 20 g/L e concentração inicial de células de aproximadamente 2,0 g/L, em ausência e presença de suprimento externo de CO_2 a 0,05 vvm, respectivamente.

De forma semelhante ao experimento anterior, nota-se um aumento na concentração final de ácido succínico, quando utilizado o meio com a composição de nutrientes otimizada, segundo os planejamentos seqüenciais. Isso somado ao suprimento de externo de CO_2 a 0,05 vvm, durante todo o processo, resultou em uma redução na concentração final de ácido acético, de 4,74 para 2,0 g/L, um aumento na concentração final de células, de 3,6 para 4,15 g/L, e um tempo para o esgotamento total de xilose de aproximadamente 21 horas, com um acréscimo na produtividade volumétrica (Q_P), de 0,47 para 0,66 g/L.h.

A formação de ácido acético, na Figura 5.26a, continuou aumentando após 12 horas de fermentação, com início da estabilização celular, ao passo que o ácido fórmico e o ácido lático se apresentam constantes até o final do processo, com concentrações iguais igual a 1,44 e 1,1 g/L, respectivamente. Na Figura 5.26b, a concentração de ácido acético se mantém constante (2,0 g/L), após 12 horas de processo, enquanto o crescimento celular mantém seu crescimento exponencial. Não foram identificados outros subprodutos neste ensaio, além de uma concentração final de ácido fórmico próxima de zero.

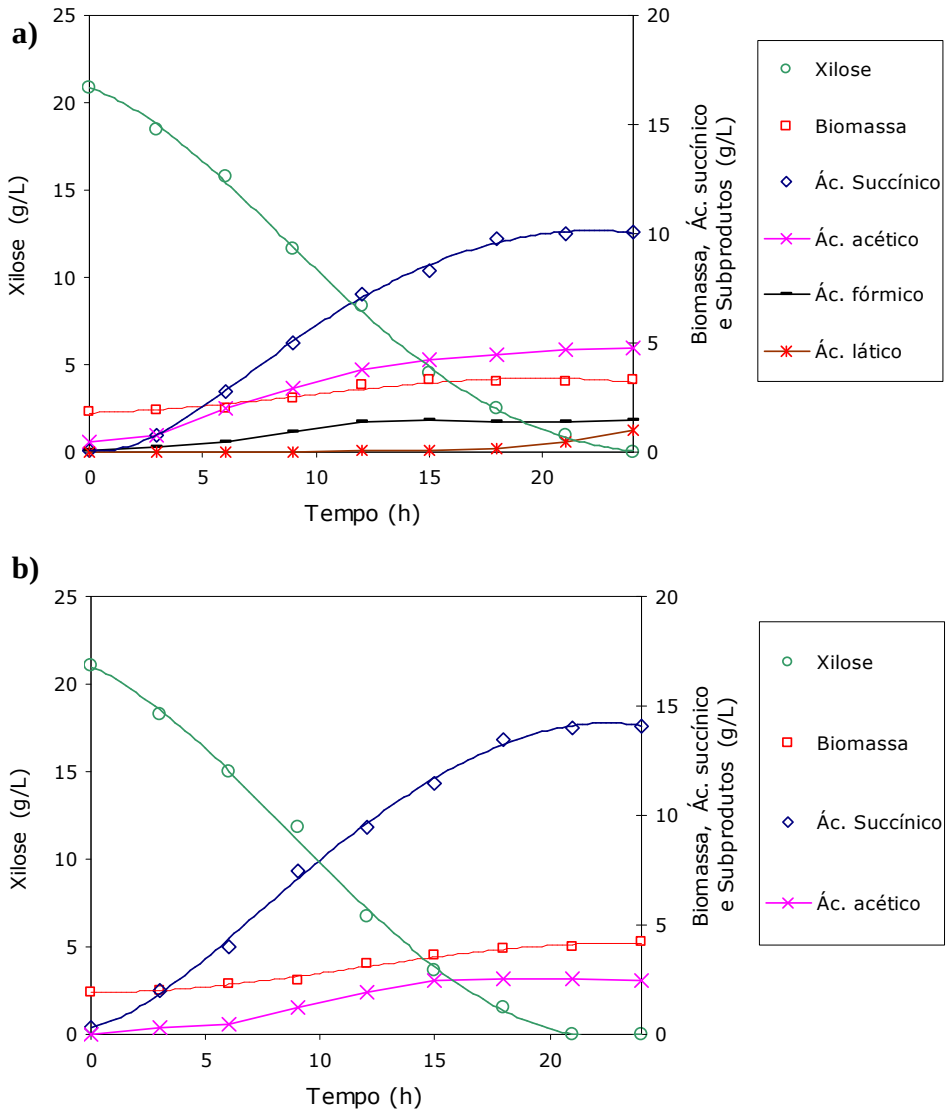

Figura 5.26. Fermentação em meio sintético de composição definida após os estudos de otimização, com 22,0 g/L de **xilose**, sob condições controladas (37℃, pH 7.0, 150 rpm) . Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0.05 vvm.

A concentração final de ácido succínico, o rendimento em produto, a produtividade volumétrica e a eficiência em relação ao rendimento máximo teórico ($Yp/s_{teórico}$, 1,12g ácido succínico/g xilose consumido), apresentaram um aumento de 10,04 para 14,2 g/L, 0,37 para 0,57 g/g, de 0,47 para 0,66 g/L.h e de 27,6 para 42,5%, em ausência e presença do suprimento externo de CO_2, respectivamente. Estes resultados apresentaram uma concentração de ácido succínico maior do que o valor encontrado por LEE *et al*. (2002), que obtiveram 13,5 g/L de ácido succínico, quando o meio foi suplementado de forma similar, em presença de CO_2, durante um processo fermentativo por *M. succiniciproducens*.

A Figura 5.27 apresenta o perfil cinético de fermentação, com células aclimatadas em duas etapas utilizando hidrolisado obtido nas condições ótimas, preditas estatisticamente, por BETANCUR (2010). Neste caso, a fermentação foi conduzida por 24 horas, com uma

concentração inicial de xilose igual a aproximadamente 22 g/L, obtido em meio contendo 25% de hidrolisado hemicelulósico, suplementado com os mesmos nutrientes essênciais, cuja composição foi definida após os estudos de otimização. Da mesma forma, os ensaios foram monitorados sob as mesmas condições anteriores. Observando o perfil cinético obtido com os ensaios, nota-se em ambos os casos, o aparecimento de glicose e arabinose, em pequenas concentrações, iguais a aproximadamente 1,1 e 3,0 g/L, respectivamente.

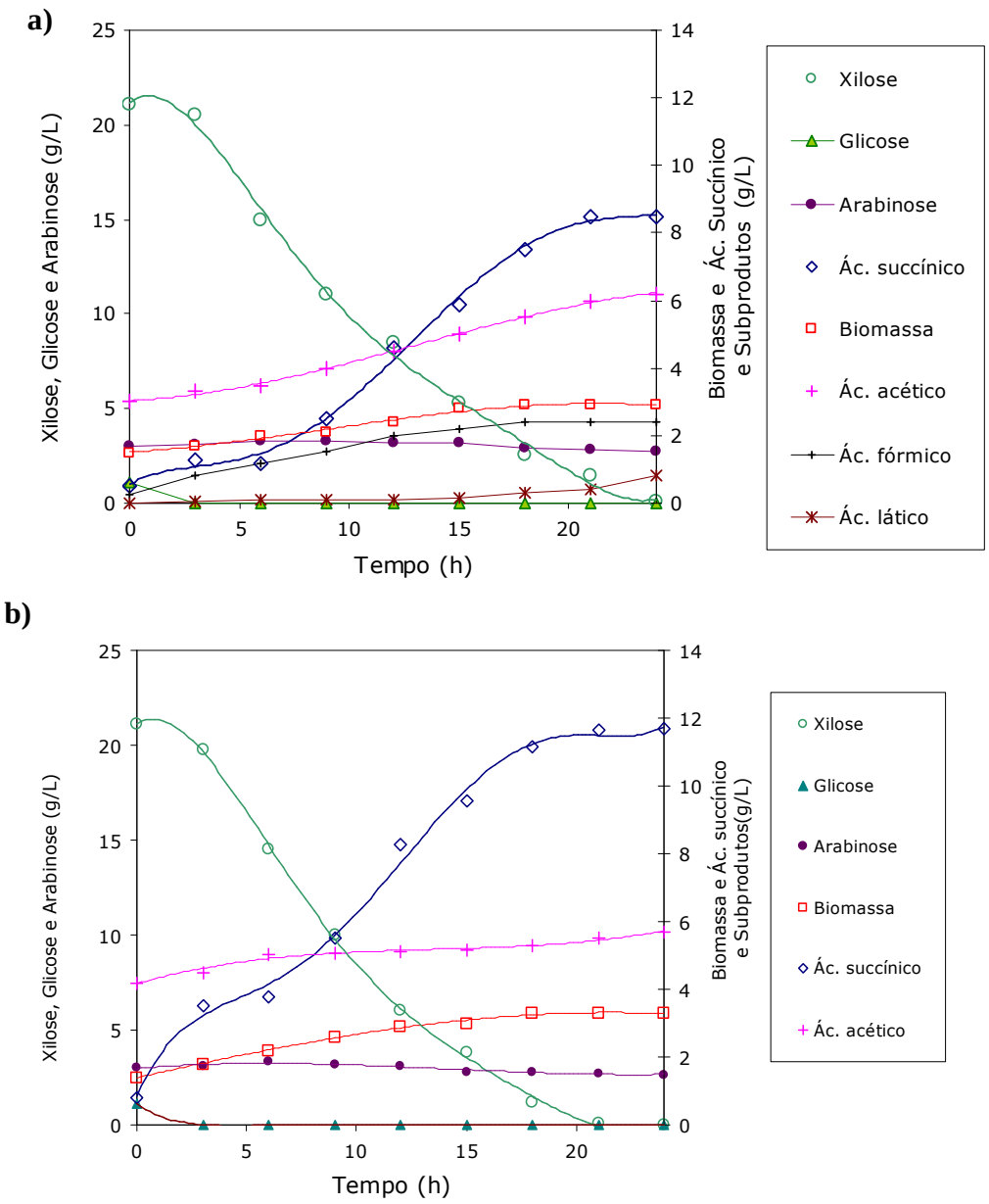

Figura 5.27. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico, com concentração inicial de **xilose** igual a 22,0 g/L, sob condições controladas (37℃, pH 7.0 , 150 rpm). Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0.05 vvm.

Cabe ressaltar que o hidrolisado obtido em condições otimizadas por BETANCUR (2010), apresenta as seguintes concentrações de inibidores: ácido acético 6,04 g/L;

hidróximetilfurfural (HMF) 0,55 g/L e furfural 0,09 g/L. CHEN *et al*. (2010) encontraram concentrações de inibidores muito próximas: 0,6 g/L HMF; 0.3 g/l de furfural, 1.0 g/L de ácido fórmico e 3,4 g/L de ácido acético em hidrolisado da fibra de milho com concentração de açúcares redutores totais, igual a 70,0 g/L, durante os estudos para produção de ácido succínico, por *A. succinogenes*.

Nota-se que, nas primeiras horas de processo, ocorre o esgotamento total de glicose a uma taxa de consumo igual a 0,36 g/L.h, concomitantemente a uma menor taxa de consumo de xilose, iguais a aproximadamente 0,20 g/L.h, em ambos os ensaios. Em seguida, a taxa de consumo de xilose aumentou, gradualmente, para cada ensaio com valores finais a 0,87 e 0,96 g/L.h, num período de aproximadamente 24 e 22 horas, em ausência e presença do suprimento externo de CO_2, respectivamente**.** A concentração de arabinose manteve-se praticamente constante durante todo o processo.

Com relação à produção de ácido succínico, os valores obtidos para a produtividade volumétrica, concentração final e rendimento em produto, apresentaram um aumento de 0,27 para 0,45 g/L.h; de 8,5 para 11,7 g/L e de 0,28 para 0,39 g/g de acordo com as figuras 5.32a e 5.32b, respectivamente. A concentração de ácido acético reduziu de 6,5 para 5,6 g/L do primeiro para o segundo ensaio, respectivamente. As concentrações finais de ácido fórmico, lático e etanol no primeiro ensaio, foram de 2,4; 0,9 e 0,19 g/L. Não houve a formação de ácido lático e etanol em presença do suprimento externo de CO_2.

A Figura 5.28 apresenta os perfis cinéticos de fermentação, anteriores aos estudos de otimização do processo, para concentração inicial de xilose igual a 52,0 g/L, em 32 horas de fermentação, com uma concentração inicial de células de aproximadamente 3,0 g/L.

Novamente, o tempo para o esgotamento total de xilose foi maior no primeiro ensaio (Figura 5.28a), próximo de 28 horas de fermentação, com formação simultânea dos ácidos acético (5,2 g/L), fórmico (3,3 g/L) e lático (1,0 g/L). Quando o crescimento celular atinge a fase estacionária, em aproximadamente 24 horas, é possível perceber a continuidade na formação de acido acético, enquanto as concentrações do ácido fórmico e ácido lático ficam constantes.

Para o segundo ensaio (Figura 5.28b) nota-se uma redução no tempo de esgotamento de xilose para aproximadamente 24 horas, com crescimento celular contínuo até o final do processo, além de uma redução na concentração final de ácido acético (2,4 g/L).

Os valores encontrados para a concentração final de ácido succínico, rendimento em produto e de eficiência em relação ao rendimento máximo teórico, apresentaram um aumento de 15,5 para 20,1 g/L, 0,26 para 0,40 g/g e de 19,4 para 29,9%, em ausência e presença de suprimento externo de CO_2, respectivamente.

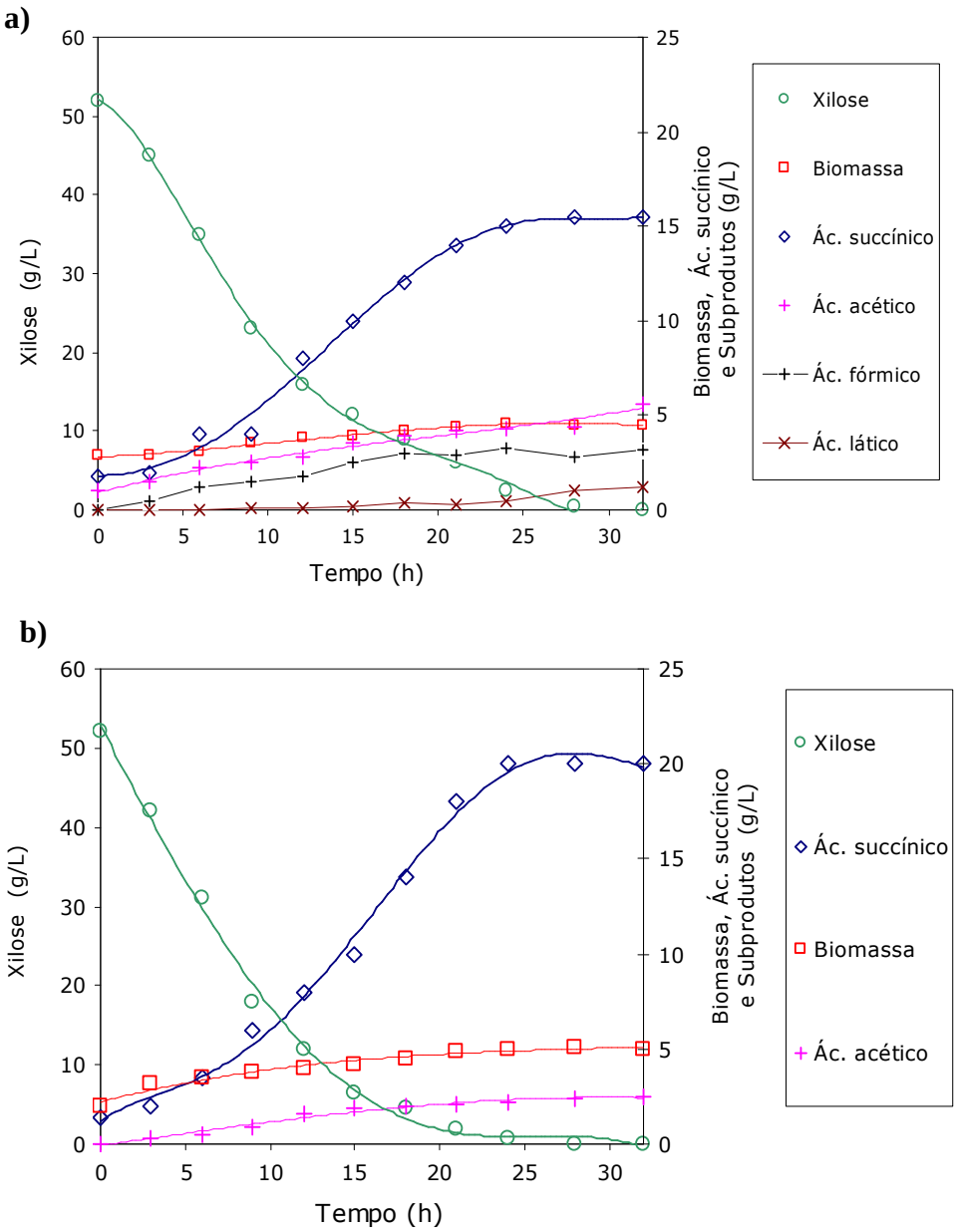

Figura 5.28. Fermentação em meio sintético, com 52,0 g/L de **xilose**, sob condições controladas (37℃, pH 7.0, 150 rpm). Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0.05 vvm.

A Figura 5.29 apresenta os perfis cinéticos de fermentação, em meio de composição de nutrientes com valores de concentração posterior aos estudos de otimização, para concentração inicial de xilose igual a 52,0 g/L, em 32 horas de fermentação, com uma concentração inicial de células de aproximadamente 3,0 g/L.

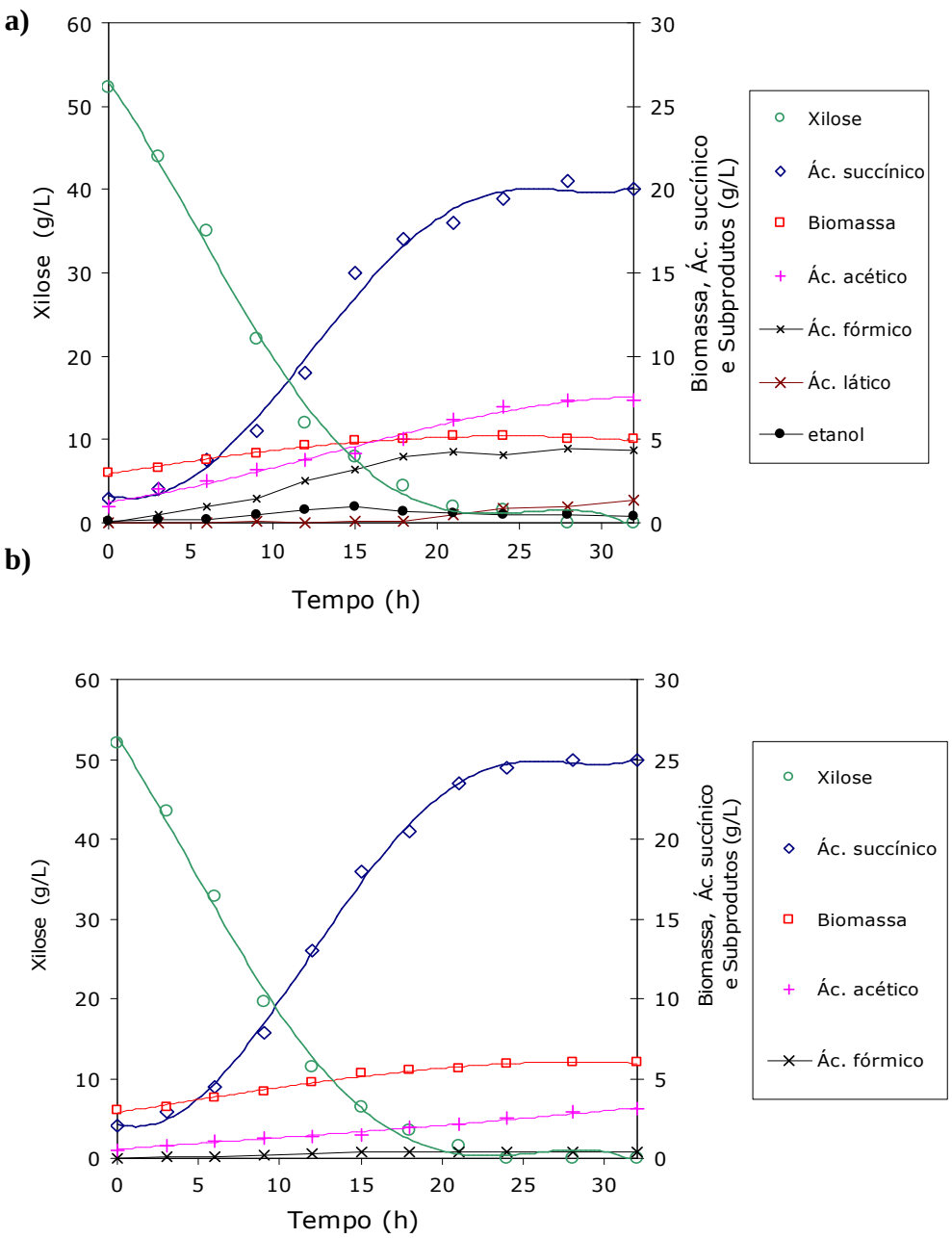

Figura 5.29. Fermentação em meio sintético de composição definida após os estudos de otimização, com 52,0 g/L de **xilose**, sob condições controladas (37℃, pH 7.0, 150 rpm) . Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0.05 vvm.

Como observado com os perfis cinéticos demonstrados anteriormente, para o ensaio realizado em presença de suprimento externo de CO_2, houve uma ligeira redução no tempo de fermentação, com maiores valores de crescimento celular e produtividade volumétrica. Não foram observadas a formação de ácido lático e etanol no segundo ensaio (Figura 5.29b). Os valores para a concentração final de ácido acético e ácido fórmico, foram reduzidos de 7,35 para 3,1 g/L e de 4,5 para 0,4 g/L, em ausência e presença do suprimento externo de CO_2, respectivamente. Observou-se que, em aproximadamente 18 horas de fermentação, a

concentração de ácido acético continua aumentando, enquanto as concentrações de ácido fórmico e ácido lático ficam constantes, com uma queda na concentração de etanol. Os valores de concentração final de ácido succínico, rendimento em produto (Yp/s) e de eficiência em relação ao rendimento máximo teórico, apresentaram um aumento de 20,5 para 25,4 g/L, 0,9 para 1,21 g/g e de 29,9 para 46,3 %, respectivamente.

Estudos prévios mostraram que uma concentração de ácido acético de 9,0 g/L e uma eficiência um pouco maior (50%), foi obtida por *A. succinogenes* CGMCC1593, a partir de aproximadamente 50 g/L de glicose, suplementado com 15 g/L de extrato de levedura em frascos agitados, sob condições de anaerobiose (LIU *et al*., 2008).

A Figura 5.30 mostra o comportamento da fermentação realizada com células aclimatadas em duas etapas utilizando hidrolisado, com uma concentração de aproximadamente 3,0 g/L. Os ensaios foram conduzidos por 32 horas, com uma concentração inicial de xilose igual a aproximadamente 52 g/L, obtido em meio contendo 50% de hidrolisado hemicelulósico, suplementado com os nutrientes de composição definida após os estudos de otimização.

Foram observadas concentrações iniciais de glicose e arabinose, em torno de aproximadamente 2,5 e 8,0 g/L, existentes no hidrolisado. A presença de hexoses como manose, galactose e glicose, e/ou de pentoses, pode promover uma diminuição na utilização da xilose, por preferência metabólica por esses glicídeos. Apesar disso, o consumo de xilose é restabelecido quando esgotados esses glicídeos fermentáveis (DU *et al*., 1994). O consumo total da glicose ocorreu nas primeiras 3 horas de processo, tempo em que a taxa de formação de produto é aumentada. Após consumo da glicose, a xilose foi degradada em aproximadamente 28 horas de processo, como mostra a Figura 5.30a. Não foi constatado nenhum consumo de arabinose com o decorrer do processo.

A concentração final de ácido succínico foi de 18,0 g/L, com uma concentração final de células igual a 4,4 g/L e valores de rendimento em produto e produtividade volumétrica iguais a 0,30 g/g e 0,69 g/L.h. Com relação à formação de subprodutos, foram encontrados 8,7 g/L de ácido acético, que manteve um aumento até o final do processo, 3,8 g/L para o ácido fórmico, que se manteve constante após 20 horas, 1,2 g/L de ácido lático, cujo aumento foi detecado quando o crescimento celular entrou atingiu fase de crescimento estacionário e, concentração de etanol próxima de zero.

Para o segundo ensaio, em aproximadamente 24 horas de fermentação, os valores de concentração final de ácido succínico, concentração final de células, rendimento em produto (Yp/s) e produtividade volumétrica foram de 23,0 g/L, 4,9 g/L, 0,42 g/g e 1,05 g/L.h, respectivamente. Estes resultados foram inferiores aos obtidos, no procedimento anterior (Figura 5.29), possivelmente devido à presença de inibidores presentes no hidrolisado. Para

este caso (presença de suprimento externo de CO_2) a concentração final de ácido acético foi reduzida para 6,6 g/L, sem a formação de ácido lático e etanol.

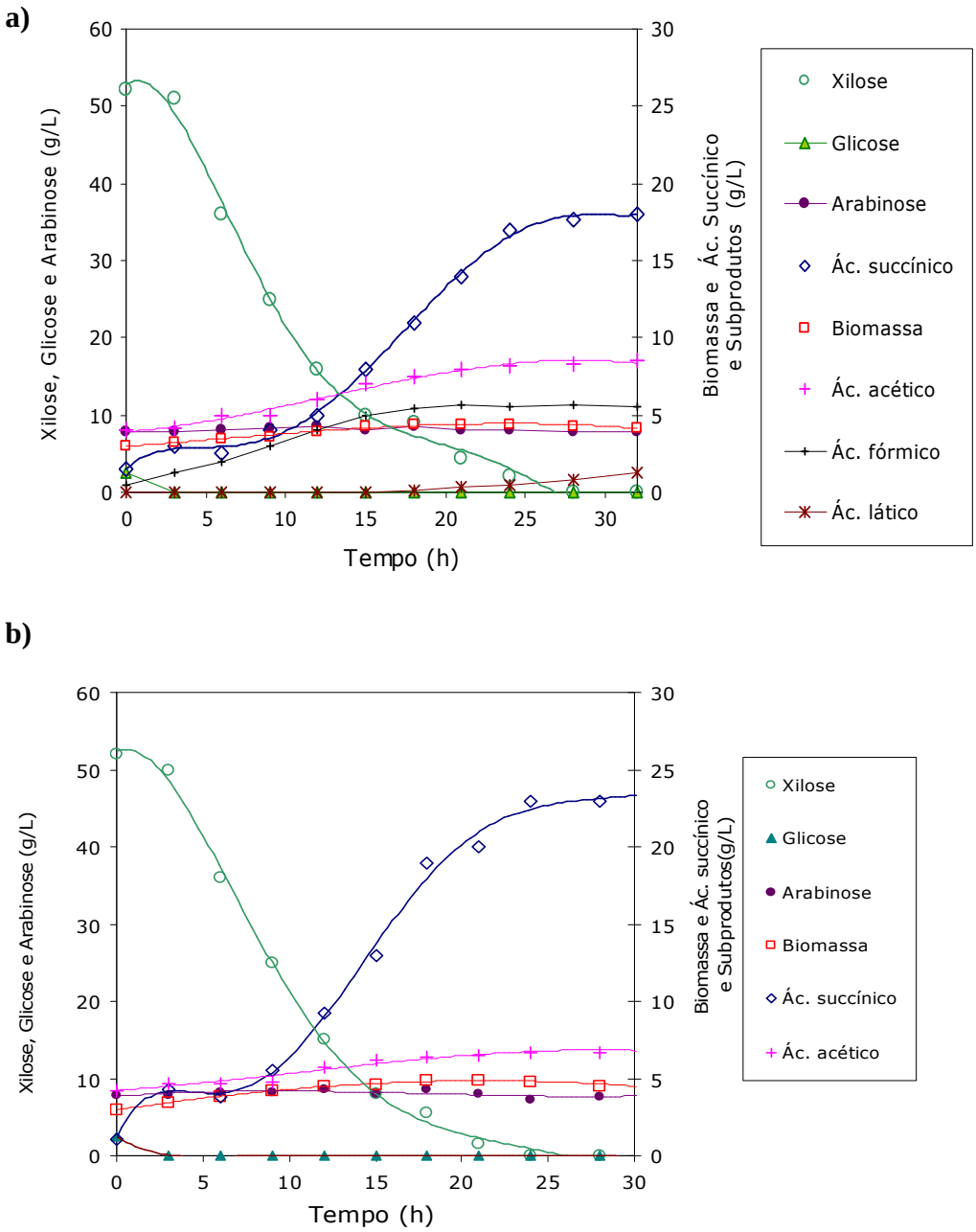

Figura 5.30. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico, com concentração inicial de **xilose** igual a 52,0 g/L, sob condições controladas (37℃, pH 7.0 , 150 rpm). Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0,05 vvm.

Resultados semelhantes a estes foram encontrados por WAN *et al*. (2008), em fermentação a partir do soro de queijo, com uma concentração inicial de lactose igual a 50 g/L, com suprimento de CO_2 a 0,05vvm e concentração inicial de células de 4 g/L, em pH 6.8, usando a linhagem *Actinobacillus succinogenes* 130 Z. Porém, as concentrações de

subprodutos encontradas pelo autor foram maiores, em torno de 8 g/L de ácido acético, 5 g/L de ácido fórmico, 2,5 g/L de ácido lático e 0,5 g/L de etanol.

A Figura 5.31 apresenta os perfis cinéticos de fermentação, em meio de composição de nutrientes anterior aos estudos de otimização, para concentração inicial de xilose igual a 80,0 g/L, em 48 horas de fermentação, com uma concentração inicial de células de aproximadamente 3,0 g/L.

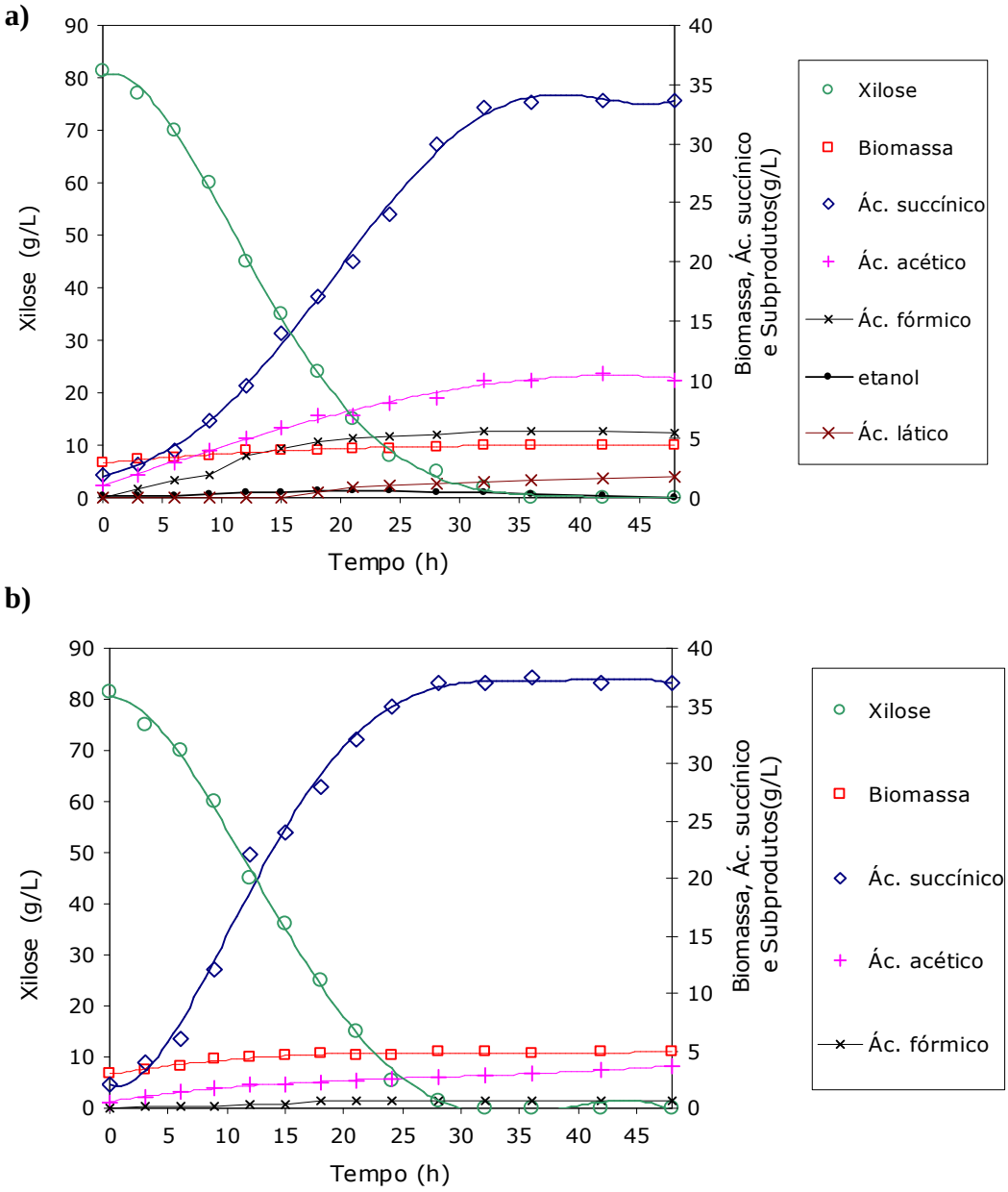

Figura 5.31. Fermentação em meio sintético, com 80,0 g/L de **xilose**, sob condições controladas (37℃, pH 7.0, 150 rpm). Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0.05 vvm.

O tempo de esgotamento total de xilose, na Figura 5.31a, foi de aproximadamente 32 horas, com a estabilidade na concentração de células igual a aproximadamente 4,4 g/L, uma

concentração final de ácido succínico igual a 33,5 g/L e uma produtividade volumétrica em ácido succínico igual a 1,16 g/L.h. Como ocorrido anteriormente, após um determinado período (22 horas), a concentração de ácido acético continuou aumentando até atingir 10,4 g/L, enquanto os ácidos fórmico e lático atingiram 5,8 e 1,85 g/L, respectivamente. O etanol apresentou uma concentração baixa de 0,65 g/L.

Para o ensaio seguinte, em presença do suprimento externo de CO_2, o tempo de esgotamento de xilose foi de aproximadamente 28 horas e as concentrações finais de ácido acético e ácido fórmico foram reduzidas para 3,6 e 0,70 g/L, respectivamente; sem a formação dos outros subprodutos.

Ao final do processo, foi encontrada uma concentração final de células de aproximadamente 4,9 g/L, uma concentração final de ácido succínico de 37,6 g/L e uma produtividade igual de 1,44 g/L.h. Foi possível observar ainda que, o crescimento celular alcançado foi menor que os valores obtidos em concentrações iniciais de substrato menores, denotando inibição do crescimento para concentrações elevadas de substrato. Segundo ZHENG *et al.* (2009), concentrações acima de 80 g/L de xilose, obtida do hidrolisado da palha, promovem inibição no crescimento celular da bactéria *A. succinogenes* CGMCC1593.

A Figura 5.32 apresenta os perfis cinéticos de fermentação, obtidos com os ensaios após os estudos de otimização, com a mesma concentração inicial de xilose de 80 g/L, sob as mesmas condições de pH, agitação e temperatura anteriores.

Uma redução no período necessário para a fermentação, de aproximadamente 4 horas, em relação ao perfil cinético do ensaio anterior (Figura 5.31) foi observado, enfatizando assim, a importância dos estudos realizados para otimização do processo.

Pela análise da Figura 5.32, os valores das de concentrações finais de ácido acético e ácido fórmico foram reduzidos, de 12,1 para 4,3 g/L e de 6,9 para 0,9 g/L, respectivamente. Em aproximadamente 18 horas de fermentação, a concentração de ácido acético continuou aumentando, com estabilização celular em 4,6 g/L. Os valores de concentração final de ácido succínico, rendimento em produto e produtividade volumétrica apresentaram um aumento, de 38,4 para 42,5 g/L, 0,49 para 0,66 g/g e de 1,40 para 1,80 g/L.h, em 28 e 24 horas de tempo de fermentação, respectivamente.

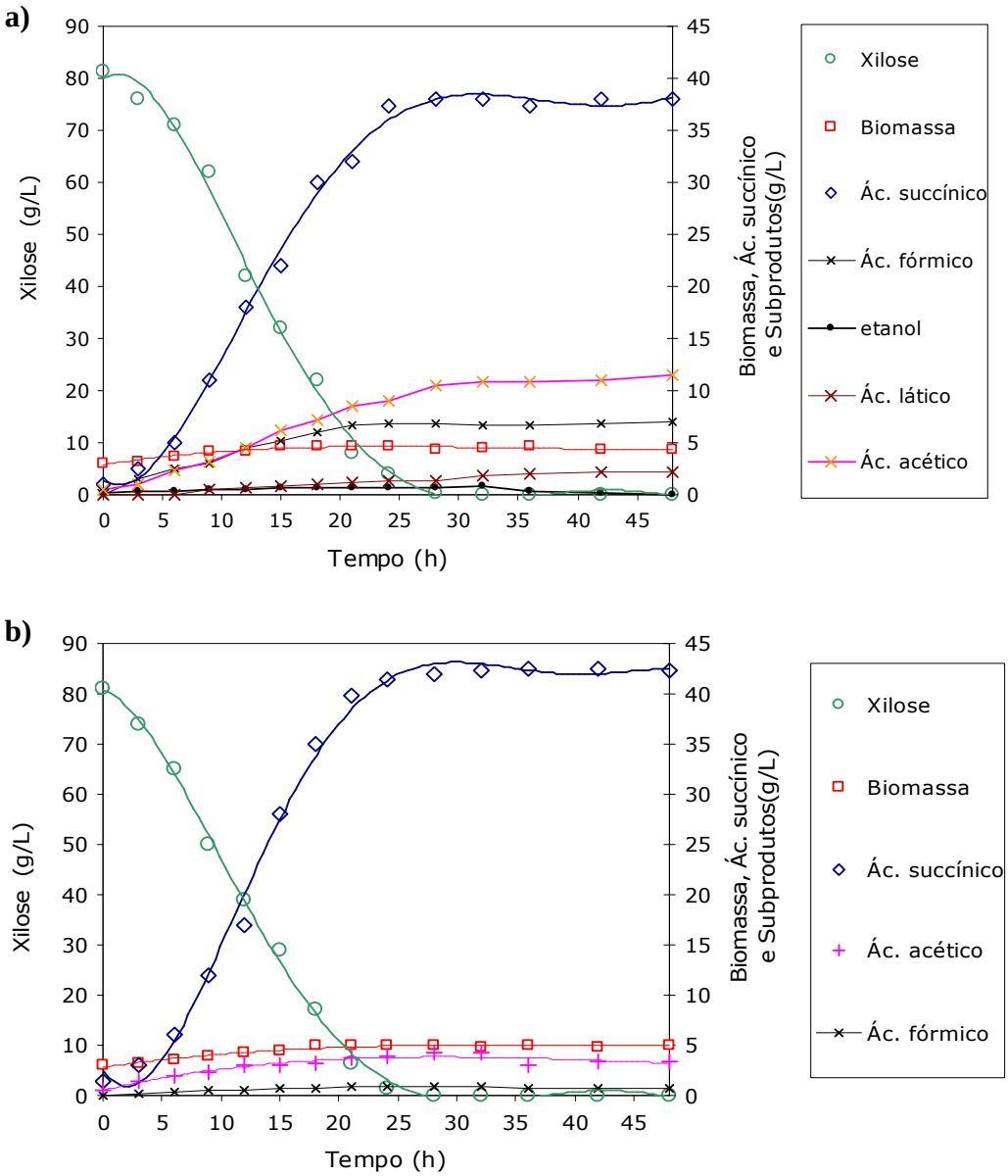

Figura 5.32. Fermentação em meio sintético de composição definida após os estudos de otimização, com 80,0 g/L de **xilose**, sob condições controladas (37℃, pH 7.0, 150 rpm) . Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2.

Na Figura 5.33 apresenta-se o comportamento da fermentação realizada com células aclimatadas em duas etapas utilizando hidrolisado hemicelulósico. Neste caso, a fermentação foi conduzida por 48 horas, com uma concentração inicial de xilose igual a aproximadamente 80 g/L e uma concentração inicial de células de aproximadamente 3,0 g/L**.**

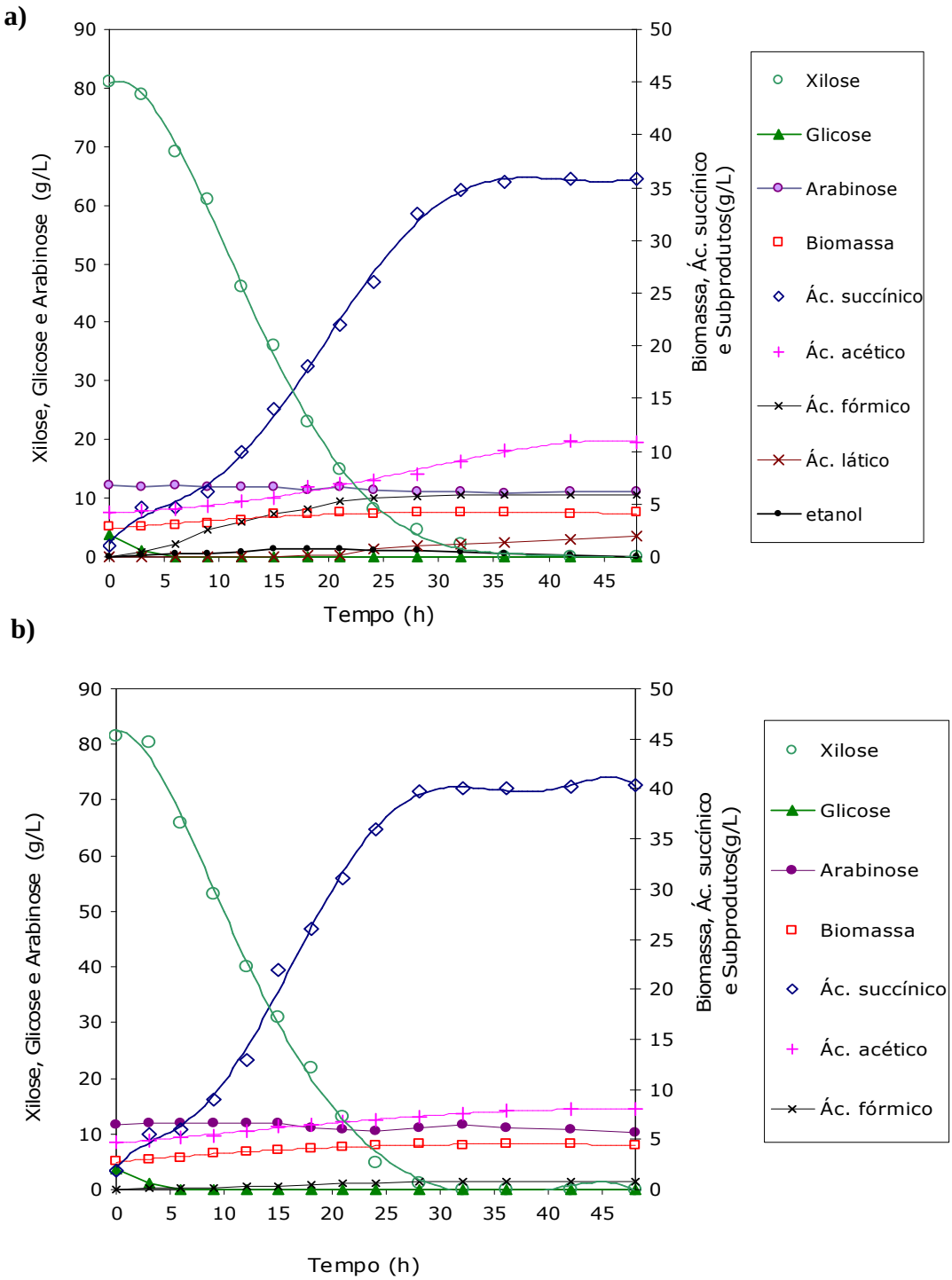

Figura 5.33. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico, com concentração inicial de **xilose** igual a 80,0 g/L, sob condições controladas (37℃, pH 7.0 , 150 rpm). Ausência (a) e presença (b) de suprimento externo de CO_2, a 0.05 vvm.

Cabe ressaltar, que o processo se inicia com uma concentração de ácido acético em torno de 5,0 g/L, presente no hidrolisado hemicelulósico. Verifica-se elevadas taxas de consumo de glicose, iguais a 1,26 e 1,33 g/L.h, concomitantemente a taxa de consumo de xilose mais reduzida, iguais a 0,66 e 0,50 g/L.h, na ausência e presença de suprimento

externo de CO_2, respectivamente. Naturalmente, com o rápido esgotamento, a taxa de consumo de xilose aumentou, gradualmente, com valores finais para cada ensaio iguais a 2,53 e 2,91 g/L.h.

No que diz respeito à produção de ácido succínico, o perfil cinético não apresentou inflexões aparentes, após o esgotamento de glicose, mostrando-se constante e com um acréscimo nos valores de produtividade, rendimento em produto e eficiência de 1,21 para 1,50 g/L.h; 0,45 para 0,53 g/g; 33,6 para 39,6% (em relação ao máximo teórico) e concentrações finais de produto iguais 35,9 e 40,3 g/L para as Figuras 5.33a e 5.33b, respectivamente.

A formação de subprodutos apresentou maiores valores em termos de concentração, sem a detecção de ácido lático e etanol no segundo ensaio (Figura 5.33b). Os valores para a concentração final de ácido acético e ácido fórmico, foram reduzidos de 12,1 para 4,3 g/L e de 6,9 para 0,9 g/L, nas Figuras 5.33a e 5.33b, respectivamente. Em aproximadamente 22 horas de fermentação, a concentração de ácido acético continuava aumentando, enquanto a concentração de ácido fórmico mantinha-se constante, com um aumento na concentração de ácido lático, de forma similar aos experimentos anteriores.

A Tabela 5.18 apresenta os parâmetros e variáveis de resposta, de forma mais objetiva, como: tempo de fermentação, concentração inicial de xilose (So), concentração final de ácido succínico (P) e biomassa (X), fator de rendimento em produto ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica de ácido succínico (Q_P) e eficiência na conversão para produto (Ef), em relação ao rendimento máximo teórico (1,12 g/g).

Comparando os ensaios a partir de meio sintético inicial e meio sintético com a concentração de nutrientes definida após os estudos de otimização, alguns aspectos gerais podem ser discutidos. Para os experimentos com concentração inicial de xilose de 22 g/L, verifica-se um aumento na concentração final de ácido succínico, de 6,04 para 14,02 g/L; na produtividade, de 0,25 para para 0,66 g/L.h; no rendimento em produto, de 0,23 pra 0,57 g/g e um aumento na eficiência de 17,1 para 42,5%.

De forma similar, com 52 g/L de concentração inicial de xilose, houve um aumento na concentração final de ácido succínico, de 15,5 para 25,4 g/L; na produtividade, de 0,65 para 1,21 g/L.h, no rendimento em produto, de 0,26 para 0,62 g/g e na eficiência de conversão, de 19,4 para 46,3 %.

Tabela 5.18. Variáveis de resposta obtidos a partir dos processos de fermentação, a partir de meio sintético e da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açucar.

Processo de fermentação	Condições		Valores máximos									
	So (g/L)	t_f (h)	x (g/L)	P (g/L)	*Q_P (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	E_f (%)	x (g/L)	P (g/L)	*Q_P (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	E_f (%)
			Ausência de CO_2					Presença de CO_2				
Meio Inicial	22.0	24	3,0	6,04	0,25	0,23	17,1	3,5	9,2	0,41	0,36	26,9
	52.0	32	4,5	15,5	0,65	0,26	19,4	5,2	20,1	1,00	0,40	29,9
	80,0	48	4,4	33,5	1,16	0,42	31,3	4,9	37,6	1,44	0,46	34,3
Meio (condições ótimas)	22.0	24	3,6	10,04	0,47	0,37	27,6	4,15	14,2	0,66	0,57	42,5
	52.0	32	5,2	20,5	0,90	0,40	29,9	6,1	25,4	1,21	0,62	46,3
	80,0	48	4,6	38,4	1,40	0,49	36,6	5,0	42,5	1,80	0,66	49,3
Hidrolisado	22.0	24	2,9	8,50	0,27	0,28	20,9	3,2	11,7	0,45	0,39	29,6
	52.0	32	4,4	18,0	0,69	0,30	22,4	4,9	23,0	1,05	0,42	31,3
	80,0	48	4,1	35,9	1,21	0,45	33,6	4,5	40,3	1,50	0,53	39,6

S_0: concentração inicial de xilose, x: concentração final de células; P: concentração final de ácido succínico; Qp: produtividade;Yp/s: rendimento em produto; Ef: eficiência em relação ao máximo teórico (Yp/s teórico = 1,34g ácido succínico/g xilose consumido)
*Variável de resposta analisada para definir a viabilidade do processo

Para os ensaios com 80 g/L de concentração inicial de xilose inicial, foram obtidos os melhores resultados para a concentração final de ácido succínico, que aumentou de 33,5 para 42,5 g/L. Para a produtividade, rendimento em produto e eficiência, houve um aumento de 1,16 para 1,80 g/L.h, de 0,42 para 0,66 g/g e de 31,3 para aproximadamente 49,3%, ou seja, uma diferença total em torno de 22,5%, inferior as diferenças obtidas com os ensaios em concentrações de 20 e 52 g/L, que aumentaram em torno de 25-27%, na ausência e presença de CO_2.

No que concerne aos valores de concentração celular, os acréscimos foram de 3,0 para 4,15; 4,5 para 6,1 e 4,4 para 5,0 g/L, para os ensaios com as concentrações iniciais de 22; 52 e 80 g/L, respectivamente. Também foi possível verificar maiores períodos de fermentação, de acordo com a concentração inicial de xilose, influenciando nos valores finais de produtividade volumétrica.

Os experimentos realizados com o hidrolisado hemicelulósico apresentaram uma redução nas concentrações finais de produto em relação aos resultados obtidos em meio sintético, alcançando valores iguais a 11,7; 23,0 e 40,3 g/L, para 22, 52 e 80 g/L de xilose, respectivamente. Estudos anteriores mostraram que o crescimento celular pode ser reduzido

pelos inibidores, como furfural, hydróximetilfurfural (HMF) e ácido acético, bem como compostos aromáticos oriundos da lignina ácida (BETANCUR & PEREIRA, 2010; SAHA, 2003; PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 1999).

Não foram realizados estudos sobre a influência desses inibidores celulares no crescimento celular e na produção de ácido succínico, vislumbrando-se a possibilidade de trabalhos futuros acerca desse aspecto, segundo metodologias para monitoramento dessas substâncias tóxicas e possível remoção, sem acarretar perdas de substrato. Porém, com o presente trabalho ficou demonstrado à possibilidade de desenvolver um eficiente processo de fermentação a partir da fração hemicelulósica, sem a implementação de etapas de destoxificação, utilizando apenas aclimatação celular, em etapas suscessivas. Ainda de acordo com a Tabela 5.18, mesmo havendo uma queda no valor dos resultados a partir do hidrolisado hemicelulósico, eles se mantiveram superiores aos valores encontrados nos ensaios realizados antes dos estudos de otimização para a hierarquização da influência dos componentes presentes no meio de fermentação.

5.8.1. Formação de Subprodutos

Toda bactéria produtora de ácido succínico, durante a fermentação, forma uma mistura de ácidos (Tabela 5.19), produzindo quantidades variadas de produto de interesse e de outros produtos, incluindo ácido acético, ácido lático, ácido fórmico (ZEIKUS *et al.*, 1999).

De acordo com a análise dos resultados obtidos, a concentração de subprodutos pode ser relacionada, principalmente, a três fatores: a otimização dos componentes do meio de cultivo; a utilização de suprimento externo de CO_2 e a concentração inicial de substrato (xilose).

A concentração de subprodutos foi reduzida em presença de suprimento externo de CO_2, ao passo que acréscimos foram alcançados com a concentração de ácido succínico. Durante a produção de ácido succínico, o fosfoenolpiruvato (PEP), um dos intermediários centrais durante fermentação de mistura de ácidos, é convertido por duas enzimas, presentes no metabolismo de *A. succinogenes*, chamada PEP carboxiquinase e piruvato quinase (KIM *et al*., 2004). PEP carboxiquinase é a enzima responsável por fixar o CO_2 covertendo a PEP em oxaloacetato, induzindo o fluxo para formação de ácido succínico (LEE *et al*., 1999). Na ausência de CO_2 (Figura 2.16), a piruvato quinase converte PEP a piruvato, que é convertido em subprodutos da fermentação, como o etanol e os ácidos acético, fórmico e lático (VAN DER WERF *et al*., 1997).

Tabela 5.19. Concentração final de produto e subprodutos dos processos de fermentação para obtenção de ácido succínico por *A. succinogenes.*

Processo de fermentação	Condições		Concentração final de produtos (g/L)									
	So (g/L)	Tempo (h)	AS	AA	AF	AL	Et	AS	AA	AF	AL	Et
			Ausência de CO_2					Presença de CO_2				
Meio Inicial	22.0	24	6,04	2,2	1,3	0,67	0,14	9,2	1,2	0,15	---	---
	52.0	32	15,5	5,2	3,3	1,0	0,36	20,1	2,4	0,25	---	---
	80,0	48	33,5	10,4	5,8	1,85	0,65	37,6	3,6	0,70	---	---
Meio sintético (condições ótimas)	22.0	24	10,0	4,74	1,44	1,1	0,23	14,2	2,0	0,2	---	---
	52.0	24	20,5	7,35	4,5	1,4	0,5	25,4	3,1	0,4	---	---
	80.0	48	38,4	12,1	6,9	2,2	0,8	42,5	4,3	0,9	---	---
Hidrolisado	22.0	24	8,50	6,5	2,4	0,90	0,19	11,7	5,6	0,5	--.	--.
	52.0	32	18,0	8,7	5,5	1,2	0,41	23,0	6,6	0,64	---	---
	80.0	48	35,9	11,0	5,9	1,96	0,7	40,3	7,8	0,75	---	---

AS: ácido succínico, AA: ácido acético, AF: ácido fórmico, AL:ácido lático, Et: etanol

A formação dos subprodutos representa um dos principais problemas na produção biotecnologica do ácido succínico, porque reduz sua produtividade e rendimento, devido à inibição do crescimento celular (JENSEN *et al*., 2003). Dependendo das condições do processo fermentativo, há alternativas para evitar ou reduzir o efeito de inibição, como por exemplo, o uso integrado de sistemas para separação de subprodutos e o reciclo de células, como ocorrido com a bactéria *Enterococcus sp*, que converte fumarato até succinato com alta eficiência (98%), em presença de glicerol como fonte de carbono (VEMURI *et al.*, 2002) a partir de um detalhado estudo de integração de etapas de processo. Em muitos casos, o dióxido de carbono é essencial para diminuir a formação desses subprodutos, responsáveis pela inibição no crescimento de alguns microrganismos produtores de ácido succínico (UEDA *et al.,* 2008).

Com a otimização de composição dos nutrientes, o acréscimo observado para aconcentração de ácido succínico foi maior do que para a concentração de subprodutos, os quais foram mantidos em concentrações inferiores a 4,0 g/L para ácido acético e 1,0 g/L para ácido fórmico, sem a constatação de ácido lático e etanol. Essa diferença, pode ser explicada

pela incorporação dos nutrientes essenciais em concentrações adequadas, como por exemplo componentes como $MgCO_3$ ou $NaHCO_3$, que contribuem para a melhoria na produção de ácido succínico, aliviando uma possível deficiência mineral (em derivados do trigo, por exemplo); promovendo a liberação de CO_2, ao reagir com os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação (DU *et al*., 2008).

Para o consumo de substrato, verificou-se que em termos de produtividade e rendimentos, houve um aumento significativo em 80 g/L, porém grandes diferenças não foram encontradas ao variar a concentração de xilose entre 20 e 52 g/L. Para as fermentações conduzidas em presença de hidrolisado, o fator crucial foi à concentração inicial de ácido acético (4,0-6,0 g/L, para 20-80 g/L, respectivamente), já presente no hidrolisado, contribuindo para inibir o crescimento celular e reduzir a formação de ácido succínico, embora a concentração de subprodutos não tenha apresentado uma diferença significativa dos ensaios anteriores.

Portanto, alternativas podem reavaliadas a respeito da etapa de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açucar, visando uma redução mais efetiva na concentração de inibidores. DAVID & CRISTIAN, (2008) alcançaram este objetivo, mediante adsorção com carvão ativado, em estudos para produção de ácido succínico a partir do hidrolisado da madeira. A técnica foi desenvolvida e otimizada previamente por CARVALHEIRO *et al*. (2005), durante o pré-tratamento de de grãos de cervejaria, para produção de de xilitol a partir de *Debaryomyces hansenii* CCMI1941.

Pode-se concluir que os ácidos acético e fórmico foram os subprodutos principais. LIU *et al.* (2008) reportaram que acetato e formato de sódio exercem inibiçao mediante interferências na membrana transporta de fosfato. O transporte de fosfato pela membrana celular é um processo de transporte ativo, que requer consumo de ATP. A primeira etapa da glicólise envolve, então, a produção da substância glicose-6-fosfato, onde as interferências resultam em uma maior exigência de ATP para manutenção. Essas interferências podem acontecer de acordo com a concentração de subprodutos. Estudos mostram que cerca 2,5 g/L de ácido fórmico, pode reduzir até 80% da densidade célular. O ácido fórmico tem uma solubilidade similar ao acético, portanto, o mesmo mecanismo de inibição pode ocorrer em valores baixos de concentração de ácido acético (MAIORELLA *et al.,*1983).

5.9. Avaliação da produção de ácido succínico pelo processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) em biorreator

O processo SSF vem sendo bastante utilizado, como uma alternativa para obtenção de diversos produtos a partir de fontes renováveis, como etanol (WINGREN *et al.,* 2003; O´´HGRENAL *et al*., 2007 e SANTOS & PEREIRA, 2009), ácido láctico (ROMANÝ *et al*., 2008; JOHN *et al*., 2009) e hidrogênio (LI & Chen, 2007). Porém, nenhum estudo foi realizado para o

aproveitamento de bagaço de cana-de-açucar para produção de ácido succínico. Inicialmente, foram avaliados os efeitos da concentração inicial de células face à utilização de glicose inicial do processo SSF, obtida na etapa de pré-hidrólise enzimática (SANTOS, 2009), com uma concentração de aproximadamente 75 g/L.

Os perfis cinéticos foram obtidos com 48 horas de processo, sob as seguintes condições operacionais: relação sólido líquido 3:10, atividade enzimática de 25 FPU/g e variação da concentração inicial de células (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g/L) a 37ºC. A Figura 5.34 mostra que não houve diferença significativa entre as concentrações finais de produto e subprodutos quando utilizadas concentrações iniciais de células iguais a 1,0 e 2,0 g/L. O mesmo comportamento foi observado para as concentrações de 3,0 e 4,0 g/L.

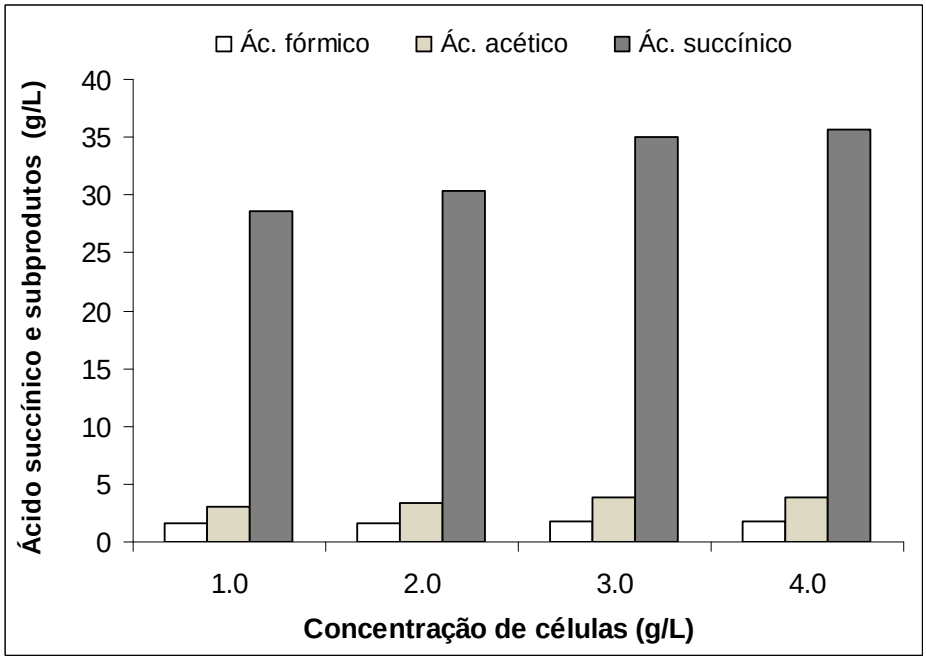

Figura 5.34. Concentração final de produto e subprodutos do processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas de celulose, em frascos agitados, com uma concentração inicial de glicose igual a 75 g/L e variação da concentração inicial de células entre 1,0 e 4,0 g/L.

Analisando a Figura 5.35, quando a concentração inicial de células foi aumentada de 1,0 para 3,0 g/L, as concentrações finais de ácido succínico alcançadas foram de 28,6 e 35,1 g/L, respectivamente. Ficou constatada uma redução de 36 para 30 horas no tempo de fermentação, com um ligeiro aumento no valor da produtividade, de 0,81 para 1,21 g/L.h.

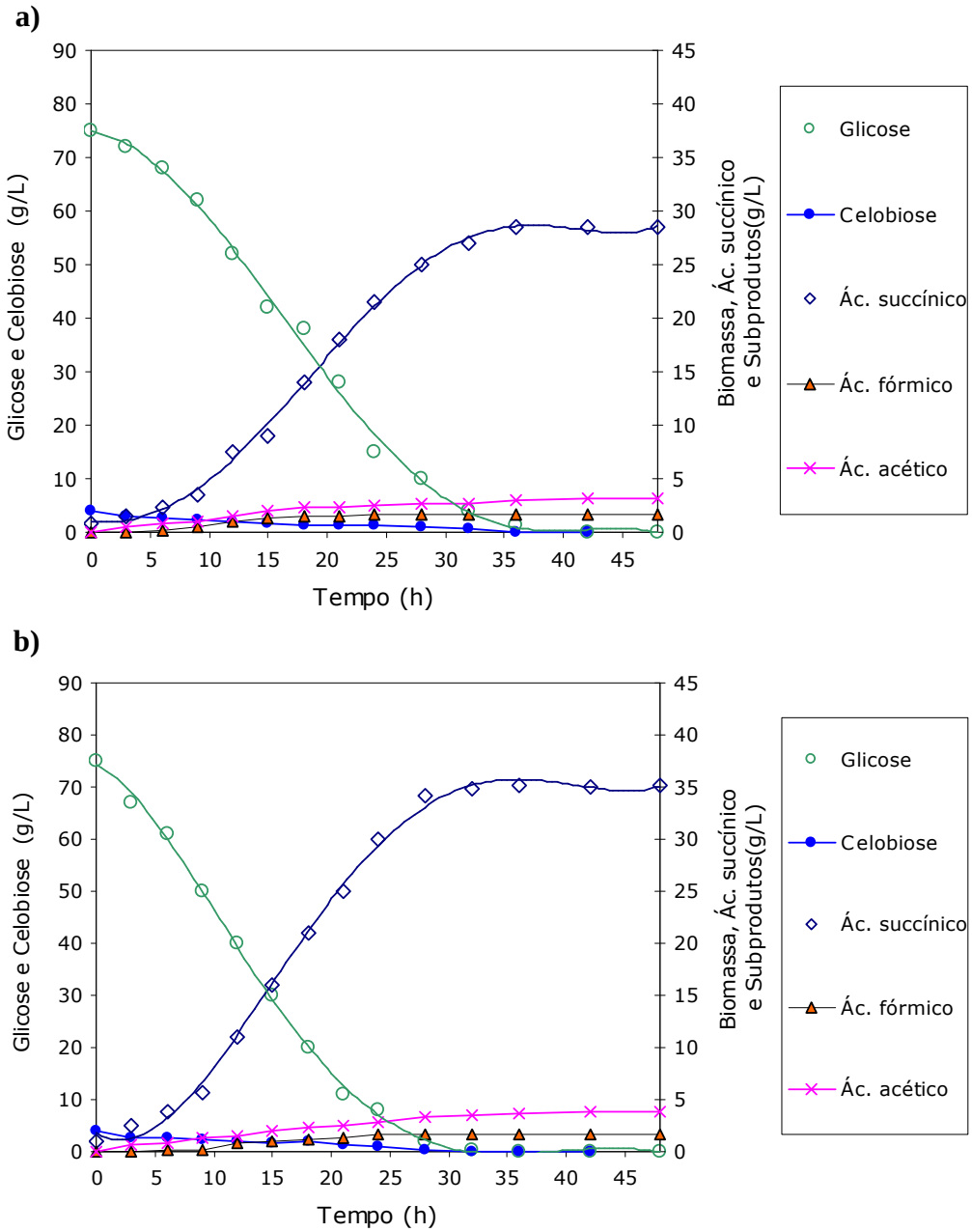

Figura 5.35. Perfil cinético do processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas de celulose, em frascos agitados, com uma concentração inicial de glicose igual a 75 g/L e concentrações iniciais de células iguais a 1,0 (a) e 3,0 g/L (b).

Em maior concentração inicial de células o tempo de fermentação foi reduzido, com reflexo positivo sobre a produtividade volumétrica em ácido succínico, uma vez que a glicose liberada é metabolizada de forma mais rápida em presença de maiores concentrações de células bacterianas (LI *et al*., 2007). Dessa forma, durante a validação experimental das condições de cultivo do processo SSF, em biorreator, foram definidas as seguintes condições: relação sólido-líquido 3:10 (g/mL), carga enzimática 25 FPU/g e uma concentração inicial de células de aproximadamente 3,0 g/L.

Concomitantemente ao processo SSF, em biorreator, um experimento em meio sintético foi conduzido sob as mesmas condições, com a concentração inicial de glicose igual a 81 g/L, simulando o valor obtido ao final da fase de pré-hidrólise enzimática, que neste caso, foi um pouco maior do que a quantidade de glicose obtida anteriormente (75 g/L). A eficiência do processo de fermentação depende da concentração inicial de glicose produzida durante a hidrólise enzimática (SANTOS, 2009).

Cabe ressaltar que, todos esses ensaios foram monitorados com um fluxo contínuo de suprimento externo de CO_2, a exemplo dos estudos para consumo de xilose, onde maiores concentrações de ácido succínico foram atingidas sob esta condição.

A Figura 5.36 apresenta os perfis cinéticos para a formação de ácido succínico, de subprodutos e consumo de glicose comercial em meio sintético, durante 48 horas de fermentação. A concentração final de ácido succínico foi de 41,6 g/L, com produtividade volumétrica de 1,77 g/L.h, em um tempo de fermentação de aproximadamente 24 horas.

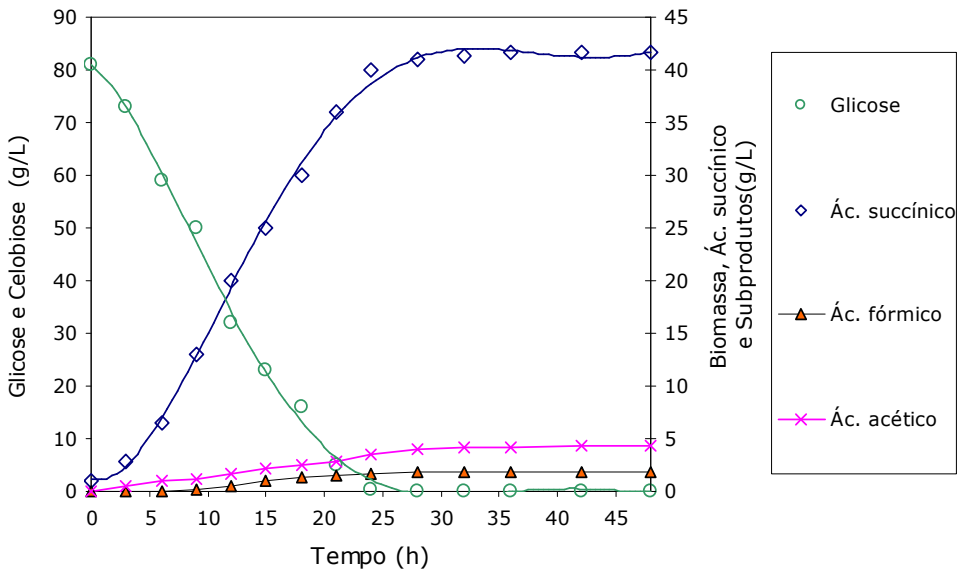

Figura 5.36. Perfil cinético do processo de fermentação, com uma concentração inicial de glicose igual a 81,0 g/L, em biorreator, com concentração inicial de células igual de 3,0 g/L, com suprimento externo de CO_2, a 0,05 vvm.

Na Figura 5.37 estão apresentados os perfis cinéticos para formação de ácido succínico, de subprodutos, consumo de glicose e de celobiose, durante o processo SSF em batelada. A primeira etapa corresponde à fase de pré-hidrólise enzimática, monitorada ao longo de 12 horas, seguido da fase de sacarificação e fermentação simultâneas.

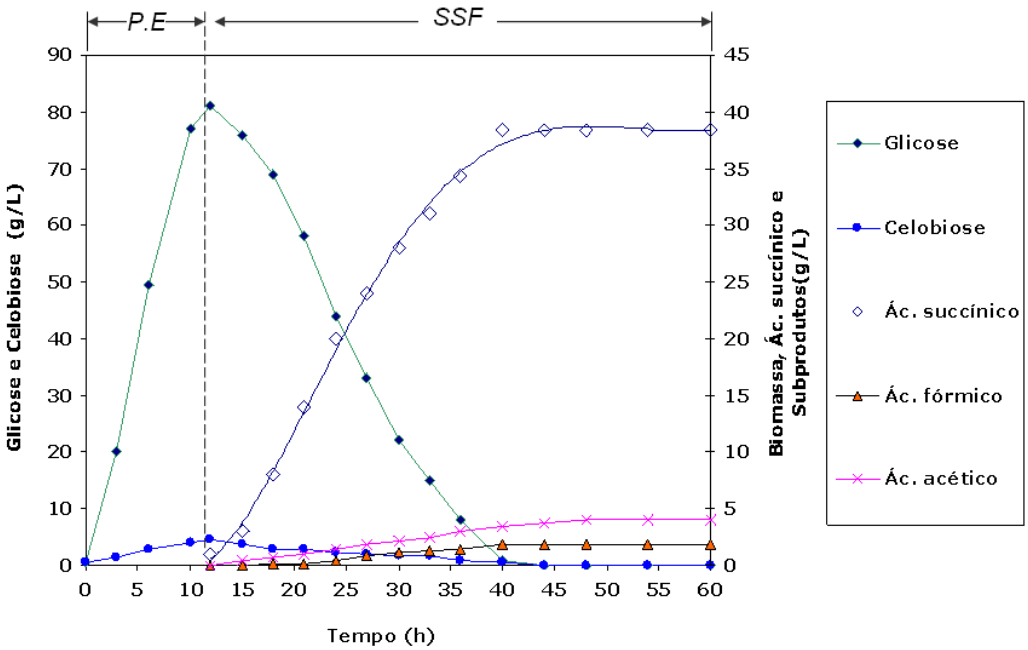

Figura 5.37. Perfil cinético do processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas de celulose, com uma concentração inicial de glicose igual a 81,0 g/L, em biorreator e concentração inicial de células igual a 3,0 g/L, com suprimento externo de CO_2, a 0,05 vvm. P.E: pré-hidrólise enzimática; SSF: fermentação e sacarificação simultâneas.

Ao final da fase de pré-hidrólise, foi observada uma concentração de glicose de aproximadamente 80,0 g/L e de celobiose igual a aproximadamente 5,0 g/L, que apresentou uma taxa de consumo baixa, sem exercer influência significativa sobre o processo. No início do procedimento SSF, o reator foi inoculado com 3,0 g/L de células no meio com aspecto liquefeito, e temperatura reduzida para 37ºC (temperatura ótima para a fermentação).

Ao longo do processo foi observada uma redução da produtividade volumétrica em ácido succínico (Q_P) em relação ao experimento anterior, realizado em meio sintético (Figura 5.35), refletindo em uma pequena redução na taxa de formação de produto e na eficiência de conversão do substrato, conforme mostra a Tabela 5.20. Os resultados foram muito próximos aos encontrados nos ensaios com frascos agitados (ensaio 3), conduzidos pelo processo SSF. Uma redução para aproximadamente 28 horas de fermentação, à medida que a concentração final de ácido succínico e a produtividade aumentaram de 35,1 para 38,4 g/L e de 1,21 para 1,42 g/L.h, mostram que a validação em biorreator foi eficiente.

Pode ser verificado um aumento na produtividade volumétrica com uma redução do tempo de fermentação de 36 para 24 horas de processo, do ensaio 1 (frascos agitados) para a validação em biorreator, respectivamente.

Cabe ressaltar que, em todos os experimentos, a concentração de subprodutos foi relativamente baixa, devido ao fluxo contínuo de suprimento externo de CO_2, com formação de ácido acético e ácido fórmico em concentrações inferiores a 4,5 e 1,9 g/L, respectivamente.

Ácido lático e etanol não foram identificados durante todo o processo. Os resultados obtidos a partir de meio sintético foram próximos aos valores encontrados por URBANCE *et al*. (2003), que obtiveram 35,0 g/L de ácido succínico, com concentração inicial de glicose igual a 65 g/L, durante fermentação em batelada e uma produtividade inferior, de 0,52 g/L.h.

Tabela 5.20. Variáveis de resposta e concentração de produto e subprodutos durante o processo SSF.

Ensaios		**Condições**				**Valores máximos**			
		S_0 (g/L)	Tempo (h)	t_f (h)	x_0 (g/L)	P (g/L)	AA (g/L)	AF (g/L)	*Q_P (g/L.h)
Fermentação pelo processo SSF									
Frascos Agitados	Ensaio 1	75,0	48	36	1,0	28,6	3,1	1,60	0,81
	Ensaio 2	75,0	48	32	2,0	30,4	3,3	1,64	0,98
	Ensaio 3	75,0	48	30	3,0	35,1	3,8	1,74	1,21
	Ensaio 4	75,0	48	30	4,0	35,7	3,87	1,75	1,23
Biorreator		81,0	48	28	3,0	38,4	4,0	1,81	1,42
Fermentação em meio sintético									
Biorreator		81,0	48	24	3,0	41,6	4,4	1,88	1,77

S_0: concentração inicial de xilose, t_f: tempo de esgotamento de glicose e máxima concentração do produto formado; x_0: concentração inicial de células; P: concentração final de ácido succínico; Qp: produtividade; AA: ácido acético, AF: ácido fórmico
*Variável de resposta analisada para os estudos da viabilidade do processo

CHEN *et al*. (2010) alcançaram uma concentração final de ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico e etanol em concentrações iguais a 14 g/L, 7,8 g/L, 1.7 g/L e 5.0 g/L, durante estudos de fermentação a partir do sake (bebida alcoólica japonesa), por *A. succinogenes* 130Z, com um rendimento de 0,55 g/g. Os mesmos autores encontraram uma concentração de 48 g/L de ácido succínico, a partir de estudos de otimização da hidrólise enzimática do sake, durante 51 horas de processo, com concentração inicial de glicose igual a 63,6 g/L. Porém, a quantidade de nutrientes presentes no sake contribuiu para incrementar o

rendimento, com concentrações de carboidratos em torno de 37.4%, além de uma série de proteínas e sais minerais.

Em um processo SSF com *A. succinogenes* CGMCC1593 desenvolvido por LI *et al*. (2010), usando o sabugo do milho, a concentração final de ácido succínico (15,8 g/L) e valor de produtividade (1,23 g/L.h) foram inferiores ao presente trabalho. De forma semelhante, os autores verificaram que a celobiose não foi consumida com o tempo, sendo a glicose convertida em 48 horas de fermentação. As concentrações de ácido acético encontradas durante o processo foram de 5,0 a 7,0 g/L. Os autores conseguiram um aumento na produção de ácido succínico (45 g/L), além de uma redução na concentração de subprodutos para 2,0 g/L, quando utilizaram celulase (20 FPU/g), 80 g/L de concentração inicial de glicose, a 38ºC em 48 horas de fermentação. Porém, estes pesquisadores utilizaram uma composição de nutrientes mais complexa, encarecendo o processo em relação ao presente trabalho.

5.10. Evolução dos experimentos desenvolvidos na produção de ácido succínico

Os valores de concentração final de ácido succínico, rendimento em produto e eficiência, para os ensaios realizados a partir de meio sintético, estão apresentados na Tabela 5.21, que foi elaborada a partir dos resultados obtidos com a mesma concentração inicial de 20 g/L dos respectivos substratos (glicose e xilose), para facilitar a análise das etapas desenvolvidas.

Nos ensaios iniciais, durante o cultivo de inóculo (M.C) foi possível verificar a formação de ácido succínico, em concentrações de até 5 g/L. Nos experimentos realizados em F1, sob as mesmas condições do ensaio anterior, o objetivo foi avaliar a relação C:N sob o crescimento celular. Porém, também foi determinada a produção de ácido succínico, resultando em uma diferença pouco significativa, com aumento da eficiência de 21,4 para 24,1% e de 19,4 para 20,9% nos ensaios com glicose e xilose, respectivamente.

Em seguida, durante as primeiras fermentações, foram utilizados recursos computacionais para o monitoramente e a otimização do processo, visando melhores rendimentos de conversão do substrato. Em P1, foram determinadas as variáveis que exerceram maior influência sob a produção de ácido succínico, seguido do P2, com a obtenção dos valores de concentração considerados ótimos pelo modelo executado, para cada nutriente presente no meio de fermentação, acarretando em um aumento de eficiência para 38,1 e 43,8% para xilose e glicose, respectivamente.

Tabela 5.21. Resultados finais para a produção de ácido succínico, durante as etapas de ensaios iniciais, planejamentos experimentais seqüenciais e validação das condições otimizadas, em meio sintético com concentração de substrato de 20 g/L.

Etapas		Condições		Resultados finais					
				Glicose			Xilose		
		S_0 (g/L)	Tempo (h)	P (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	E_f (%)	P (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	E_f (%)
Ensaios iniciais	M.C	20,0	24	4,98	0,24	21,4	5,20	0,26	23,2
	F1	20,0	24	5,70	0,27	24,1	6,50	0,28	25,0
Otimização	P1	20,0	24	7,49	0,34	30,4	9,02	0,36	32,1
	P2	20,0	24	10,86	0,49	43,8	12,85	0,51	45,5
	P3	20,0	24	10,98	0,50	44,7	12,89	0,52	46,4
Validação	F2	20,0	24	12,5	0,55	49,2	14,2	0,57	50,1

MC:Meio de crescimento para inóculo; F1: Fermentação para estudo da relação C:N sob crescimento celular e produção de ácido succínico; P1: Planejamento Fatorial Fracionado PFF^{4-1}, P2: Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR); P3:Planejamento Fatorial Fracionado $PFF^{5-1,}$ F2: Validação em meio sintético.
*Dados calculados a partir do rendimento teórico para cada substrato (Yp/s teórico = 1,12g ácido succínico/g glicose consumido; 1,34g ácido succínico/g xilose consumido)

O efeito das condições de cultivo do processo, como pH, temperatura e agitação foram avaliados no planejamento P3, confirmando os melhores valores para condução de trabalho, usados no decorrer dos ensaios anteriores, iguais a 37ºC, 150 rpm e pH 7.0. Os resultados foram próximos aos obtidos com P2, como era de se esperar. A fermentação (F2) para a validação das condições otimizadas, resultaram em uma concentração final de ácido succínico igual 12,5 e 14,2 g/L para glicose e xilose, respectivamente.

Através de uma visão geral dos experimentos, foi constatado um aumento na produção de ácido succínico de 19,4 para 42,5% e de 21,4 para 49,2% para xilose e glicose, respectivamente. Pode-se concluir, que apesar de terem sido alcançados maiores concentrações finais de produto com os ensaios utilizando xilose como substrato (Figura 5.38), a eficiência dos processos a partir de glicose foram relativamente maiores.

Resultados muito próximos a estes, foram encontrados por LEE *et al*. (2000) durante estudos, em condições anaeróbicas, com *A. succiniciproducens*, onde os autores verificaram a capacidade da bactéria de se desenvolver em meio com composição mínima (20 g/L de glicose), quando suplementado com milhocina (10-15 g/L), como fonte de nitrogênio, resultando em 12,8 g/L de ácido succínico.

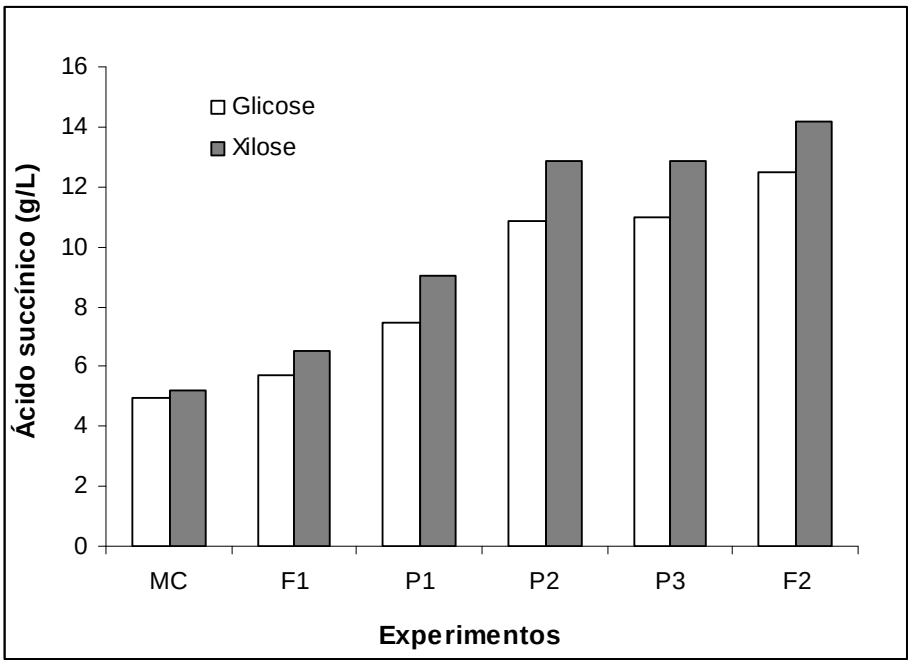

Figura 5.38. Evolução da produção de ácido succínico, em meio sintético com 20 g/L de substrato. MC:Meio de crescimento para inóculo; F1: Fermentação para estudo da relação C:N sob crescimento celular e produção de ácido succínico; P1: Planejamento fatorial fracionado PFF^{4-1}; P2: Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR); P3:Planejamento fatorial fracionado PFF^{5-1}; F2: Validação em meio sintético

Resultados muito próximos a estes, foram encontrados por LEE *et al*. (2000), durante estudos, em condições anaeróbicas, com *A. succiniciproducens*, onde os autores verificaram a capacidade da bactéria de se desenvolver em meio com composição mínima (20 g/L de glicose), quando suplementado com milhocina (10-15 g/L), como fonte de nitrogênio, resultando em 12,8 g/L de ácido succínico.

5.11. Comparação entre os processos desenvolvidos para produção de ácido succínico, a partir do hidrolisado hemicelulósico e do processo SSF

A Tabela 5.13 mostra os resultados obtidos para a produção de ácido succínico, durante a validação das condições otimizadas, para os ensaios em meio sintético, em meio contendo hidrolisado hemicelulósico, bem como a partir do processo SSF. Comparando os

resultados, foi possível confirmar a adequação da bactéria *Actinobacillus succinogenes* para produção de ácido succínico, tanto para o uso de xilose como de glicose. Embora similares, os resultados obtidos a partir de glicose como fonte de carbono foram menores, especialmente, em relação ao ensaio conduzido com hidrolisado hemiceulósico, onde a concentração inicial de ácido acético foi maior. Conforme já foi observado anteriormente, em concentrações elevadas de substrato inicial, a bactéria *A. succinogenes* apresentou uma redução do crescimento celular a partir de 44-50 g/L de glicose e 80 g/L de xilose.

Tabela 5.22. Produção de ácido succínico a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana e do processo SSF, com uma concentração inicial de substrato igual a aproximadamente 80,0 g/L, a 37ºC, 150 rpm, pH 7.0 e fluxo contínuo de suprimento externo de CO_2, a 0,05 vvm.

Fermentação (Condições otimizadas)	**Condições**		**Valores máximos**	
	S_0 (g/L)	**Tempo (h)**	**P (g/L)**	**Q_p (g/L.h)**
Experimentos a partir de xilose				
Meio sintético	80,0	48	42,5	1,80
Hidrolisado	80,0	48	40,3	1,50
Experimentos a partir de glicose				
Meio sintético	81,0	48	41,6	1,77
SSF	81,0	48	38,4	1,42

S_0: concentração inicial de xilose; P: concentração final de ácido succínico;
Qp: produtividade

Porém, um dos fatores determinantes para a eleição desta bactéria, foi pautado, fundamentalmente em sua tolerância a elevadas concentrações de substrato. LIN *et al*. (2008) estudaram o efeito inibição pelo substrato e pelo produto, sobre o crescimento de *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618, em fermentação usando glicose como principal fonte de carbono e verificaram que o crescimento celular foi completamente inibido com concentração de glicose acima de 140 g/L. Cabe ressaltar, que os autores se depararam com um decréscimo bastante significativo do rendimento e da produtividade, além de um prolongamento da fase lag na maioria dos experimentos acima de 70 g/L, ao contrário do perfil obtido no presente trabalho. Através de estudos cinéticos, constataram que as concentrações

críticas de acetato, etanol, formato, lactato e succinato foram 46, 42, 16, 74 e 104 g/L, respectivamente. Fenômeno semelhante foi descrito por Guettler *et al*. (1996) e Liu *et al*. (2008), sugerindo que a linhagem em questão poderia tolerar até 160 g/L de glicose inicial, mas, também alcançaram rendimentos e valores de produtividade bastante reduzidos.

Dessa forma, estudos envolvendo a avaliação do comportamento podem facilitar a compreensão desses fenômenos acerca do metabolismo da bactéria *Actinobacillus succinogenes* CIP 106512. Uma investigação sistemática dos efeitos de inibição pelo substrato e pelo produto é, então, um fator crucial para o desenvolvimento de uma estratégia de controle efetiva para melhorar a produção de ácido succínico.

5.12. Desenvolvimento de um modelo simples para a produção de ácido succínico

Nesta sessão, foram desenvolvidos estudos preliminares de modelos cinéticos empíricos simples para a produção de ácido sucínico em batelada, a partir de uma série de pesquisas na literatura, com foco nos estudos de Song *et al*. (2008) que estudaram a linhagem *M. succiniproducens*. Dessa forma, o comportamento cinético da bactéria *A. succinogenes* foi investigado a partir de fermentações conduzidas em diferentes concentrações iniciais de glicose, uma vez que de acordo com os experimentos apresentados até o momento fora o substrato que apresentou maiores valores em termos de eficiência do processo, quando considerado o rendimento máximo teórico.

5.12.1. Crescimento celular

De acordo com Monod (1942), μ apresenta uma variação em diferentes valores de S, e a taxa especifica de crescimento máxima ($\mu_{máx}$) para uma dada espécie microbiana em determinadas condições representa um valor teórico constante atingido assíntoticamente somente quando $S \rightarrow \infty$, sendo o cartão de identidade do microrganismo par aquele S específico. A constante de saturação *Ks* representa a afinidade da espécie microbiana com o substrato em questão, valores pequenos de S indicam maiores afinidades, portanto maiores fases exponenciais de crescimento. Para a determinação desses parâmetros ($\mu_{máx}$ e K_S), foram estimados em uma faixa contendo baixos valores de concentração inicial de glicose , entre 2,0 e 6,0 g/L, já que Monod propôs sua equação sem levar em conta possíveis efeitos de inibição.

É possível constatar que nestas fermentações os efeitos de inibição pelo substrato ou pelo produto foram inexistentes, resultando em valores de S^2/K_i e P/P_{CRIT} próximos de zero (SONG *et al*., 2008). Consequentemente, a equação 4.2 pode ser reduzida para a clássica equação de Monod. Os valores de K_S e $\mu_{máx}$ foram obtidos mediante linearização, obtendo o

Gráfico dos inversos *Lineweaver-Burk*, plotando-se $1/\mu$ versus $1/S$. Na literatura existem diversos trabalhos de determinação de K_S e $\mu_{máx}$ que fornecem informação importantes sobre a afinidade dos microrganismos por um dado substrato em particular, além de serem úteis na modelagem matemática dos referidos processos (SCHMIDELL *et al*., 2001). Em seguida, K_i foi calculado a partir das fermentações desenvolvidas em concentrações elevadas de glicose, entre 20 e 70g/L, usando os dados resultantes da fase exponencial de crescimento, nas primeiras horas do processo, visando evitar os efeitos inibitórios sobre o crescimento celular, causados pela formação do produto(s). Dessa forma, a expressão de Levenspiel (equação 4.2) foi reduzida a expressão de Andrews (equação 4.1), onde o valor de P/P_{CRIT} é igual a zero.

De forma análoga, plotando-se os valores de $1/\mu$ em função de S, o valor de Ki foi determinado (R^2=.981). Os valores de K_S, Ki e μ_m estão listados na Tabela 5.23. Os dados obtidos foram comparados com aqueles resultantes dos estudos de Song *et al.* (2008) e outros existentes na literatura.

Tabela 5.23. Dados dos parâmetros cinéticos obidos pelo modelo

Parâmetro de formação do produto associado ao crescimento celular (g/g)			
α_{AA}	α_{FA}	α_{LA}	α_{SA}
0,555	0,590	0	1,436
Parâmetro de formação do produto não associado ao crescimento celular (h^{-1})			
β_{AA}	β_{FA}	β_{LA}	β_{SA}
0,110	0,093	0,186	0,315
Rendimento em produto e subprodutos (g/g)			
Y_{AA}	Y_{FA}	Y_{LA}	Y_{SA}
0,887	1,359	0,886	1,162
Constantes do perfil cinético			
K_d (h^{-1})	K_S (g/L)	K_i (g/L)	
0,009	0,996	78,40	
Rendimento em células, taxa de crescimeto e concentração crítica de produto			
$\mu_{máx}$ (h^{-1})	Y_X (g g^{-1})	P_{CRIT} (g L^{-1})	
0,883	0,678	16,29	

O aspecto real da curva de Monod, demonstrando a ocorrência dos efeitos de inibições pelo substrato em excesso, causando diminuição na taxa de crescimento celular, pode ser observado na Figura 5.39, onde os resultados preditos pelo modelo foram comparados com os dados experimentais. Nota-se que, para valores elevados de concentração de substrato presente no meio, a inibição é um fenômeno que não pode ser ignorado, por gerar limitações do crescimento celular. De acordo com os dados obtidos, em uma concentração inicial de xilose igual a aproximadamente 20,0 g/L, o valor encontrado para a taxa de crescimento específico máximo ($\mu_{máx}$) alcançado pode ser próximo de 0,883 h^{-1}.

Por falta de predição de fenômenos inibitórios a equação hiperbólica de Monod ficou respeitada e é utilizada até os dias atuais nos estudos cinéticos. No entanto a ausência de inibição é na verdade uma situação pouco comum de ocorrer na prática, principalmente em cultivos descontínuos, onde ocorre um acúmulo de metabólitos que acabam interferindo desfavoravelmente no metabolismo e crescimento microbiano. Isto poderia ser atenuado se fossem sempre usadas baixas concentrações de substrato, o que na maioria das vezes não se torna rentável já que com isto seriam obtidas baixas concentrações de produto acarretando em custos elevados de separação e purificação (BAILEY & OLLIS, 1986).

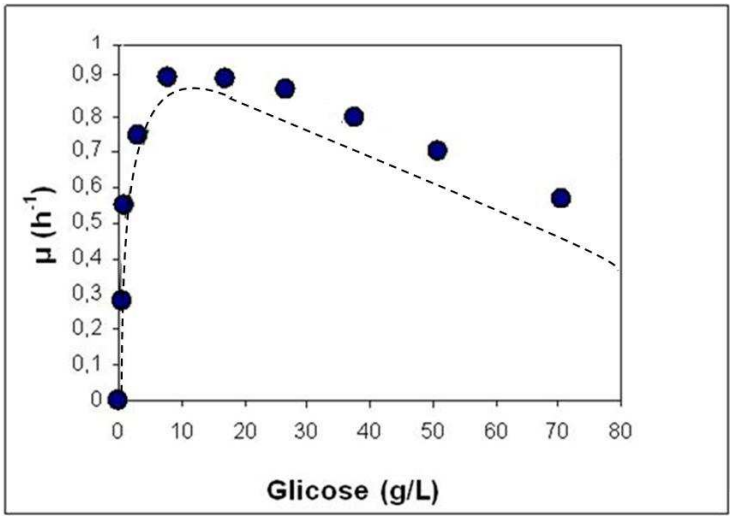

Figura 5.39. Avaliação dos efeitos da concentração inicial de glicose sobre a taxa específica de crescimento de *A. succinogenes* CIP 106512. Dados simulados (-) e experimentais (●)

A taxa específica máxima de crescimento determinada pelo modelo foi mais alta que valores já reportados na literatura (0.39-0.41 h^{-1}) (MCLINKAY *et al.*, 2008) e (0,5 h^{-1} (LIN *et al.*, 2008). CORONA-GONZALÉS *et al*. (2008) encontraram valores para a taxa de crescimento celular que foi reduzida de 0,41 para 0,09 com o aumento da concentração inicial de glicose de 10 para 100 g/L, por *A. succinogenes* ZT-130, ao estudarem a cinética pelo modelo proposto por JERUSALIMSKY (1967) para descrever o perfil cinético microbiano e, Song *et al*. (2008) encontraram um valor igual a 1,3245 h^{-1}, mas a linhagem utilizada foi diferente daquela usada no presente trabalho.

Baseando-se no valor encontrado de μ_m, pode-se concluir que a bactéria *A. succinogenes* CIP 106512 apresenta um desempenho promissor para a produção de ácido succínico, por fermentação. Esta diferença pode ter sido ocasionada pela composição de nutrientes do meio, de influência previamente hierarquizada com os estudos de planejamento. Com relação aos efeitos de inibição dos ácidos orgânicos no crescimento celular, tem sido reportado na literatura, que existe uma dependência entre esses efeitos com o pH do meio de cultura, com a constante de dissociação dos ácidos (pK_a) e com a concentração molar dos

ácidos (NARENDRANATH & THOMAS, 2001; VASSEUR *et al.,* 1999). Assim, o termo de produto nas equações (4.2 - 4.4) pode ser assumido como sendo a soma das quantidades individuais de cada ácido presente no meio de fermentação, para simplificar o modelo (SONG *et al*., 2008). A Figuras 5.40 e 5.41 mostram os perfis de crescimento da bactéra *A succinogenes*, formação de produto e subprodutos. Pode ser observado que os dados experimentais e simulados para formação de ácido succínico e crescimento celular apresentaram um ótimo ajuste.

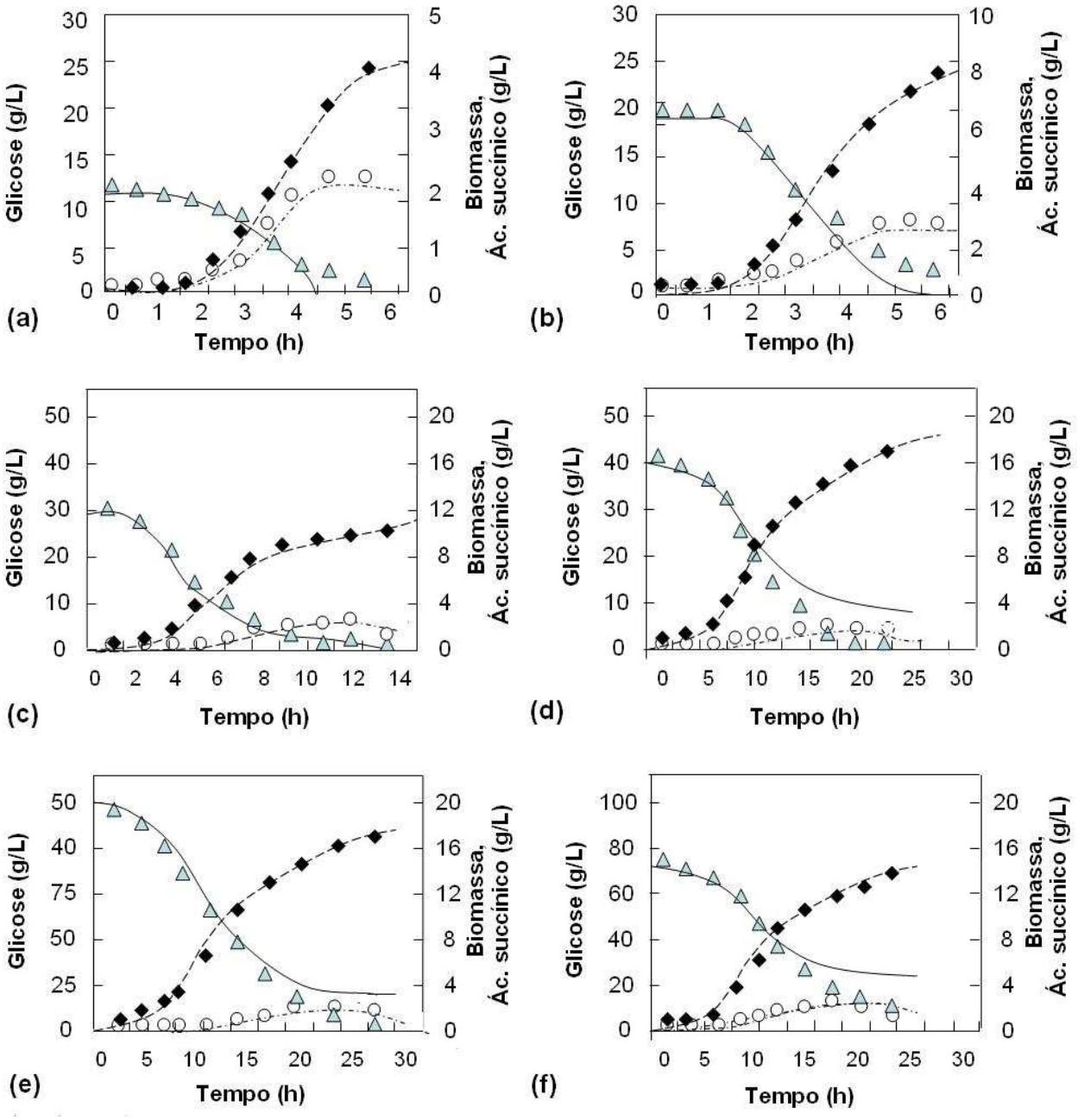

Figura 5.40. Perfil cinético de consumo de substrato (Δ), produção de ácido succínico (♦) e crescimento celular (o) em fermentação por batelada simples, por *A succinogenes*, com diferentes concentrações inicias de glicose (a) 10 g L^{-1}, (b) 20 g L^{-1}, (c) 30 g L^{-1}, (d) 40 g L^{-1}, (e) 50 g L^{-1}e (f) 70 g L^{-1}. Dados simulados (linhas) e experimentais (símbolos circulares)

.

Através da Figura 5.40 verificou-se que o crescimento celular é reduzido gradualmente com o aumento das concentrações de ácidos orgânicos presentes no meio de fermentação. Foi possível constatar que a concentração de ácido succínico aumentou proporcionalmente com a concentração celular, durante a fase de crescimento exponencial, mantendo-se também na fase estacionária de crescimento, comportamento típico de cinética mista.

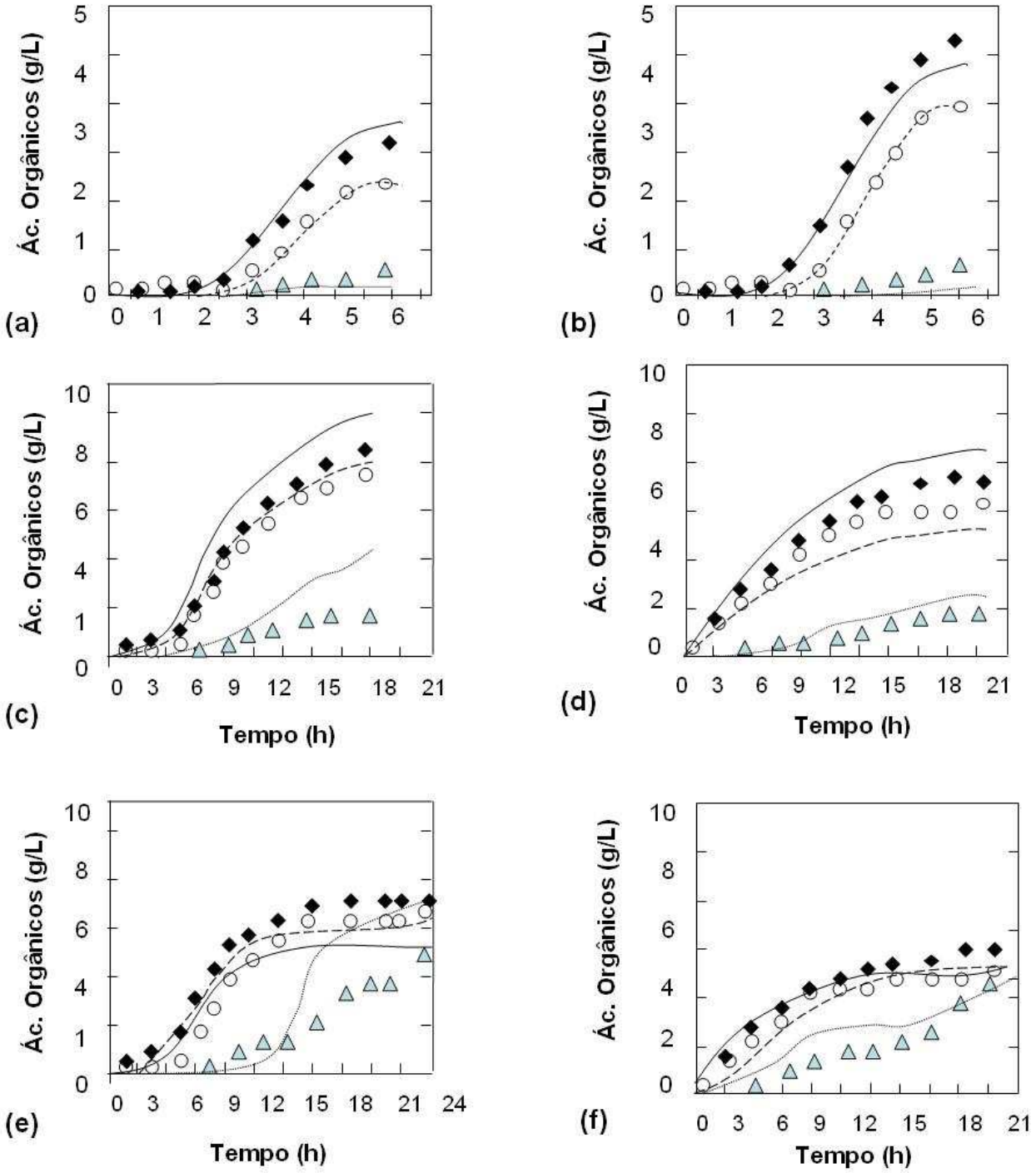

Figura 5.41. Perfil cinético da formação dos ácidos acético (♦), fórmico (○) e lático (▲) durante a fermentação, por *A succinogenes*, a partir de diferentes concentrações iniciais de glicose. (a) 10 g L^{-1}, (b) 20 g L^{-1}, (c) 30 g L^{-1}, (d) 40 g L^{-1}, (e) 50 g L^{-1}e (f) 70 g L^{-1}. Dados simulados (linhas) e experimentais (símbolos).

Portanto, Isto significa que a produção de ácido de succínico por *A. succinogenes* CIP 106512 segue o modelo proposto por Luedeking-Piret, indicando que a taxa de formação de produto está relacionada tanto com a taxa de crescimento celular (r_X), como também com a concentração de biomassa (X) (LUEDEKING-PIRET, 1959).

5.12.2. Avaliação e classificação do perfil cinético de formação de produto(s)

De acordo com os gráficos os valores preditos pelo modelo apresentaram um ajuste adequado aos dados experimentais, diminuindo a distância entre eles. O coeficiente não associado, para formação de ácido succínico (β_{SA} = 0.315 h^{-1}), foi determinado quando não foi identificado nenhum crescimento celular, ou seja, para valores de $P \geq P_{CRIT}$. Já o coeficiente de crescimento associado foi obtido para valores de $P < P_{CRIT}$. Os coeficientes para formação dos subprodutos foram obtidos de maneira semelhante à identificação do ácido succínico, através da equação 4.6. Estes valores foram muito próximos aos encontrados por SONG *et al.*(2008), mostrando que a linhagem M. succiniciproducens possui comportamente semelhante a bactéria *A. succinogenes.*

Como ocorrido com o perfil para ácido succínico, o perfil cinético para formação do ácido acético e ácido fórmico foi classificado como associado ao crescimento celular, de acordo com a Figura 5.41. Entretanto, percebe-se que o ácido lático começou a ser produzido quando a taxa de crescimento celular foi reduzida, em um perfil tipicamente não associado ao crescimento. Comportamento diferente deste é observado com outros microrganismos, como *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, e *Saccharomyces*, onde o ácido lático é apresentado como um produto de formação associada ao crescimento, (AKERBERG *et al.*, 1998; HA *et al*., 2003; YOUSSEF *et al*., 2005 e SHULER *et al*., 1992).

5.12.3. Avaliação e classificação do perfil cinético de consumo de substrato

No ajuste entre os dados simulados e experimentais, para o consumo de glicose, foram observadas pequenas discrepâncias na fase de crescimento estacionário, que ficaram ligeiramente maiores, com o aumento das concentrações iniciais de glicose, como mostrado nas Figuras 5.40 (d-f). Para simplificar o modelo, não foi incorporada a produção de CO_2, pelas células, que acontece através de reações de descarboxilação, o que pode ter causado esta ligeira discrepância entre os dados analisados. Parte desse carbono também é liberada durante a lise celular. Adicionalmente, mudanças na morfologia celular durante a fase de crescimento estacionário (DATTA *et al*., 1992), podem ter resultado esta variação**.** Uma análise elementar (C,H,O e N) da linhagem poderia contribuir para definir a quantidade de substrato que é encaminhado, efetivamente, para a composição celular (SONG *et al.*, 2008).

.

No entanto, o desenvolvimento deste modelo simples descreve satisfatoriamente o comportamento cinético do crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato, podendo ser usado para aperfeiçoar o processo para a produção de ácido succínico. Por exemplo, a concentração ótima de substrato (glicose) pode ser selecionada para alimentar um processo de fermentação em batelada ou contínuo.

O emprego de modelos mais aprimorados pode ampliar o conhecimento dos mecanismos de controle sobre a linhagem estudada, tornando-se uma etapa crucial para identificar os objetivos corretos para a otimização de um processo, contribuindo para aumentar o desempenho operacional e, conseqüentemente, aumentar a concentração do produto desejado, uma vez que a partir da degradação do substrato diversas reações paralelas e consecutivas ocorrem, formando diferentes produtos. Para avaliar os resultados mais expressivos obtidos com o presente trabalho, recomenda-se uma apreciação final da **Tabela 2.3** (Revisão Bibliográfica), onde estão descritas diversas estratégias de fermentação para a produção de ácido succínico, reportadas pela literatura.

5.13. Considerações finais

Os parâmetros que determinam a viabilidade econômica de um processo biotecnológico são a concentração final de produto, o fator rendimento e a magnitude da produtividade. Enquanto o rendimento está mais relacionado ao custo variável de matéria-prima, a concentração final de produto e a produtividade estão mais ligadas com o custo fixo e investimento total. As taxas de produção raramente estão alcançando o valor estipulado pelo Departamento de Energias do EUA (DOE), fixado em 2.5 g/L.h. Sendo assim, através da avaliação dos diversos resultados disponíveis na literatura e, conseqüentemente do processo biotecnológico para a produção de ácido succínico, nenhum estudo desenvolvido até a presente data, pode ser considerado economicamente competitivo em relação ao processo por rota química. Mesmo assim, várias companhias anunciaram a produção de ácido succínico, como sendo considerado o produto comercial do futuro.

O objetivo e o desenho experimental adotado para a execução do presente trabalho, pautaram-se, fundamentalmente, na identificação de uma linhagem até então pouco explorada e nas questões econômicas do processo, mediante o uso de um meio simplificado para a produção de ácido succínico, ao contrário das atuais pesquisas realizadas, em que a complexidade do meio de cultivo aliado a técnicas avançadas de engenharia genética e integração de processos de separação e purificação (PSP) são recorrentes na busca por rendimentos consideráveis.

Concernente com esta realidade, os resultados alcançados com o presente trabalho foram bastante satisfatórios, pois foi possível confirmar a adequação da bactéria *Actinobacillus*

succinogenes CIP 106512 para a produção de ácido succínico, a partir de diferentes fontes de carbono, em meio de composição mínima. Além disso, o modelo proposto pode ser útil para o desenvolvimento e o aperfeiçoamento dos processos para a produção de ácido succínico a partir de fontes renováveis.

"O Brasil encontra-se em posição bastante privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral de biomassas e seguir sua vocação natural para desenvolvimentos nesta temática. O momento nunca foi tão propício."

Nei Pereira Jr

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

6.1. Conclusões

- ✓ A bactéria *Actinobacillus succinogenes* mostrou-se um microrganismo agente do processo de produção de ácido succínico bastante promissor. Sua habilidade de consumir os açúcares que aparecem em maior proporção nos hidrolisados de materiais lignocelulósicos, aliada a elevada capacidade de produção desse ácido orgânico ficaram evidenciadas, gerando oportunidades para futuros e interessantes desenvolvimentos tecnológicos;
- ✓ Nos experimentos iniciais, o tempo de preparo do inóculo ficou padronizado entre 12 a 15 horas de cultivo, através de monitoramento do perfil cinético. Após este período, a fermentação ficou caracterizada pelas fases de desaceleração e estacionária do crescimento celular, para ambas as fontes de carbono utilizadas;
- ✓ A inclusão de duas etapas de aclimatação, durante o processo de propagação celular, permitiu a redução do tempo de fermentação em hidrolisado hemicelulósico, com efeito positivo sobre o valor da produtividade volumétrica, além de aumentar a produção final de ácido succínico, com uma concentração muito próxima ao valor obtido em meio sintético (diferença de apenas 10 %), o que denota a robustez da bactéria face a utilização de um hidrolisado contendo agentes tóxicos .
- ✓ Os melhores resultados da razão C:N sobre o crescimento celular estão entre 13,0 e 22,7:1. Estes valores representam uma concentração de nitrogênio de 0,65 g/L no meio de cultivo. A linhagem se desenvolveu adequadamente em concentrações elevadas de xilose. Porém, para os ensaios com glicose, houve um decréscimo no crescimento celular, indicando inibição acima de 36,0-40,0 g/L;
- ✓ Com a aplicação da técnica de planejamento experimental seqüencial foi constatada uma maior importância estatística da interação entre os componentes $NaHCO_3$ e

$MgSO_4$, com valores de *p*-level abaixo do estabelecido para a análise (0,1). O KH_2PO_4 mostrou um efeito negativo sobre a concentração final de ácido succínico, no entanto apresentou a menor significância estatística entre as variáveis analisadas.

- ✓ O pH mostrou-se uma variável de elevada importância estatística, em ambos os tempos de fermentação (24 e 48 horas), com aumento do seu valor do nível inferior (pH=6.0) para o superior (pH=8.0), conforme já evidenciado por outros autores. A temperatura também apresentou efeito significativo, em 24 horas de fermentação;
- ✓ As concentrações de glicose e xilose apresentaram um efeito positivo, em 24 horas de fermentação, porém negativo para 48 horas de fermentação, mas não significativo. A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo mais adequado para o ajuste dos dados experimentais foi o modelo quadrático reduzido, possibilitando a validação das condições otimizadas, em biorreator;
- ✓ A produção de ácido succínico a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, resultou em uma concentração final de produto igual a 40,3 g/L, com 80,0 g/L de concentração inicial de xilose, sob agitação de 150 rpm a 37ºC. Nos ensaios com 80 g/L de concentração inicial de xilose comercial, foram obtidos os melhores resultados, atingindo uma concentração final de ácido succínico de 42,5 g/L, um valor de produtividade volumétrica igual a 1,80 g/L.h e um rendimento em produto igual a 0,66 g/g. Porém, efeitos inibitórios sobre o crescimento celular, além do registro de maiores concentrações de subprodutos, foram observados;
- ✓ Para as fermentações conduzidas em presença de hidrolisado hemicelulósico, o fator crucial foi à concentração inicial de ácido acético (4,0-6,0 g/L para 20-80 g/L de xilose, respectivamente) já presente no hidrolisado, desde o ínicio do processo, contribuindo para inibir o crescimento celular e reduzir a formação de ácido succínico, em relação aos ensaios conduzidos em meio sintético;
- ✓ Para o processo SSF conduzido em frascos agitados, com uma concentração inicial de glicose igual a 75 g/L, com as seguintes condições: relação sólido-líquido 3:10 (g/mL), carga enzimática 25 FPU/g, concentração inicial de células de 3 g/L e aproximadamente 32 horas de processo, foram obtidos uma concentração final de ácido succínico e uma produtividade volumétrica iguais a 35,1 g/L e 1,21 g/L.h, respectivamente;
- ✓ Para o aproveitamento da celulose, em biorreator, ao final da fase de pré-hidrólise, foi observada uma concentração de glicose de aproximadamente 80,0 g/L e, o processo SSF apresentou respostas muito próximas aos ensaios conduzidos em frascos agitados. Foi observada uma redução no tempo de fermentação para 28 horas, com

um aumento na concentração final de ácido succínico e produtividade, de 35,1 para 38,4 g/L e de 1,21 para 1,42 g/L.h, respectivamente. A redução no período de fermentação foi decorrente do aumento na concentração inicial de células. Adicionalmente, sob as mesmas condições em biorreator, o ensaio conduzido a partir de meio sintético apresentou uma concentração final de ácido succínico de 41,6 g/L, com uma produtividade volumétrica de 1,77 g/L.h, em aproximadamente 24 horas, mostrando que a validação em biorreator foi eficiente;

- ✓ Através dos estudos dos modelos cinéticos simples, para a produção de ácido sucínico em batelada, a elevada taxa específica máxima de crescimento (μ_m), mostrou que a bactéria *A. succinogenes* CIP 106512 possui um bom desempenho na produção de ácido succínico, por fermentação. Foi observado que o crescimento celular é reduzido gradualmente com o aumento das concentrações de ácidos orgânicos, cessando completamente quando são alcançados valores de aproximadamente 16 g/L (P_{CRIT});
- ✓ O crescimento celular de *A succinogenes* CIP 106512 pode ser representado, de acordo com os estudos de modelagem, por um modelo de Monod expandido, incluindo as constantes de inibição de substrato e de produto, sugeridas por Andrews (1968) e Levenspiel (1980), respectivamente;
- ✓ A produção de ácido de succínico segue o modelo de Luedeking-Piret (1959), indicando que a taxa de formação de produto está relacionada tanto com a taxa de crescimento celular (r_X), como também com a concentração de células (X), com os parâmetros de crescimento associado e não associado, para ácido succínico, iguais a 1.436 e 0.314 h^{-1}, respectivamente. A formação do ácido acético e ácido fórmico foi associada ao crescimento celular. Entretanto, o ácido lático começou a ser produzido quando a taxa de crescimento celular foi reduzida, em um perfil tipicamente não associado ao crescimento;
- ✓ No ajuste entre os dados simulados e experimentais, para o consumo de glicose, foram observadas pequenas discrepâncias na fase de crescimento estacionário, que ficaram ligeiramente maiores, com o aumento das concentrações iniciais de glicose (40,0; 50,0 e 70,0 g/L);
- ✓ O modelo permitiu a identificação de concentrações de glicose e ácidos orgânicos, consideradas ótimas em um biorreator, tanto para o crescimento celular como para a produção do ácido succínico. Foi possível elucidar as características da bactéria *A. succinogenes* e explicar sua habilidade em sintetizar ácido succínico;

6.2. Sugestões

- Como o desenvolvimento do modelo simples descreveu satisfatoriamente os comportamentos cinéticos do processo, ele poderá ser usado para aperfeiçoar a produção de ácido succínico. Por exemplo, a concentração ótima de substrato (glicose) pode ser selecionada para alimentar um processo de fermentação contínuo ou em batelada alimentada. Esta forma de condução permitiria estender a fase exponencial de crescimento e controlar os níveis de substrato, evitando assim, os efeitos repressores sobre o metabolismo da bactéria;
- Outras concepções podem ser incorporadas ao presente trabalho, como a estratégia de operação denominada *SSCF* (*Simultaneous Saccharification and Cofermentation - SSCF*), no qual a co-fermentação se refere à fermentação de ambos os açúcares, pentoses e hexoses, em uma mesma etapa. Nesta configuração o hidrolisado hemicelulósico e a celulose não são separados após a etapa de pré-tratamento, permitindo que os açúcares da hemicelulose sejam convertidos a ácido succínico juntamente com a sacarificação e fermentação da celulose;
- Verificar a habilidade da bactéria *Actinobacillus succinogenes* face à utilização de outros açucares como lactose, galactose e maltose, incluindo o uso de reestimação de resultados, como rendimento e produtiviade, mediante a utilização de meios de cultivo mais complexos do que o meio utilizado no decorrer do presente trabalho;
- Utilizar a metodologia de Plackett-Burman para a determinação dos parâmetros cinéticos do modelo gerado com o presente trabalho e, verificar a influência destes sobre os perfis das variáveis de estado;
- Estudar uma etapa de inclusão de membranas de eletrodiálise bipolares após micro/ultrafiltração em membranas de fibra oca (*hollow fiber*), para separação da forma aniônica (succinato) e purificação, seguida de cristalização;
- Caracterizar as membranas com relação aos dados de resistência, *fouling* (queda de fluxo do permeado/retido), temperatura, pH e pressão transmembrana durante o processo de separação.
- Realizar balanços de massa e finaceiro visando a o escalonamento do processo, desenvolvido com o presente trabalho, a partir de estudos de viabilidade industrial.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, L., ISAR, J., DUTT, K., SAXENA, R.K, 2007. Statistical optimization for succinic acid production from *E. coli* in a cost-effective medium. Appl Biochem Biotechnol;142:158–67.

AGARWAL, L., ISAR, J., MEGHWANSHI, G.K., SAXENA R.K, 2006. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. J Appl Microbiol 100(6):1348–1354.

AGARWAL, L., ISAR, J., SAXENA, R.K, 2005. Rapid screening procedures for identification of succinic acid producers. J Biochem Biophys Methods;63:24–32.

AGARWAL, L., ISAR, J., MEGHWANSHI, G.K., SAXENA R.K, 2007. Influence of environmental and nutritional factors on succinic acid production and enzymes of reverse tricarboxylic acid cycle from *Enterococcus flavescens*. Enzyme and Microbial Technol. v.40, p.629–636.

AGUILAR, R., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G., VÁSQUEZ, M, 2002. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. Journal of Food Engineering, v. 55 n. 4, p 309-318.

AKERBERG, C., HOFVENDAHL, K., ZACCHI, G & HAHN-HAGERDAL, B, 1998. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, pp. 682–690.

ALTAF, M. 2007. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation, Bioresour. Technol. 98, pp. 498–503.

ANDERSSON, C., HODGE, D., BERGLUND, K.A, ROVA, U, 2007. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnol Prog;23:381–8.

ANDREWS, J.F, 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates, *Biotechnol. Bioeng.* 10, pp. 707–723

ANTUNES, A. J. & CANHOS, VP, 1983. Aditivos em Alimentos. Campinas, FEA/UNICAMP, cap 7, vitaminas.

ARIFEEN, N., WANG, R.-H., KOOKOS, I.K., WEBB, C., KOUTINAS, A.A, 2007. Optimisation and cost estimation of novel wheat biorefining for continuous production of fermentation feedstock. Biotechnol. Prog. 23, 872–880.

AWAFO, V. A.1997. *Tese de Doutorado,* McGill University, Canadá.

BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F, 1986. Biochemical Engineering Fundamentals, Mc Graw Hill.

BANIEL, A.M. & EYAL, A.M, 1995. Citric acid extraction. *US Patent 5,426,220*.

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

BASTOS, V. D, 2007. "Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias". Setorial, Rio de Janeiro, 25, p. 5-38.

BAUDEL, H, 2006. "Pré-tratamento e hidrólise", Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, Projecto para program de pesquisas em politicas publicas, Campinas, Unicamp.

BEAUPREZ. J.J., deMEY, M., SOETAERT, W.K, 2010. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. Process Biochemistry 45, 1103–1114

BÉGUIN, P.; ALBERT, J.P, 1993. The microbial degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev., v. 13, p. 25-58.

BENNETT, G. N., SAN, K. Y, MARTINEZ, I, 2009. Mutant *E. coli* Strain with Increased Succinic Acid Production. *USP 7,223,567.*

BENNETT, G. N., SAN, K. Y, MARTINEZ, I, 2009. Fermentation for succinic acid. PCT Int. Appl, 31 pp. CODEN: PIXXD2 WO 2003083709 CAN 151:122157 an 2009: 828257 CAPLUS

BERGEY, D.H., HOLT, J.G, 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore, Maryland, USA : Copyright. 194-195p.

BETANCUR, G. J. V & Pereira, Jr. N, 2010. Sugarcane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pre-treatment optimization. Electronic Journal of Biotechnology.

BETANCUR, G. J. V, 2005. Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Pichia stipitis*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ. Tese de Mestrado.

BETANCUR, G. V, 2010 Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração. Tese de doutorado. Programa de Pós graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

BIOAMBER. 2009. The World's First Bio-based Succinic Acid Plant has been launched. Disponível em: http://www.bio-amber.com/. Acessado em: 4 Ago 2010.

BOX, G. E. P. & HUNTER, W. G.1978. Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis, and model building, John Wiley and Sons, New York.

BRDTAC. 2002. Vision for biobased products in the United States. Biomass. Technical Advisory Committee.

BROGAN, J.M., Lally, E.T. and Demuth, D.R, 1996. Construction of pYGK, an *Actinobacillus actinomycetemcomitans–Escherichia coli* shuttle vector. *Gene* 169, pp. 141–142.

BRUNS, R.E, BARROS NETO, B., SCARMÍNIO, I.S, 1995. Planejamento e Otimização de experimentos. Editora UNICAMP.

CAMARASA, C., GRIVET, JP., DEQUIN, S, 2003. Investigation by 13C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. Microbiol-Sgm;149:2669–78.

CARAMEZ, M, 1999. Produção de Endoxilanases Termoestáveis por *Termomyces lanuginosus* IOC-4145 em Meio Semi-Sólido. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

CAROLE, M. T., PELLEGRINO, J. e PASTER, M. D, 2004. Opportunities in the Industrial Biobase Products Industry. Appl. Biochemistry and Biotechnology, v. 11-116.

CARVALHEIRO, F., DUARTE, C.L., MEDEIROS, R, 2005. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. Biomedical and Life Sciences. Volume 29, Number 12, 1887-1891.

CASAS LÓPEZ, J.L., SÁNCHEZ PÉREZ, JÁ., FERNÁNDEZ SEVILLA J.M., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., MOLINA GRIMA and CHISTI Y, 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. Enzyme Microb. Technol., 33, 270.

CHATTERJEE, R, MILLARD, C.S, CHAMPION, K, CLARK, D.P, DONNELLY, M.I, 2001. Mutation of the ptsG gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. Appl Environ Microb 67:148–154.

CHEN, K., JIANG, M., WEI, P., YAO, J., WU, H, 2010. Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes*. Appl. Biochem. Biotechnol. 160, 477–485.

CHEN, K., ZHANGA, H., MIAOB, Y, 2010. Succinic acid production from enzymatic hydrolysate of sake lees using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. Enzyme and Microbial Technology. 47(5):236-240.

COLODETTE, L. J, 2008. Biomassas ou biomanias. Revista opiniões. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Disponível em: http://www.revistaopinioes.com.br/

CORDOBA, P. G., 2001. “Modernos Conceitos do Tratamento de Caldo”, Jornal Cana, Série II, Ano VIII, n. 91, pp. 37.

CORNILS B & LAPPE P, 2002. Dicarboxylic acids, aliphatic Ullmann’s Enzyklopedia of industrial chemistry. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

CORONA-GONZALEZ, R.I., BORIES A., GONZALEZ-ALVAREZ, V., PELAYO-ORTIZ, C., 2008. Kinetic, study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130. Process Biochem;43:1047–53.

CORONA -GONZALEZ, R.I., BORIES A., GONZALEZ-ALVAREZ, V., SNELL-CASTRO R, TORIZ- GONZÁLEZ G, PELAYO-ORTIZ C, 2010. Succinic acid production with *Actinobacillus succinogenes* ZT-130 in the presence of succinic acid. Curr Microbiol;60:717.

COUGHLAN, M.P, 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews. v. 3, p. 39-109

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; SOUZA, L. B. S. DE; SANTANA, W. J., COUTINHO, H. D. M.2004. "A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável)". *Holos*, ano 20.

CROLLA, A. & K.J. KENNEDY, 2004. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins, J. Biotechnol. 110, pp. 73–84.

CUKALOVIC. A, STEVENS C. V, 2008. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. Biofuels Bioproducts Biorefining; 2:505–29.

CUZENS, J.C. & MILLER, J.R, 1997. Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. Renewable Energy, v. 2/3, n. 10, p. 285-290.

daCOSTA, J.P.L., SCHORM, C., QUESADA-CHANTO, A., BÖDDEKER, K.W., JONAS, R, 1999. On-line dialysis of organic acids from a *Propionibacterium freudenreichii* Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 76, p. 99-105.

DANNER, H., BRAUN, R, 1999. Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass. Chem. Soc. Rev. v. 28, p. 395-405.

DATTA & JAIN, 1992. Method for making succinic acid, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* variants for use in process and methods for obtaining variants. *US patent 5,521,075*.

DATTA, R, 1981. Energy requirements for lignocellulose pretreatment processes. Process Biochem. June/July, p.16-19.

DATTA, R, 1992. Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation. *U.S. patent 5,143,833.*

DATTA, R., GLASSNER, D.A., JAIN, M.K., VICK ROY, J.R., 1992. Fermentation and recovery process for succinic acid. *US patent 5,168,055*.

DAVID, H., CHRISTIAN, A., JONAS, H, 2008. Succinic Acid production from forest based succinic acid production from forest based raw materials. 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.

DAVIES, M.B., AUSTIN, J. e PARTRIDGE, D.A. 1991. Vitamin C: in chemistry and biochemistry. Cambridge: Royal Society of Chemistry. p. 33-35.

DAVISON, B.H, NGHIEM, N.P, RICHARDSON, G.L, 2004. Succinic acid adsorption from fermentation broth and regeneration. Appl Biochem Biotechnol;113–116:653–69.

DCI, 2001. disponvel em: http://www.dci.com.br/Braskem-anuncia-conversao-de_debentures-em-acoes-pela-Odebrecht-28-177497.html

deMEYM,MAERTENS, J., LEQUEUX G.J., SOETAERT W.K., VANDAMME E.J, 2007. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. BMC Biotechnol; 7:34–48.

DECHEMA, E. V, 2004. White biotechnology: opportunities for Germany. *Position Paper of Dechema e.V*. Frankfurt.

DEDINI SA. Indústria de Base. http://www.dedini.com.br. Acesso em 18 de outubro de 2007.

DELGENES, J.P., ESCARE, M.C., LAPLACE, J.M., MOLETTA, R., NAVARRO, J.M, 1998. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. Biomass and Bioenergy, v. 11, n. 4, p. 353-360.

DELHOMME, C., WEUSTER-BOTZ, D., KÜHN, F.E, 2009. Succinic acid from renewable resources as a C4 building-block chemical – a review of the catalytic possibilities in aqueous media. Green Chem. 11, 13–26.

DORADO, M.P., LIN, S.K.C., KOUTINAS, A., DU, C.Y., WANG, R.H., WEBB, C, 2009. Cerealbased biorefinery development: utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid. J. Biotechnol. 143, 51–59.

DOTY, L. F, 2005. Uma breve visão geral sobre plásticos biodegradáveis. Edmonton: Oxobiodegradable Plastics Institute (OPI). Disponível em: www.oxobio.org. Acesso em: 8.8.2008.

DU PREEZ, J.C, 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. Enzyme and Microbial Technology, v. 16, n. 11, p. 944-956.

DU, C, 2007. Succinic acid production from wheat using a biorefining strategy, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, pp. 1263–1270

DU, C.Y., CAROL LIN, S.K., KOUTINAS, A., WANG, R.H., DORADO, P., WEBB, C, 2008. A wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid. Bioresour Technol 99(17):8310 8315

EIA. Energy Information Administration, 2008. Disponível em www.iea.org. Acessado em 22/05/2011.

EMBREE, H. D.; CHEN, T.; PAYNE, G. F, 2001. Oxygenated aromatic compounds from renewable resources: motivation, opportunities and prospective separations. *Chemical* Engineering Journal. 84, 133-147.

EPOBIO, 2006. Foundation paper for the biopolymers flagship. Epobio workshop “Products from plants – the biorefinery future”, Wageningen International Conference Centre, 22-24.

FENNEMA, O, 1985. Food Chemistry. Marcel Dekker Inc. USA.

FIORUCCI, A. R., SOARES, M. H. F. B, 2002. Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano. QUIMICA NOVA.

FLORES, N., LEAL, L., SIGALA, J.C., DE ANDA, R., ESCALANTE, A., MARTINEZ A, 2007. Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating arca and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. J Mol Microbiol Biotechnol;13:105 16.

FOGEL, R, 2004. Otimização da hidrólise ácido de Bagaço de cana-de açúcar e utilização do hidrolisado na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

FOGEL, R., GARCIA, R., OLIVEIRA, R., PALACIO, D., MADEIRA, L., PEREIRA Jr, N, 2005. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and invetigations on its fermetability for production of xylitol by *Candida guilliermondii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 741-752.

FORSS, D.A. & SUGISAWA, H, 1981. Brief reviews of dairy and soy products. Nova York, 355-372.

FORSTER, A, 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, p. 1409–1417.

FRADET, A. & TESSIER, M, 2003. Synthetic methods in Step-Growth Polymers, Chapter 2: Polyesters.

FREDRICKSON, A. G (1970) apud BAILEY, J. E, 1998. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. Biotechnol. Prog. v. 14, p. 8-20.

FREDRICKSON, A. G, 1976. Formulation of structured growth models. Biotech. Bioeng. v. 18, p. 1481-1486.

FREY, J, 1992. Construction of a broad host range shuttle vector for gene cloning and expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other *Pasteurellaceae*. *Res. Microbiol.* 143, pp. 263–269.

GADIV PETROCHEMICAL INDUSTRIES LTD. SUCCINIC ACID, 2000. Disponível em: http://www.gadiv.com/msds/SUCCINIC%20ACID.doc. Acesso em: 1 jan 2007.

GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, Gil & VÁZQUEZ, M, 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. Journal of Food Engineering, May 2006, vol. 74, no. 1, p. 78-88.

GAONA, O., KINT, D., ILARDUYA, A., ALLA, A., BOU, J., MUNÕZ-GUERRA, S, 2003. “Preparation and Hydrolytic Degradation of Sulfonated poly(ethylene terephthalate) Copolymers”, *Polymer*, v. 44, pp. 7281-7289.

GARRITY, G.M., BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T., 2004. Bergey’s manual of systematic bacteriology - the proteobacteria. East Lansing, MI: Springer; p. 2816.

GE, X.M. & BAI, F.W. 2006. Intrinsic kinetics of continuous growth and ethanol production of a flocculating fusant yeast strain SPSC01, *J. Biotechnol.* 124, pp. 363–372.

GERBSCH, N. & BUCHHOLZ, R, 1995. New processes and actual trends in biotechnology. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 16, p. 259-269.

GHOSE, T.K, 1987. Measurement of cellulose activities. Pure Appl. Chem. 59, 257 268.

GITIRANA, L. L, 2007. Avaliação do Processo de Extração Líquido- Líquido com a Adição de Sais para Recuperação e Purificação de Ácidos Orgânicos. FEQ, UNICAMP. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas,12p.

GLASSHER, 1998. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. *US patent 5,723,322.*

GLASSNER D.A & DATTA R, 1996. Process for the production and purification of succinic acid. *US patent 5,143,834.*

GLUETTLER M.V, RUMLER, D & Jain MK, 1996. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic acid producing strain from the bovine rumen. *Int. J. Syst. Bacteriol., 49*, 207-216.

GOKARN, R.R., EITEMAN, M.A., MARTIN, S.A. AND ERIKSSON, K.-E.L, 1997. Production of succinate from glucose, cellobiose, and various cellulosic materials by the ruminal anaerobic bacteria *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 68, pp. 69–80

GOKARN, R.R., EVANS, J.D., WALKER, J.R., MARTIN, S.A., EITEMAN, M.A. & Altman, E, 2001. The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, pp. 188–195

GOLDBERG, I., PELEG, Y. e ROKEN, J. S, 1991. Citric, fumaric and malic acids biotechnology and food ingredients. New York: Van Nostrand Reinhold. p.349-374.

GOMBERT, A. K. & NIELSEN, J, 2000. Mathematical modeling of metabolism. Cur. Op. Biotechnol. v. 11, p. 180-186.

GONZALES, T. A., UBEDA, B. T., SANTOS, L. O., MONTE ALEGRE, R, 2008. Produção de ácido succínico: uso da ferramenta de planejamento experimental fatorial para otimização do processo. XVII Congresso nacional de engenharia química. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

GONZALES, T. A., UBEDA, B. T., SANTOS, L. O., MONTE ALEGRE, R, 2008. Estudo da Influência da Fonte de Carbono e da Razão C:N no Crescimento Celular da Bactéria *Actinobacillus succinogenes.* XVI SINAFERM. Universidade estadual de campinas

GOSWAMI, V. & SRIVASTAVA, A.K, 2000. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. Biochemical Engineering Journal, v. 4, p. 121-128.

GU, Z., RICHERT, D.A., GLATZ, A., GLATZ, C.E, 1998. Effects propionic acid on propionibacteria fermentation. Enzyme and MicrobialTechnology, 22, 13-18.

GUETTLER, M.V, JAIN M.K., SONI B.K, 1999. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. *US patent 5,723,322.*

GUETTLER, M.V., RUMLER, D., JAIN, M.K, 1996. Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic acid producing strain from the bovine rumen. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 207–216.

GUETTLER, M.V., MICHAEL V., JAIN, M. K., RUMLER & DENISE,1996. Method for Makind Succinic Acid, Bacterial variants for use in the process, ans methods for obteining variants. *US Patent 5.573.931.*

HA M.Y., KIM S. W., LEE Y. W AND KIM. S. J, 2003. Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium, J. Biosci. Bioeng. 96, pp. 134–140

HABERT, A. C., BORGES, C.P., NÓBREGA, R, 1997. "Escola Piloto em Engenharia Química - Processos de Separação com Membranas", COPPE/UFRJ.

HAHN-HÄGERDAL, B., JEPPSSON, H., SKOOG, K., PRIOR, B.A, 1994. Biochemistry and physiology of the xylose fermentation by yeasts. Enzyme and Microbiology Technology, v. 16, p. 933-943.

HAHN-HÄGERDAL, B., NILVEBRANT, N.O.; PALMQVIST, E., JÖNSSON, L.J, 1996. Detoxification of wood hydrolisates with lacasse and peroxidase from white-rot fungus *Trametes vesricolor*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 49, p. 691-697.

HARDER, A. & ROELS, J. A, 1982. Application of simple structured models in bioengineering. Adv. Biochem. Bioeng. v. 21, p. 55-107.

HARRIS, D.C, 1999. *Quantitative chemical analysis*. 5ª ed. Nova Iorque: W. H. Freeman. Appendix G (acid dissociation constants), p. ap15-ap26.

HATANAKA, H., WANG, E., TANIGUCHI, M. IIJIMA, S., KOBAYASHI, T, 1988. Production of vitamin B_{12} by a fermentor with a hollow-fiber module. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 470-473.

HATCH, R. T. & HARDY, R, 1989. Microrganisms as producers of feedstock chemicals. Disponível em: www.ryanherco.com. Acessado em: Nov de 2006.

HATTI & KAUL R, 2007. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals–a cradle-to-grave perspective, Trends Biotechnol. 25, pp. 119–124.

HEATH, A.P., BENNETT, G.N., KAVRAKI, L.E, 1978. Finding metabolic pathways using atom tracking. Bioinformatics, 26: 1548-1555.

HEERDE, E. & RADLER, F. 1978. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae.* Arch. Microbiol., v. 117, p. 269-276.

HESTEKIN, J., SNYDER, S., DAVISON, B, 2002. Direct capture of products from biotransformations. Report from Vision 2020, 1-13.

HOEK, P. V., ARISTIDOU, A., HAHN, J. J., PATIST, A, 2003. Fermentation goes large- scale. Biotechnology. p.37-42.

HOFVENDAHL, K. & B. HAHN-HAGERDAL, 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources (1), Enzyme Microb. Technol. 26, pp. 87–107.

HONG & LEE, 2002. Pta LdhA double mutant *Escherichia coli* SS373 and the method of producing succinic acid there from. *US 6,448,061*.

HONG, S.H., HONG, J.S., KIM, S.Y., LEE, Y.H. In, S.S. CHOI, J.K. RIH, C.H. KIM, H. JEONG, C.G. HUR AND J.J. KIM, 2004. The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*, *Nature Biotech.* 22, pp. 1275–1281.

HONG, S.H. & LEE, S.Y, 2004. Enhanced production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli* with amplified activities of malic enzyme and fumarase. Biotechnol Bioprocess Eng;9:252–5.

HONG, S. H. & LEE, S. Y, 2002. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. Appl. Microbiol Biotechnol, n. 58, p. 286-290.

HONG, S.H. & LEE, S.Y, 2001. Metabolic flux analysis for succinic acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity. *Biotechnol. Bioeng.* 74, pp. 89–95.

HUH, Y.S., JUN, Y-S., KONG, Y.K., SONG, H, LEE, S.Y., HONG, W.H, 2006. Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. Process Biochem 41(6):1461–1465.

IKRAM, U.-H. *et al.*, 2004. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses, *Bioresour. Technol.* 93, pp. 125–130.

ILMEN, M. *et al.*, 2007. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*, Appl. Environ. Microbiol. 73, pp. 117–123

INCI, I. & USLU, H, 2005. Investigation of Diluent Effect on Extraction of Citric Acid by Triocthyl Methyl Ammonium Chloride + Organic Solutions. Journal of Chemical Engineering Data, v.50, p. 1103-1107.

ISAR, J., AGARWAL, L., SARAN, S., KAUSHIK R., SAXENA, R.K, 2007. A statistical approach to study the interactive effects of process parameters on succinic acid production from *Bacteriodes fragilis*. Anaerobe;13:50–6.

ISAR, J.; AGARWAL, L.; SARAN, S.; SAXENA R.K, 2006. A statistical method for enhancing the production of succinic acid from *Escherichia coli* under anaerobic conditions. *Bioresour. Technol*. v.97, p.1443-1448,

ISAR, J.; AGARWAL, L.; SARAN, S.; SAXENA, R.K, 2006. Succinic acid production from *Bacteroides fragilis*: Process optimization and scale up in a bioreactor. *Anaerobe*. v.12, p. 231-237.

JANTAMA, K., HAUPT M.J., SVORONOS S.A., ZHANG X.L., MOORE J.C., SHANMUGAM K.T, 2008. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop non-

recombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. Biotechnol Bioeng;99:1140–53.

JENSEN, J. M., ROBBINS, K. L., RYAN, K. J., HOMCO-RYAN, C., MCKEITH AND, F. K., BREWER, M. S, 2003. Effects of lactic and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. Meat Science. v. 63, n. 4, p. 501-508.

JERUSALIMSKY, N. D, 1967. In Microbial Physiology and Continuous Culture p. 23 [E.0.Powell, editor]. London: HM Stationery Office.

JIANG, Y.S., JUNG Y.R., LEE, S.Y., MM, J.M., LEE J.W, OH DB, 2010. Construction and characterization of shuttle vectors for succinic acid producing rumen bacteria. Appl Environ Microbiol;73:5411–20.

JOERI J. BEAUPREZ., MARJAN DE MEY., WIM K, 2010. Soetaert. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered Producers. Process Biochemistry 45: 1103–1114

JOHN, R.P., ANISHA, G.S., MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K., PANDEY, A, 2009. Directlactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. Biotechnol. Adv. 27, 145–152.

KA-YIU *et al*., 2005. Mutant E. coli strain with increased succinic acid production. *US patent 7,223,567.*

KERMANSHSHI P. A, 2005. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in a immobilized cell airlift bioreactor. Water Research, v. 39, p. 3704-3714.

KHAN, N.S., Mishra, I.M., Singh, R.P, 2005. Modeling the growth of *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in l-glutamic acid fermentation, Biochem. Eng. J. 25, pp. 173–178.

KIDWELL H, 2008. Bio-succinic acid to go commercial.

KIM, P., LAIVENIEKS M., VIEILLE C., ZEIKUS J.G, 2004. Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol;70:1238-41.

KIM, P., LAIVENIEKS M., MCKINLAY, J., VIEILLE, C., ZEIKUS J.G, 2004. Construction of a shuttle vector for the overexpression of recombinant proteins in *Actinobacillus succinogenes.* 51:108–15.

KIM, D.Y., YIM, S.C., LEE, P.C., LEE, W.G., LEE, S.Y., CHANG, H.N, 2004. Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55 E. Enzyme Microb. Technol. 35, 648–665.

KINT, D., ALLA, A.,DELORET,E., CAMPOS, J.L., MUNÕZ-GUERRA, S, 2003. Synthesis, Characterization, and Properties of poly(ethylene terephthalate)/poly(1,4-butylene succinate) Block Copolymers. Polymer, v. 44, pp. 1321-1330.

KINT, D., MUNÕZ-GUERRA, S, 1999. “A review on the potential biodegradability of poly (ethylene terephthalate)”, Polym. Int. ,v. 48, pp. 346-352.

KOUTINAS, A.A., ARIFEEN, N.,WANG, R.,WEBB, C, 2007b. Cereal-based biorefinery development: Integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 97 (1), 61–72.

KOZLOWSKI, C. A., WALKOWIAK, W., Pellowski, W., Koziol, J, 2002. Competitive transport of toxic metal ions by polymer inclusion membranes. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 253, 389-394.

KURZROCK, T. & WEUSTER-BOTZ D, 2010. Recovery of succinic acid from fermentation broth. Biotechnol Lett;32:331-9.

LARSSON, S., REIMANN A, NILVEBRANT N.O., JONSSON L.J, 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. Appl Biochem Biotechnol 77:91–103.

LASER, M., SCHUNAB, D., ALLEN, S.G., LICHWA, J., ANTAL Jr., M.J., LYND, L.R, 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. Bioresource Technology, n. 81, p. 33-44.

LAVARACK, B.P., GRIFFIN, G.J., RODMAN, D, 2002. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. Biomass Bioenergy 23(5):367–380

LEAL, M. L, 1998. Reciclo Celular na Produção Contínua de Etanol a Partir de D-Xilose com uma Linhagem Floculante de *Pichia stipitis.* Dissertação de Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

LEE S.J. LEE, H. SONG AND S.Y. LEE, 2006. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, pp. 1939–1948

LEE, P.C., LEE, S.Y., LEE, S.H., HONG & H.N. CHANG, 2003. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor, *BioProc. Biosyst. Eng,* pp. 63 67.

LEE, P.C., LEE, S.Y., HONG, S.H., CHANG, H.N, 2008. Cell recycled culture of succinic acid producing *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using an internal membrane filtration system. J Microbiol Biotechnol;18:1252–6.

LEE, P.C., LEE, S.Y., HONG, S.H., CHANG, H.N, 2002. Isolation and characterization of new succinic acid producing bacterium *Manheimia succiniciproducens* MBEL 55E, from bovine rumen. Appl Microbiol Biotechnol 21(4):663–668

LEE, P.C., LEE, S.Y., HONG, S.H., CHANG, H.N., LEE, W.G., KWON, S, 2000. Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. Appl Environ Microbiol;54:23-7.

LEE, S.Y., HONG, S.H., MOON, S.Y, 2002. In silico metabolic pathway analysis and design: succinic acid production by metabolically engineered *Escherichia coli* as an example. Genome Inf;13:214–23.

LEE, P.C., LEE, S.Y., HONG, S.H., CHANG, H.N., PARK, S.C, 2003b. Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Biotechnol. Lett. 25, 111–114.

LEE, P.C., LEE, W.G., KWON, S., LEE, S.Y., CHANG, H.N,1999b. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H_2/CO_2 supply and glucose concentration. *Enzime Microb. Technol.* v.24, p.549-554.

LEE, P.C., LEE, W.G., LEE, S.Y., CHANG, H.N, 1999a. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. Proc. Biochem. v. 35, p. 49-55.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M,1995. Princípios de Bioquímica. 2ª ed. Trad. A.A. Simões e W.R.N. Lodi. São Paulo: Sarvier. p. 46-47, 307, 323, 555-556.

LEMOS, J.L.S, 2001. Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. Dissertação de Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

LEVENSPIEL, O, 1980. The monod equation: a revisit and a generalization to product inhibit situations, Biotechnol. Bioeng. 22, pp. 671–687.

LI, D.M., CHEN, H.Z, 2007. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. Int. J. Hydrogen Energy 32, 1742-1748.

LI, F., YAN. X., DONG, J, 2010. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes.* Bioresource Technology. Volume 101, Issue 20, October, Pages 7889-7894

LIN, H., BENNETT, G.N., SAN, K, 2005. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. Biotechnol Bioeng;89:148–56.

LIN, C.S.K., D.U C, BLAGA, A.C., CAMARU,T M., WEBB C, STEVENS, C.V, 2009. Novel resinbased vacuum distillation–crystallisation method for recovery of succinic acid crystals from fermentation broths.

LIN, H., BENNET G.N., SAN K.Y, 2005. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. Biotechnol Bioeng 90(6):775 779.

LIN, H., BENNET G.N., SAN K.Y, 2005. Chemostat culture characterization of *Escherichia coli* mutant strains metabolically engineered for aerobic succinate production: a study of the modified metabolic network based on metabolite profile, enzyme activity, and gene expression profile. Metab Eng;7: 337–52.

LINTOMEN, L., PINTO, R. T. P., BATISTA, E., MEIRELLES, A. J. A., MACIEL, M. R. W, 2001. Liquid-Liquid Equilibrium of the Water + Citric Acid + Short Chain Alcohols + Tricaprylin System at 298.15 K. Journal of Chemical and Engineering Data, v.46, p.546 - 550.

LIU, Y.P., ZHENG, P., SUN, Z.H., YE, N., DONG, WEI, P, 2008 Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. J Chem Technol Biotechnol;83: 722–9.

LIU, Y.P., ZHENG, P., SUN, Z.H., YE, N., DONG, J.J., ZHU, L.L, 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresour. Technol. 99, 1736–1742.

LOTFY, W.A. *et al.*, 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. Bioresour. Technol. 98pp. 3464–3469.

LOUBIERE, P., NOVAK, L., COCAIGN-BOUSQUET, M., LINDLEY, P, 1997. Metabolism and energetics of *Lactococcus lactis* during growth in complex or synthetic media. Appl Environ Microbiol, 63:2665-70

LOUP, R., JEANMARIE, T., ROBIN, J. BOUTEVIN, B, 2003. Synthesis of (polyethylene terephthalate/poly å-caprolactone)copolyesters, Polymer, v. 44, pp. 3437-3449.

LUEDEKING, R. & PIRET, E.L, 1959. Kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH, J. Biol. Microbiol. Technol. Eng. 1, pp. 393–424.

LUNELLI, B. H., MACIEL FILHO, R., RIVERA, E. C., VASCO DE TOLEDO, E. C., STREMEL, D. P, 2006. Estudo da cinética de um modelo estruturado para a síntese de produtos químicos a partir da cana-de açúcar. In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Santos, SP. CD-ROM.

LUNELLI, B. H.& MACIEL FILHO, R, 2007. Modelagem e controle da síntese do ácido acrílico via processo fermentativo. Dissertação de mestrado. Universidade estadual de campinas.

LYND, L.R., WYMAN C.E., GERNGROSS T.U, 1999. Biocommodity engineering. Biotechnol Prog 15(5):777–793.

LYND, L. R. A, 2002. Comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. Bioresource Technology, v.81, p.33-44.

M.M, 2009. Chemical makers eye succinic acid. Chem Eng News;87:22–3.

MACIEL, FILHO., R, 2005. Apostila de controle de processos. faculdade de engenharia química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MADIHAH, M.S, ARIFF A.B., SAHAID K.M., SURAINI A.A and KARIM M.I.A, 2001. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. World J. Microbiol. Biotechnol., 17, 567.

MAGNUSON J.K & LASURE L.L, 2004. Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz JS, Lange L, editors. Advances in fungal biotechnology for industry, agri- culture, and medicine. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p. 307–40.

MAIORELLA, B., BLANCH, H. W., WILKE, C. R, 1983. Byproduct inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*., Biotechnol. Bioeng. 25, 103 121.

MALBURG, L. M.; LEE, J. M. T. & FORSBERG, C. W, 1992. Degradation cellulose by rúmen microorganism. in: microbial degradation of natural products. Ed. G. Winkelmann, New York.

MAO X.B, EKSRIWONG T, CHAUVATCHARIN Z and ZHONG J.J, 2005. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochem., 40*, 1667.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005. Disponível em:www.biodieselbr.com/destaques/2005/combustivel-renovavel. Acessado em: 06/2009.

MARKOWITZ, V.M., IVANOVA, N.N., SZETO, E., PALANIAPPAN, K., CHU K, DALEVI, D, 2008. IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. Nucleic Acid Res;36:D534–8.

MARTINS, S. P., TITATO, G. M., MAZO, L. H, 2004. Acompanhamento da Produção de Ácidos em Amostras de Leite Fermentado por Fungos utilizando RP-HPLC. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

MATTEY, M, 1992. The production of organic acids. Critical reviews in biothecnology, v.12, n.1/2, p.87-132.

MCCONNELL, S, 2009. Biobased succinic acid pilot effort underway. Chem Eng;116:13.

MCKINLAY, J.B., SHACHAR-HILL Y., ZEIKUS J.G., VIEILLE C, 2007. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC–MS analyses of C-13-labeled metabolic product isotopomers. Metab Eng;9: 177–92.

MCKINLAY, J.B., VIEILLE, C, 2008. C-13 metabolic flux analysis of *Actinobacillu succinogenes* fermentative metabolism at different $NaHCO_3$ and H_2 concentrations. Metab Eng ;10:55–68.

MCKINLAY, J.B., ZEIKUS J.G & VIEILLE C, 2007. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl. Environ. Microbiol., 71:11*, 6651.

MCKINLAY,.J.B., ZEIKUS, J.G., VIEILLE, C, 2005. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. Appl Environ Microbiol;71:6651–6.

Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants. *US patent 5,573,931*.

MEYNIAL-SALLES, I., DOROTYN, S., SOUCAILLE, .P, 2008. A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer and productivity. Biotechnol Bioeng;99(1):129–135

MILLARD, C. S et al. 1996. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxilase in *Escherichi coli*. Appl. Envir. Microbiology, v. 62, n. 5, p. 1808-1810.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) - Secretaria de Produção e Comercialização (SPC) – Departamento de Cana-de-Açúcar e Agroenergia (DCAA). Disponível em: http://www.agricultura.gov.br. Acessado em 11 de dez, 2008.

MIYANO, K.-.I, Y.E., K., SHIMIZU, K, 2000. Improvement of vitamin B_{12} fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture. *Biochemical Engineering Journal,* v. 6, p. 207-214.

MONTESINOS, J. L., LAFUENTE, J., GORDILLO, M. A., VALERO, F., SOLÁ, C, 1995. Structured modeling and state estimation in a fermentation process: lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnol. Bioeng.* v. 48, p. 573-584.

MOON, S.K, WEE, Y.J, YUN, J.S, RYU, H.W, 2003. Production of fumaric acid using rice bran and subsequent conversion to succinic acid through a two-step process. In: 25th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals. Breckenridge, CO: Humana Press Inc; p. 843–55.

MOON, S.Y, HONG, S.H, KIM T.Y., LEE, S.Y, 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid. Biochem Eng J;40:312–20.

MOREIRA, J.R & GOLDEMBERG, J, 1999. The alcohol program. Energy Policy, v. 27, n. 4, p. 229-245.

MULDER, M, 1991. Basics principles of membrane technology. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p. 363.

MUNÕZ-GUERRA, S, KINT, D., ALLA, A.,DELORET,E., CAMPOS, J.L. Synthesis, Characterization, and Properties of poly(ethylene terephthalate)/poly(1,4-butylene succinate). Block Copolymers, Polymer, v. 44, pp. 1321-1330, 2003

MUNRO, T. A. & SMITH, B. D,1997. Facilitated transport of amino acids by fixed-site jumping. *Chemical Communications.* 2167-2168.

MUSSATO, I.S. & ROBERTO, I.C, 2002. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. v. 28, p. 24-39.

NAKANO, K., KATAOKA, H., MATSUMURA, M, 1995. High density culture of *Propionibacterium freudenreichii* coupled with propionic acid removal system with activated charcoal. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 8, n. 1, p. 37-41.

NANBA, A., NUKADA, R., NAGAI, S, 1983. Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*. *Fermentation Technology*, v. 61, n. 6, p. 551-556.

NARENDRANATH, N.V., NARENDRANATH, K.C., THOMAS AND W.M, 2001. Ingledew, Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59, pp. 187–194

NEUREITER M, DANNER H, MADZINGADIDZO L, MIJAFUJI H, THOMASSER C, BVOCHORA J, 2004. Lignocellulose.feedstocks for the production of lactic acid. Chem Biochem Eng;18(1):55–63.

NEUREITER, H. DANNER, C. THOMASSER, B. SAIDI & R. BRAUN, 2002. Dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.98/100, pp. 49–58.

NGHIEM *et al.*, 1999. Method for the production of dicarboxylic acids. *US patent 5,869,301*.

Nghiem, N.P., Davison, B.H., Suttle, B.E., Richardson, G.R, 1997. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Appl. Biochem. Biotechnol., 565–576.

NIELSEN, J. & VILLADSEN, J, 1992. Modelling of microbial kinetics, review. *Chem. Eng. Sci.* v. 47, p. 4225-4270.

NIGAM, J.N. 2001. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 26, p. 145-150.

NOLAN-ITU PTY ltd. 2002. *Plastics: developments and environmental impacts*. Prepared for the australian government/department of the environment and water resources, in association with ExcelPlas Australia. Disponível em <www.environment.gov.au/settlements/publications/waste/degradables/ biodegradable/chapter3.html>. Acesso em: 1.8.2007.

NRC, 2000. Biobased products: priorities for commercialization. National Research Council, Washington.

O€HGRENAL, K., BURA, R., LESNICKI, G., SADDLER, J., ZACCHI, G, 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. Process Biochem. 42, 834–839.

OKINO, S., INUI, M., YUKAWA, H, 2005. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* underoxygen deprivation. Appl Microbiol Biotechnol 68:475–80.

OKINO S, NOBURYU R, SUDA M, JOJIMA T, INUI M, YUKAWA H, 2008. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. Appl Microbiol Biotechnol;81:459–64.

OKUDA, N., NINOMIYA, K., TAKAO, M., KATAKURA, Y., SHIOYA S, 2007. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolyzate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. J Biosci Bioeng 103(4):350–357.

OLEINIKOVA, M. & MUNOZ, M, 2000. Transport of rare earth metal ions through activated composite membranes containing DEHPA. *Solvent Extraction and Ion Exchange*. 18, 401-419.

OLSSON. L. & HAHN-HÄGERDAL, B, 1996 Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme Microbial Technology, v. 18, p. 312-331.

OTERO. J. M., OSSON. L., NIELSEN. J, 2009. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae microbial cell factories for succinic acid production. Abstracts / Journal of Biotechnology 131S;S196–S210

OZADALI, F., GLATZ, B.A., GLATZ, C.E, 1996. Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 44, p. 710-716.

PAINE, F.A, 2001. The packaging user's handbook. London: Chapman & Hall, 1996.

PALMQVIST, E. & HAHN-HÄGERDAL, B, 1999. Fermentation of lignocellulosic hydrolisates. i: inhibition and detoxification. Bioresource Technology, v. 74, p. 17 24.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R.,NIGAM, P. E.; SOCCOL, V.T, 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. Bioresource Technology, vol. 74, n. 1, p. 69-80.

PAPANIKOLAOU, S. *et al.*, 2006. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*, *Curr. Microbiol.* 52, pp. 134–142.

PAPANIKOLAOU. S., SARANTOU, M. KOMAITIS, G, 2004. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media, J. Appl. Microbiol*. 97;*67–875.

PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M, 1998[b]. Biotechnological Production of xilitol. Part III: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. Bioresource Technology, v. 66, p. 25-40.

PARK, D.H,, LAIVENIEKS M, GUETTLER, M.V., JAIN, M.K, ZEIKUS, J,G. 1999. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. Appl Environ Microbiol 65:2912–7.

PARKER, S.P, 1997. (ed.). *Dictionary of chemistry.* Ed. internacional*.* Nova Iorque: McGraw-Hill. p. 59, 363.

PATEL, M., CRANK M., DORNBURG, V., HERMANN, B., ROES, L., HÜSING B, 2006. Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources—the potential of white biotechnology. The Brew report. Utrecht: University of Utrecht; p. 474.

PAYNE, M. J., SMITH, B. R, 1983. Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 25, 1251-1265.

PEREIRA JR, NEI, 2005. Biotechnology of lignocellulosics: Trends & Challenges. In: VIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa. Maringá,

PEREIRA Jr., N, 1991. Intensification of the D-Xylose Fermentation Process. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K.

PEREIRA JR., N., COUTO, M.A.P.G. & SANTA ANNA, L.M.M, 2008. Series on biotechnology: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Rio de Janeiro, Amigadigital press, 47 p. ISBN 978-85-903967-3-4.

PINTO, J. C. & LAGE, P. L. C, 1997. Métodos numéricos em problemas de engenharia química.Escola Piloto de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PIRES, S., JAHNO, V. D., PEZZIN, A.P., TESSIER, M., FRADET, A., EINLOFT, S, 2005. Revista Matéria, v. 10, n. 2, pp. 222 – 230.

PLACKETT R.L & BURMAN J.P, 1946. The design of optimum multifactorial experiments. biometrika 33:305–325

POTERA, C, 2005. Making succinate more successful. Environ. Health Perspect. 113 (12), A833–A835.

POUTANEN, K., PLUS, J., NIEMELÄ, K., BUCHERT, J, 1990. Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolisate by ion exclusion. Process Biochemistry International, October, p. 176-180.

PRADELLA, JOSÉ G. C, 2006. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório Técnico, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), São Paulo.

Process for the production and purification of succinic acid. *US patent 5,143,834.*

QUESADA-CHANTO, A., AFSCHAR, A.S., WAGNER, F, 1994. Optimização of *Propionibacterium acidipropionici* in continuous culture utilizing sucrose. Aplied Microbiology and Biotecnology, v. 42, p. 16-21.

RAWLINGS, J. B., MILLER, S. M., WITKOWKI, W. R, 1993. Model identification and control of solution crystallization processes: a review. Ind. Eng. Chem*. Res.* v.32, p. 1275-1296.

REHBERGER, J.L. & GLATZ, B.A, 1998. Response of Cultures of *Propionibacterium* to Acid and Low pH: Tolerance and Inhibition. Jounal of Food Protection, v. 61, n. 2, p. 211-216.

REN, W., DONG, J.J., ZENG, P., NI, Y., SUN, Z.H, 2008. Production of succinic acid using enzymatic Jerusalem artichoke by inulinase from *Aspergillus niger*. Industrial Microbiology (Chinese) 38 (3), 1–5.

RENE, 2009. Dicarboxylic acid production in eukaryotes*. USP. 20110081694*

RIGGS, J. A. & SMITH, B. D, 1997. Facilitated transport of small carbohydrates through plasticized cellulose triacetate membranes. Evidence for fixed-site jumping transport mechanism. Journal of the American Chemical *Society*. 119, 2765-2766.

RODRIGUES M. I, 2010. Planejamento de experimentos visando a otimização de processos. Editora: Casa do Pão. FEA/UNICAMP.

RODRIGUES, J.A.R, 2001. Recomendações da IUPAC para a nomenclatura de moléculas orgânicas. Química Nova na Escola, n. 13, p. 22-28.

RODRIGUEZ, M. F. A, 2006. Subsídios para elaboração de política de biotecnologia industrial no brasil. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos.

RODRÍGUEZ-CHONG, A., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M, 2004. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. Journal of Food Engineering, v. 61, p. 143-152.

ROELS, J. A., KOSSEN, N. W. F. 1978. On the modeling of microbial metabolism. Prog. Ind. Microbiol*.* v. 14, p. 95-203.

ROMANÝ, A., YA´NEZ, R., GARROTE, G., ALONSO, J.L, 2008. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges. Bioresour. Technol. 99, 4247–4254.

ROQUETTE, 2011.Disponível.em:http://www.inarmatechnologist.com/news/ng.asp?id=8275roquettesuccinic-acid-starting-materia.

RUDNER, M.S, JEREMIC, S., PETTERSON, K.A., KENT D.R., BROWN K.A., DRAKE M.D., GODDARD, W.A., ROBERTS, J.D, 2005. Intramolecular hydrogen bonding in disubstituted ethanes. A comparison of NH…O− and OH…O− hydrogen bonding through conformational analysis of 4-amino-4-oxobutanoate (succinamate) and monohydrogen 1,4-butanoate (monohydrogen succinate) anions. J Phys Chem A 109(40):9076–9082.

SAHA, B.C, 2003. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30, 279–291.

SAHA, B.C., BOTHAST, R.J,1999. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. Appl. Biochem. Biotechnol. 76, 65–77.

SAITOH, S. *et al.*, 2005. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity, Appl. Environ. Microbiol. 71, pp. 2789–2792

SAMUELOV, N.S, LAMED R, LOWE S, ZEIKUS J.G, 1991. Influence of CO_2 HCO_3-level and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens.* Appl Environ Microbiol;57:3013–9.

SAMUELOV, N.S., DATTA, R., JAIN, M.K., ZEIKUS, J.G, 1999. Whey fermentation by *Anerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2260–2263.

SANCHES, O. L., CARDONA, C. A, 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtencion a partir de diferentes materias primas. Interciencia. V.30, p.671-678.

SANCHEZ, A.M., BENNETT G.N., SAN, K.Y, 2005. Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. Biotechnol prog;21:358–65.

SANCHEZ, A.M., BENNETT, G.N., SAN K.Y, 2005. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in Escherichia coli to increase succinate yield and productivity. Metab Eng;7:229–39.

SANTOS, D. S.,CAMELO, A. C., RODRIGUES, K. C. P., CARLOS, L. C & PEREIRA JR., NEI, 2009. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by *Zymomonas mobilis* Using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Process. Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 121, n. 1-8, p. 93-105.

SAUER, M., PORRO, D., MATTANOVICH D., BRANDUARDI .P, 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends Biotechnol 6(2):100–108 .

SAUER, U., EIKMANNS, B.J, 2005. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. FEMS Microbiol Rev; 29:765–94.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.S., AQUARIBE, E., BORZANI, W, 2001[b]. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, 3v. São Paulo : Editora Edgard Blucher, 1º edição. 544 p.

SCHOW, A. J., PETERSON, R. T., LAMB, J. D, 1996. Polymer inclusion membranes containing macrocyclic carriers for use in cation separations. Journal of Membrane Science. 111, 291-295.

SCOTT, A, 2009. DSM eyes large-scale, biosuccinic acid production. Chem Wee;171:17–17.

SECCHI, A. R, 1995. Modelagem e simulação de processos. Apostila. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SEGEL, I. H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, 1975. New York: John Wiley. Cap I: Enzymes as biological catalysts, p 1-17.

SHI, Y.,FAN, M., ROBERT, N. L.; BROWN, C., SUNG, C, 2005.The recovery of acetic acid with sulfur dioxide. Biochemical Engineering Journal v. 22, n. 3, p. 207-210.

SHIMAO, M, 1996. Biodegradation of plastics. Current Opinion in Biotechnology, Japão, n.12, p. 242-247.

SHLESER, R. 1994. Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii, Prepared for State of Hawaii.:

SHREVE, R.N. & BRINK JR., J.A, 1980. Indústria de processos químicos. 4ª ed. Trad. H. Macedo. Rio de Janeiro: Guanabara Dois. p. 242, 400, 483-484, 544, 689.

SHULER, M.L, 1992. SHULER & F. KARGI, Bioprocess Engineering: Basic Concepts (2nd ed.), Prentice-Hall Inc., New Jersey,USA.

SNYDER, C.H, 1995. The extraordinary chemistry of ordinary things. 2ª ed. Nova Iorque: JOHN WILEY & SONS. p. 242-245, 574-575.

SOLOMONS, T.W.G, 1996. *Química Orgânica 2*. 6ª ed. Trad. H. Macedo. Rio de Janeiro, LTC. p. 91-96.

SONG & LEE, 2006. Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation. *US 5,143,833*.

SONG, H., HUH, Y.S., LEE, S.Y., HONG, W.H., HONG, Y.K, 2007. Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* strain. J Biotechnol;132:445–52.

SONG, H., KIM, T.Y., CHOI, B.K., CHOI, S.J., NIELSEN, L.K., CHANG, H.N, 2008. Development of chemically defined medium for *Mannheimia succiniciproducens* based on its genome sequence. Appl Microbiol Biotechnol;79:263–72.

SONG, H., JANG, S.H., PARK, J.M., LEE, S.Y, 2008. Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniproducens. Biochemical Engineering Journal 40*, 107-115.

SONG, H., LEE, J.W., CHOI, S., YOU, J.K., HONG, W.H., LEE, S.Y, 2007. Effects of dissolved CO_2 levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production. Biotechnol. Bioeng. 98, 1296–1304

SONG, H. & LEE, S.Y, 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol.* v. 39, p. 352-361.

SOTERO. 2007, A.P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental.

SOUZA, O. & SANTOS, I. E, 2002. Importância dos resíduos agropecuários na alimentação animal. Boletim pecuário.

STOLS, L. & DONNELLY, MI, 1997. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. Appl Environ Microbiol; 63:2695–701.

STOTTMEISTER, U., AURICH, A., WILDE, H., ANDERSCH, J., SCHMIDT, S., SICKER, D, 2005. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2 oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. v. 32, n. 11-12, p. 651 664.

SUN, Y. & CHENG, J, 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 39/40, p. 587-600.

THAYSEN, M, 2005. Hybrid modeling for enhanced bioreactor performance. PhD Thesis. Technical University of Denmark, Denmark.

TORTORA, GERARD J., FUNKE, BERDELL R., CASE, CHRISTINE L, 2004. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed.

UEDA, K., TAGAMI, Y., KAMIHARA, Y., SHIRATORI H, TAKANO H, BEPPU T, 2008. Isolation of bacteria whose growth is dependent on high levels of CO_2 and implications of their potential diversity. Appl Environ Microbiol;74: 4535 8.

União de Agroindústria Canavieira de São Paulo (ÚNICA), 2005. Dados históricos. Disponível em: http://www.portalunica.com.br.

URBANCE, S.E., POMETTO, A.L III, D.I., SPIRITO, A.A., DEMIRCI, A, 2003. Medium evaluation and plastic composite support ingredient selection for biofilm formation and succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. Food Biotechnol 17(1):53–65.

URBANCE, S.E., POMETTO, A.L., DISPIRITO, A.A., DENLI, Y, 2004. Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinom genes* using plastic composite support bioreactors. Appl Microbiol Biotechnol;65:664–70.

VALLI, M. *et al.*, 2006. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, pp. 5492–5499.

VALOR, 2007. Crystalsev poderá ser parceira no exterior: trading brasileira é opção preferencial da Dow para projetos de produção alcoolquímica. Valor Econômico.

VALOR, 2006. Fabricantes brasileiras entram na corrida pelo “plástico verde”. Valor Econômico, p. B2.

vanDER WERF, M. J., GUETTLER, M.V., JAIN, M.K., ZEIKUS, J.G, 1997. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus sp.* 130Z. *Arch Microbiol*. v.167, p. 332-342.

VASCO DE TOLEDO, E. C, 1999. Modelagem, simulação e controle de reatores catalíticos de leito fixo. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

VASQUEZ, M. P, 2007. Desenvolvimento de um processo de hidrolise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana de-açúcar. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

VASSEUR, C., VASSEUR, L., BAVEREL, M., HÉBRAUD & LABADIE, J, 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*, *J. Appl. Microbiol.* 86, pp. 469–476.

VEMURI G.N., EITEMAN, M.A., ALTMAN, E, 2002. Succinate production in dual phase Escherichia coli fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. J Ind Microbiol Biotechnol 28(6):325–332.

VEMURI, G. N. *et al.* 2002. Effects of Growth Mode and Pyruvate Carboxylase on Succinic Acid Production by Metabolically Enginnered Strains of *Escherichia coli*. Appl. Envir. Microbiology, v. 68, n. 4, p. 1715-1727.

WAN, C., LI, Y., SHAHBAZI, A., XIU, S, 2008. Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130z. Appl. Biochem. Biotechnol. 45, 111-119.

WANG, Q.Z., CHEN X, YANG, Y.D., ZHAO X.M, 2006. Genome-scale in silico aided metabolic analysis and flux comparisons of *Escherichia coli* to improve succinate production. Appl Microbiol Biotechnol;73:887–94.

WANG, Q.Z., WU C.Y, CHEN, T., CHEN X, ZHAO X.M, 2006. Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli* ptsG mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions. Biotechnol Lett;28:89–93.

WERPY T, PETERSEN G, ADEN A, BOZELL J, HOLLADAY J, WHITE J, 2004. Top value added chemicals from biomass. Results of screening for potential candidates from sugar and synthesis gas, vol. I. Oak Ridge, USA: US Department of Energy; p. 76.

WERPY & PETERSON, 2006. Top Value Added Chemicals from Biomass; Werpy, T., Petersen, G. Eds.; USDOE: Washington, DC, Vol. I.

WERPY, T., FRYE, J., HOLLADAY, J, 2006. Succinic acid - a model building block for chemical production from renewable resources.

WIDDEL, F. & F. BAK, 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3358 3378. *In* A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), The prokaryotes, 2nd ed., vol. 4. Springer-Verlag, New York, N.Y.

WILKE T.H. & VORLOP,K.D, 1995. What should and what can biotechnology contribute to chemical bulk production. In: International congress on beyond 2000-chemicals from biotechnology: ecological challenge and economic restraints. Hannover, Germany:Elsevier Science BV;. pp. 89–100.

WILKE, T.H. & VORLOP,K.D, 2004. Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52, 135-145.

WILLKE, T.H. & VORLOP,K.D, 2004. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *App. Microbiol Biotechnol*, v. 66, p. 131-142.

WINGREN, A., GALBE, M., ZACCHI, G, 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood – a comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks Biotechnol. Prog. 19, 1109–1117.

WITT, U., MULLER, R-J., DECKWER, W-D, 1996. Evaluation of the Biodegradability of Copolyesters Containing Aromatic Compounds by Investigations of Model Oligomers, J. Environ. Polym. Degrad, v. 4, pp. 9-20.

WÓDZKI, R., NOWACZIK, J., HUJAWSKI, M, 2000. Separation of propionic and acetic acid by pertration in a multimembrane hibrid system. Separation and Purification Technology, v. 2, p. 39-54.

WU, H., LI, Z.M., ZHOU, L., YE .Q, 2004. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* pflB ldhA double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. Appl Environ Microbiol;73:7837–43.

WU, H.Z. LI, Q. EL, 2009. Succinic acid production and CO_2 consumption in fedbatch culture of a *pflB ldhA* deficient *Escherichia coli* strain NZN111.

YANG, S. T., HUANG, Y., HONG, G, 1995. A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. Biotechnol. Bioeng. 45, 379-386.

YE, K., SHIJO, M., JIN, S., SHIMIZU, K, 1996. Efficient Production of Vitamin B_{12} from Propionic Acid bacteria under Periodic Variation of Dissolved Oxygen Concentration. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 82, n. 5, p. 484.

YOUSSEF, C.B., GOMA G. & A. OLMOS-DICHARA, 2005. Kinetic modeling of *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* growth and lactic acid production in batch cultures under various medium conditions, Biotechnol. Lett. 27, pp. 1785–1789.

ZEIKUS, J.G, JAIN, M.K., ELANKOVAN P, 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. Appl Microbiol Biotechnol 51(5):545–552.

ZHANG, Y.H, 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 367–375.

ZHENG, P., DONG, J.J., SUN ZH, NI Y., FANG L, 2009. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresour Technol 100(8):2425–2429.

ZHENG, P., LIN , Y., DONG, J.J, SUN Z.H, 2010. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*. Bioresource Technology 101. 7889–7894.

ZHENG, Y., YANFUL, E.K., BASSI, A.S, 2005. A review of plastic waste biodegradation. Critical Reviews in Biotechnology,25: 243-250.

ZHONG, G., GLATZ, B.A., GLATZ, C.E, 1998. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 22, p. 13-18.