AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS DE *Lactobacillus spp.* VISANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDO D (-) LÁTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO

LIZETH YULIANA ACEVEDO JARAMILLO

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para Obtenção do Grau de Mestre em Ciências (*MSc*)

ORIENTADOR:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*

CO-ORIENTADOR:

Prof. Elcio Ribeiro Borges., *DSc*

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

2014

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS DE *Lactobacillus spp.* VISANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDO D (-) LÁTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO

LIZETH YULIANA ACEVEDO JARAMILLO

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para Obtenção do Grau de Mestre em Ciências (*MSc*)

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
2014

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS DE Lactobacillus spp. VISANDO A PRODUÇÃO DE ÁCIDO D (-) LÁTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO

LIZETH YULIANA ACEVEDO JARAMILLO

Dissertação de mestrado, 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 Mestre em Ciências (*Msc*), sob orientação dos Professores Nei Pereira Junior e Elcio Ribeiro Borges.

Banca examinadora:

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

_____
Prof. Elcio Ribeiro Borges,*DSc* (EQ/UFRJ)
(Orientador)

_____
Eliana Flávia Camporese Sérvulo, *DSc* (EQ/UFRJ)

_____
Lídia Maria Melo Santa Anna, *DSc* (PETROBRAS)

_____
Danielle da Silveira dos Santos, *DSc* (LADEBIO)

EQ/UFRJ 2014

A mis padres Doris y Gabriel por todo su esfuerzo, dedicación y paciencia, porque son los que más se alegran con mis triunfos y siempre están allí en mis dificultades.

La persona que soy es gracias a su sacrificio y educación, espero demostrarles lo mucho que los amo y toda mi gratitud con cada una de las metas que logre.

Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo

No te rindas, por favor no cedas,
Aunque el frío queme,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se ponga y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma,
Aún hay vida en tus sueños
Porque cada día es un comienzo nuevo,
Porque esta es la hora y el mejor momento.

Mario Benedetti

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e abençoes na minha vida, por me proporcionar saúde e força para conseguir atingir esse sonho.

À meus pais, Doris e Gabriel pelo seus esforços para me brindar sempre o melhor, especielmente à minha querida mãe, Doris Amelia Jaramillo Castro, pela constância de seus ensinamentos repletos de amor que mesmo desde Colombia, conforta e emana a vibração que alimenta a minha fé e esperança, ajudando a superar de forma obstinada todos os momentos de dificuldade;

À toda minha família e amigos na Colombia , pela companhia e energia positiva, por acreditar e apoiar meus pequenos desejos e os grandes e difíceis sonhos;

Ao meu orientador, Professor Nei Pereira Jr, pela orientação acadêmica, a liberdade de atuação na dissertação e a oportunidade de iniciar minhas atividades de pesquisadora no LADEBIO.

Ao Elcio Ribeio Borges, pela coorientação atenciosa, por sua valiosa ajuda na parte escrita, pela amizade sincera que contruimos e apoio nos momentos que mais precisei. Igualmente á Danielle Silveira dos Santos, pela amizade e companhia sustentadora nos momentos alegres e difíceis do decorrer deste trabalho;

Ás alunas de iniciação cientifica, Esther e Ananda pela ajuda nas atividades do laboratorio que contribuiram para este trabalho;

Aos meus gratos amigos no Brasil, Judys, Diogo, Vivian, Ligita, Manuel, Alex, Juliana, que se tornaram minha famila no Rio, para me confortar nos momentos dificies e curtir os momentos de felicidade.

Aos companheiros de trabalho, pesquisadores, funcionarios e estagiarios de LADEBIO, e a todos aqueles que fizeram parte de gratas recordações da minha estadia no laboratorio;

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da UFRJ, pela oportunidade e agradável recepção e convivência diária;

À PETROBRAS pelo apoio financeiro.

RESUMO

JARAMILLO, Lizeth Yuliana Acevedo. **Avaliação do potencial biotecnológico de linhagens de *Lactobacillus spp*. visando a produção de ácido D(-) lático de segunda geração**. Orientadores: Nei Pereira Jr e Elcio Ribeiro Borges. Escola de Química -Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

O acido lático é considerado uma "*commoditie*" de ampla aplicação industrial, com 90% da produção mundial obtida por processo fermentativo. A forma isomérica D(-) lático e suas aplicações têm sido pouco exploradas, embora apresente um grande potencial na produção de biopolímeros, devido a que sua inserção na matriz polimérica afeita o grau de cristalinidade, gerando uma estrutura amorfa com maior grau de biodegradabilidade, características necessária para aplicações em carregadores de liberação controlada de drogas. Recentemente a atenção tem focado no desenvolvimento de processos que permitam o aproveitamento de materiais lignocelulósicos como matérias-primas na obtenção de ácido D(-) lático dentro do contexto de biorrefinaria. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial biotecnológico para a produção de ácido D(-) lático de linhagens de *Lactobacillus*, visando o uso do bagaço de cana-de-açúcar mediante a estratégia de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*SSF)* para produção de segunda geração. Inicialmente foi avaliado o desempenho de quatro linhagens de *Lactobacillus*, sendo selecionada a bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* como aquela com potencial para produção de ácido D(-) lático. Posteriormente, planejamentos experimentais foram adotados para a otimização do meio de fermentação. Numa primeira etapa foi desenvolvido um Planejamento *Plackett Burman* para seleção dos componentes com maior influência na produção de ácido D(-) lático, em seguida um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que levo a um modelo quadrático reduzido para ajuste dos dados experimentais e cuja otimização mediante ferramentas computacionais, permitiu a obtenção de um meio de fermentação simples, contendo a seguinte composição (g/L): extrato de carne 2,30; extrato de levedura 3,58; acetato de sódio 0,05 e fosfato dipotássico 0,05, com concentração de glicose avaliada até 33 g/L. O experimento em biorreator instrumentado com meio de fermentacão simples resultou em uma concentração final de ácido D(-) lático de 32,44 g/L, com fator de rendimento de produto por substrato consumido de 0,95 g/g, uma produtividade volumétrica de 0,85 g/L.h e eficiência de fermentação de 95%. Quando comparado com o meio de composição complexa MRS, pode-se concluir que o meio simples leva a bactéria a consumir integralmente a glicose, com resultados similares, exceção da produtividade volumétrica que teve seu valor reduzido, indicando a relação entre a taxa de produção com a concentração de nutrientes. Por último, foi realizado o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*SSF*) em frascos agitados, com obtenção de 12 g/L de ácido D(-) lático e uma produtividade volumétrica de 0,9 g/L.h. Os resultados apresentam potencial para produção de ácido D(-) lático de segunda geração por *Lactobacillus coryniformis torquens* a partir da fração celulósica oriunda do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.

ABSTRACT

JARAMILLO, Lizeth Yuliana Acevedo. **Evaluation of the biotechnological potential of strains of *Lactobacillus spp*. aiming the production of D (-) lactic acid of second generation.** Supervisor: Nei Pereira Jr and Elcio Ribeiro Borges. Chemical School of Federal University of Rio de Janeiro, Brazil- 2014.

The lactic acid is considered one "*commoditie*" of wide industrial application, with 90% of the world production obtained by fermentation process. The isomeric form D (-) lactic and its applications have been little explored, although present a great potential in the production of biopolymers, due to which its insertion in polymeric matrix accustomed the degree of crystallinity, generating an amorphous structure with higher degree of biodegradability, characteristics required for applications in controlled release drug carriers. Recently attention has focused on the development of processes that allow the use of lignocellulosic materials as raw materials in obtaining D (-) lactic acid within the context of Biorefinery. Thus, the present work aims to evaluate the biotechnology potential for the production of D(-) lactic acid strains of *Lactobacillus*, aiming at the use of bagasse sugar cane through the strategy of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) for second generation production. It was initially rated the performance of four strains of *Lactobacillus*, being selected the *Lactobacillus coryniformis torquens* as one with potential for producing D (-) lactic acid. Later, experimental planning were adopted for the optimization of the fermentation medium. The first step was developed *Plackett Burman* design by selection of components with greater influence on D (-) lactic acid production, then one Central Composite Rotational Design (DCCR) that take a quadratic model reduced to fit the experimental data and whose computational tools through optimization, allowed obtaining a simple medium fermentation, containing the following composition (g/L): 2.30 meat extract; yeast extract 3.58; sodium acetate 0.05 and 0.05 dipotassium phosphate, with glucose concentration evaluated up to 33 g/L, the experiment in instrumented bioreactor with simple medium fermentation resulted in a final concentration of D (-) lactic acid of 32.44 g/L, with product yield factor for substrate consumed of 0.95 g/g, a volumetric productivity of 0.85 g/l. h and fermentation efficiency of 95%. When compared with complex medium fermentation MRS, we can conclude that the simple medium leads to bacteria to consume glucose in its entirety, with similar results, except for the volumetric productivity that had its value reduced, indicating the relationship between the rate of production with the concentration of nutrients. Lastly, the process of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) was evaluate in bottles shaken, with obtaining 12 g/L of D (-) lactic acid and a volumetric productivity of 0.9 g/L.h, the results present potential for D (-) lactic acid for second generation producing by *Lactobacillus coryniformis torquens* from the cellulosic fraction from the pre-treatment of lignocellulosic materials.

SÚMARIO

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA 15
2. OBJETIVOS 18
2.1. Objetivo geral 18
2.2. Objetivos específicos 18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
3.1. Ácidos orgânicos 20
3.2. Ácido lático 21
3.2.1. Processos de produção de ácido lático 23
3.2.2 Processos de recuperação e purificação de ácidos orgânicos 25
3.2.3. Aplicações do ácido lático 27
3.2.4. Biopolímeros, bioplásticos e plásticos biodegradáveis 28
3.3. Aspectos mercadológicos na produção mundial de ácido lático 31
3.3.1. Preços e custos 31
3.3.2. Estimativas de oferta e mercado 31
3.4. Micro-organismos produtores de ácido lático 32
3.4.1. O gênero Lactobacillus 32
3.5 Fatores que afetam o processo fermentativo 35
3.6. Matérias-primas para a produção do ácido lático 39
3.7. Materiais lignocelulósicos 43
3.7.1. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos 45
3.7.2. Hidrólise enzimática da celulose 46
3.8. Bagaço de cana-de-açúcar 48
3.9. Aproveitamento de materiais lignocelulósicos no contexto de biorrefinaria 50
3.10. Sacarificação e Fermentação Simultânea 50
3.11. Planejamento Experimental 51
3.12. Considerações gerais 52
4. METODOLOGIA 54
4.1. Material microbiológico 55
4.1.1. Micro-organismo utilizado 55
4.1.2. Manutenção do micro-organismo 56
4.1.3. Observação microscópica 57
4.2. Meios empregados para ativação, propagação e fermentação 57
4.2.1. Ativação de células congeladas para obtenção do pré-inóculo 57
4.2.2. Inóculo 57
4.2.3. Meios de Fermentação 58

4.3. Ensaios de fermentação em frascos agitados 58
4.4. Fermentação em biorreator instrumentado com de meio sintético 59
4.5. Fermentação da fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar.....60
4.5.1. Pré-tratamento ácido 60
4.5.2. Pré-tratamento alcalino.....61
4.5.3. Pré-hidrólise enzimática e a concepção de SSF 61
4.6. Métodos Analíticos.....62
4.6.1. Determinação de biomassa 62
4.6.2. Determinações quantitativas.....63
4.6.3. Determinação do isômero de ácido lático 63
4.6.4. Medida do pH.....64
4.7. Planejamentos experimentais.....65
4.8. Avaliação de resultados.....65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....67
5.1. Seleção da linhagem produtora de ácido D(-) lático 67
5.2. Morfologia das linhagens de *Lactobacillus* 71
5.3. Padronização da metodologia para ativação celular e preparo de inóculo em meio sintético MRS.....72
5.3.1. Cultivo de ativação em meio sintético MRS.....72
5.3.2. Cultivo de crescimento para obtenção do inóculo.....73
5.4. Ensaios de fermentação com e sem agente de neutralização para o controle da acidez do meio.....74
5.5. Avaliação da capacidade de consumo de xilose pela linhagem selecionada de *Lactobacillus coryniformis torquens*.....77
5.6. Seleção de componentes do meio sintético com maior influência no processo fermentativo. 78
5.7. Planejamento Delineamento Composto Central Rotacional 82
5.7.1. Validação do modelo otimizado em frascos agitados 89
5.8. Ensaios experimentais em Biorreator 90
5.8.1. Ensaio em Biorreator com meio sintético MRS.....91
5.8.2. Ensaio em Biorreator com meio sintético otimizado 92
5.9. Produção de ácido lático pelo processo *SSF* em frascos a partir do bagaço de cana pré-tratado 94
5.10. Considerações finais.....98
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....99
6.1. Conclusões 99
6.2. Sugestões.....100
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 102

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura molecular dos Isômeros de ácido lático 22
Figura 3.2. Esquema geral da síntese química do acido lático.....23
Figura 3.3. Esquema geral da produção fermentativa de ácido lático, a partir de diferentes matérias primas 24
Figura 3.4.Principais tecnologias e produtos obtidos a partir do ácido lático na indústria química 27
Figura 3.5. Esquema das reações para obtenção de PLA 29
Figura 3.6. Etapas bioquímicas durante a fermentação das baterias ácido láticas: a) fermentação homofermentativa de glicose b) fermentação heterofermentativa de glicose e pentoses.....34
Figura 3.7. Polímeros constituintes do material lignocelulósico.....43
Figura 3.8. Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos seguida de hidrólise enzimática 44
Figura 3.9. Amorfogênese da celulose microcristalina e ação das enzimas que fazem parte do complexo celulásico 47
Figura 3.10. Diagrama de blocos do processo SSF. 51
Figura 4.1. Esquema geral das etapas para desenvolvimento dos ensaios para produção de ácido D(-) lático 55
Figura 4.2. Biorreator BIOFLO III (*New .Brunswick*) utilizado na produção de ácido lático.....59
Figura 4.3. Etapas do pré-tratamento ácido. 60
Figura 4.4. Etapas do tratamento alcalino 61
Figura 4.5. Aspecto da celulignina após a deslignificação.....62
Figura 4.6. Cromatograma para identificação dos isômeros do acido lático.....64
Figura 5.1. Cinéticas de crescimento e fermentação das linhagens de *Lactobacillus* para a produção de ácido lático, em glicose como única fonte de carbono. 68
Figura 5.2. Identificação do isômero óptico produzido por as linhagens avaliadas .70
Figura 5.3. Observação microscópica das linhagens 71
Figura 5.4. Cinética de crescimento do cultivo de ativação da bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* ATCC 25600 em meio MRS Standard 73
Figura 5.5. Cinética de crescimento do cultivo de propagação da bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* ATCC 25600 em meio MRS Standard,.....74
Figura 5.6. Fermentação sem controle de pH em meio MRS.....75
Figura 5.7. Fermentação com controle de pH em meio MRS.....75
Figura 5.8. Avaliação da capacidade de *Lactobacillus coryniformis torquens* em consumir xilose em meio MRS. 77
Figura 5.9. Produção de biomassa com meio MRS tendo como fonte de carbono: glicose, relação de glicose- xilose em torno de 50% e xilose.....78
Figura 5.10. Diagrama de Pareto para planejamento PB 79
Figura 5.11. Diagrama de Pareto para Planejamento DCCR 84
Figura 5.12. Produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens* em função da concentração de extrato de carne e extrato de levedura. 87
Figura 5.13. Produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens* em função da concentração de extrato de carne e acetato de sódio. 88
Figura 5.14. Produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens* em função da concentração de fosfato dipotássico e extrato de carne.....88

Figura 5.15. Fermentação em biorreator com meio sintético MRS complexo por *Lactobacillus coryniformis.* 91
Figura 5.16. Fermentação em biorreator com meio sintético otimizado por *Lactobacillus coryniformis torquens*. 92
Figura 5.17. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura 95
Figura 5.18. Perfil cinético do processo de hidrólise enzimática de celulose e fermentação simultâneas a partir de bagaço de cana pré-tratado por *Lactobacillus coryniformis torquens* 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Variáveis de respostas do processo fermentativo para a produção de ácido lático 69
Tabela 5.2. Concentração de ácido lático obtida pelas linhagens estudadas.....69
Tabela 5.3. Planejamento Plackett-Burman para avaliação dos componentes do meio sintético MRS 80
Tabela 5.4. Variáveis analisadas e respectivos níveis codificados e reais do planejamento DCCR para uma concentração de glicose inicial igual a 20 g/L.....83
Tabela 5.5. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização dos componentes do meio de fermentação.....83
Tabela 5.6. Análise de variância (ANOVA) para concentração de ácido D(-) lático no delineamento composto central rotacional (DCCR), para glicose como fonte de carbono 85
Tabela 5.7. Análise de variância (ANOVA) para o Modelo Quadrático Reduzido.....86
Tabela 5.8. Condições de otimização para meio de fermentação 89
Tabela 5.9. Variáveis de resposta obtidas a partir dos processos de fermentação, a partir de meio sintético MRS (complexo) e meio otimizado (composição simples) ..94
Tabela 5.10. Produção de ácido lático a partir do processo SSF 97

LISTA DE SIGLAS

ANOVA: Analise de variância

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosina trifosfato

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-FEQ: Cromatografia liquida de alta eficiência com fase estacionária quiral

DCCR: Delineamento composto central rotacional

ED: Eletrodiálise

ELL: Extração liquido-liquido

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Gernerally Recognized as Safe

LAB: Bactérias ácido láticas

MAPA: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRS: Manga Rogosa Sharpe

PB: Plackett & Burman

pH: Potencial hidrogenionico

PH_{enz}: Pré-hidrólise enzimática

PLA: Polilactato

SSF: Sacarificação e Fermentação Simultânea

2G: Segunda geração

g: gramas

h: horas

L: litro

v/v: relação volume/volume

m/m: relação massa/massa

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

t_d : tempo de duplicação (h)

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA

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. 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 (BORGES & PEREIRA JR, 2011).

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). Neste sentido, os materiais de composição lignocelulósica são os recursos renováveis mais abundantes no cenário nacional, cujo uso como matérias-primas para a obtenção de produtos valor agregado, (exemplo: o ácido D(-) lático), mediante a plataforma Bioquimica, vêm aumentando significativamente dentro do contexto de biorrefinaria (PEREIRA JR, PEIXOTO & SATA ANNA, 2008).

A separação seletiva das frações do material lignocelulósico de acordo com suas características químicas para disponibilizar os açúcares presentes, requer a aplicação de técnicas que permitam a sua extração seletiva, mediante o uso de diferentes metodologias de solubilização e hidrólise, dentre as quais o pré-

tratamento ácido e alcalino são normalmente empregados (BETANCUR & PEREIRA JR, 2010).

Neste contexto, o ácido D(-) lático, se apresenta como um produto de alto interesse, devido a que sua obtenção como molécula pura só pode ser realizada mediante processos fermentativos. A pureza do enantiômero do ácido lático tem importância nas propiedades dos biopolímeros de polilactato (PLA), as quais dependem da aplicação especifica. No caso do isômero D(-) lático, sua inserção na matriz polimérica afeita o grau de cristalinidade e como consequência suas propiedades mecânicas, oferecendo uma estrutura amorfa com maior grau de biodegradabilidade, características desejadas para carregadores de liberação controlada de drogas (NAMPOOTHIRI, NAIR & JOHN, 2010).

Tendo como objetivo o desenvolvimento de processos economicamente viáveis é necessário trabalhar com agentes biológicos que permitam taxas de conversão elevadas como o caso das bactérias ácido láticas do gênero *Lactobacillus* pela sua seletividade para produção de ácido lático, principalmente aquelas do grupo homofermentativo, direcionadas neste caso para produção do enantiômero D(-) lático. Adicionalmente é necessária a formulação de meios de cultivo com composição simples que permitam manter a atividade metabólica do micro-organismo, visando à redução de custos envolvidos no processo (WEE *et al.,* 2006).

A demanda do ácido lático tem estimado um aumento entre 5 a 8% anualmente, impulsionada pelo setor de biopolímeros, com uma produção estimada de 367.300 tonelada para o ano 2017 e um mercado neste setor em torno de um bilhão de dólares por ano, sendo necessário chegar a valores de produção de 0,8 US$/kg para alcançar e manter viabilidade econômica, justificando assim pesquisas para o desenvolvimento de processos de segunda geração. (ABDEL, TASHIRO & SONOMOTO, 2013).

Com o desenvolvimento da presente pesquisa, foram publicados os seguintes trabalhos:

Trabalho completo em congressos nacional:

Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo, Danielle Silveira Santos Martins, Lidia Maria Melo Santa Anna, Elcio Borges, Nei Pereira Jr. Avaliação das condições de crescimento, fermentação e Componentes do meio para produção de acido D(-) lático mediante fermentação por *Lactobacillus coryniformis sp. torquens.* Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ, Florianópolis, SC. 19 - 22 de Outubro de 2014.

Participação em eventos:

L.Y. Acevedo Jaramillo, D. Silveira Santos, R. Borges, N. Pereira jr. Avaliação de bactérias ácido láticas para produção de ácido D(-) lático. 4º Encontro da Escola Brasileira de Química Verde, Rio de Janeiro, RJ. 25 - 26 de setembro de 2014.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

A possibilidade de desenvolvimento de processos biotecnológicos baseados no aproveitamento de fontes renováveis está inserida no contexto da biorrefinaria. De acordo com este conceito, o aproveitamento de materiais de composição lignocelulósica, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil, tem focalizado a produção não convencional de produtos de valor agregado. Diante deste panorama, há o interesse de se realizar estudos a respeito do aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de ácido D(-) lático de segunda geração por meio da plataforma bioquímica, neste sentido, a obtenção deste isômero só pode ser realizada a traves da síntese microbiana e dependendo de seu conteúdo no polilactato (PLA) se vem modificadas propiedades relacionadas com rigidez e biodeterioração do biopolímero, justificando assim o interesse na pesquisa de processos economicamente viáveis para produção de ácido D(-) lático.

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico para a síntese de ácido D (-) lático por uma linhagem de *Lactobacillus* visando à produção de segunda geração a partir da fração celulósica oriunda do pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a capacidade de quatro linhagens de *Lactobacillus* para produção de acido D(-) lático;

- Avaliar as condições de crescimento e fermentação em meio sintético para o micro-organismo selecionado com potencial de produção;

- Avaliar a possibilidade de consumo de xilose em meio quimicamente definido;

- Avaliar o efeito do controle de pH durante o processo fermentativo, em términos de produtividade e eficiência do processo;

- Otimizar a composição do meio de fermentação em frascos agitados, empregando técnicas de planejamento experimental, avaliando os resultados à luz de parâmetros estatísticos;

- Validar as condições previamente otimizadas do meio sintético em escala de biorreator instrumentado;

- Realizar as etapas de pré-tratamento ácido, alcalino e pré-hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar, visando a obtenção de meio rico em glicose como fonte de carbono;

- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático de celulose, proveniente da celulignina, resíduo sólido após pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar, para produção de ácido D(-) lático mediante processo de sacarificação e fermentação simultâneas (*SSF)* em frascos agitados;

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os diferentes aspectos teóricos referentes à temática abordada: ácidos orgânicos de interesse industrial; o ácido lático e suas aplicações no mercado; microrganismos produtores e aspectos metabólicos; o bagaço de cana como matéria-prima para a produção do ácido lático; algumas características relevantes do processo de aproveitamento de materiais lignoceulósicos e considerações importantes sobre o uso do ácido D(-) lático como intermediário na produção de plásticos biodegradáveis e como blocos de construção para a produção de substâncias químicas de interesse comercial.

3.1. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos apresentam em sua estrutura átomos de carbono, sendo o maior grupo o dos ácidos carboxílicos, que são caracterizados pela presença do grupo funcional carboxila (COOH). A presença do grupamento 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 (FIORUCCI *et al.,* 2002).

Tradicionalmente, os ácidos orgânicos são utilizados como agentes adjuvantes na indústria de alimentos e farmacêutica; com uma ampla aplicação industrial, sendo usados como constituintes de uma série de substâncias intermediárias e produtos finais importantes na indústria química, podendo ser inseridos no conceito de “blocos de construção” (WEE *et al.,* 2006). Devido à característica de biodegradação de muitos destes ácidos, atualmente uma das aplicações que apresentam maior interesse industrial é a sua utilização como intermediário na produção de plásticos biodegradáveis, destacando-se o ácido lático (JOHN *et al.,* 2007).

O processo de produção biotecnológica vem sendo considerado uma alternativa viável do ponto de vista ambiental apresentando vantagens econômicas sobre a síntese química. Neste contexto, a produção de ácidos orgânicos utilizando a rota fermentativa é amplamente utilizada em escala industrial, sendo desenvolvidas pesquisas na área biotecnológica para buscar formas mais eficientes de operação.

3.2. Ácido lático

O ácido lático, ácido 2-hidróxipropanóico ou ácido α-hidroxipropiônico, é um composto orgânico de função mista: ácido carboxílico-álcool, que apresenta fórmula molecular $C_3H_6O_3$ e estrutural $CH_3CH(OH)COOH$, descoberto em 1780 por Wilhelm Scheele, que isolou o ácido lático como um concentrado impuro a partir do leite ácido.

Na época de sua descoberta, muitos cientistas suspeitaram que a substância descoberta por Scheele fosse, na verdade, uma mistura de compostos já conhecidos. Porém, outro químico sueco, J. Berzelius repetiu os experimentos de Scheele e concluiu que o ácido lático era um composto simples (TRINDADE, 2002). Berzelius encontrou ainda o ácido lático no leite fresco, carne bovina, no sangue e em outros fluidos de origem animal. Em 1817, o químico alemão J. Vogel provou a identidade e a composição química do ácido descoberto por Scheele. Em 1839, E. Fremy produziu o ácido lático pela fermentação de carboidratos como a sacarose, lactose, manitol, amido e dextrina. A produção industrial do ácido lático se estabeleceu em Littleton, Massachussets, em 1881 por C. E. Avery (TRINDADE, 2002).

O ácido lático é solúvel em água e solventes orgânicos miscíveis em água, mas é insolúvel em outros solventes apolares (LI & CUI, 2010). No quadro 3.1 são apresentadas algumas propriedades físicas e químicas do ácido lático. De acordo com a figura 3.1, o ácido lático possui um β-carbono assimétrico como centro quiral que produz dois isômeros ópticos: levógiro L(+) e destrógiro D(-), os quais

apresentam similaridade de propiedades físicas e químicas, tendo suas diferenças no efeito fisiológico e propiedades estruturais do polímero gerado (LI & CUI, 2010).

Quadro 3.1. Propriedades físicas e químicas do ácido lático

Propriedade	Valor
Massa molar	90,08
Ponto de fusão	16,8°C
Constante de dissociação (Ka)	3,86
Densidade	1,206 g/mL
Calor específico (Cp a 20°C)	190 J/mol°C
Calor de combustão (ΔHc)	1361 KJ/mol

Fonte: NARAYANAN *et al.,* 2004

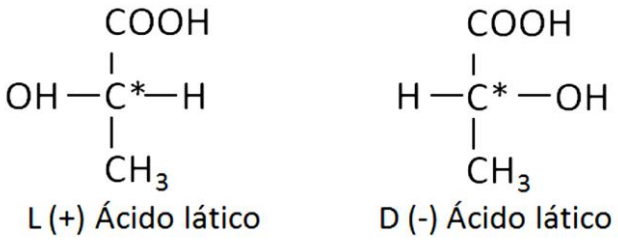

Figura 3.1. Estrutura molecular dos Isômeros de ácido lático (C*) - carbono assimétrico. Fonte: NARAYANAN *et al.,* 2004

Este importante ácido orgânico é amplamente distribuído na natureza, e comercialmente disponível, sob a forma de solução aquosa incolor, inodora, viscosa e não volátil. Está presente em muitos alimentos, seja naturalmente ou como produto de fermentação *in situ*, sendo um dos principais intermediários do metabolismo em diversos organismos (HOFVENDAHL & HAHN, 2000). Uma vez que o ácido lático possui tanto o grupo carboxílico como o hidroxil, pode ser convertido em diferentes compostos químicos interessantes como o ácido pirúvico, ácido acrílico, 1,2-propanadiol e éster de lactato (GAO, MA & XU, 2011).

3.2.1. Processos de produção de ácido lático

O ácido lático pode ser produzido tanto por síntese química como por fermentação, sendo aproximadamente 90% da produção feita mediante processos fermentativos. A síntese química de ácido lático (Figura 3.2) sempre resulta numa mistura racêmica (DL - ácido lático), sendo esta sua maior desvantagem. A produção biotecnológica de ácido lático (Figura 3.3) oferece a possibilidade da obtenção de ácido D(-) lático ou ácido L(+) lático opticamente puro ou uma mistura em diferentes proporções dos isômeros, dependendo do microrganismo e das condições de cultivo (ABDEL,TASHIRO & SONOMOTO, 2013).

3.2.1.1 Rota química

Na Figura 3.2 se apresenta um esquema geral do processo químico para produção de ácido lático. Na síntese química, o acetaldeído e o cianeto de hidrogênio reagem na presença de uma base, em condições de alta pressão para produção de lactonitrila. Posteriormente, a lactonitrila purificada é hidrolisada com ácidos fortes, principalmente o ácido sulfúrico, formando o ácido lático como produto principal e sais de amônia como subproduto. Em seguida, o ácido lático é purificado e recuperado (LI & CUI, 2010).

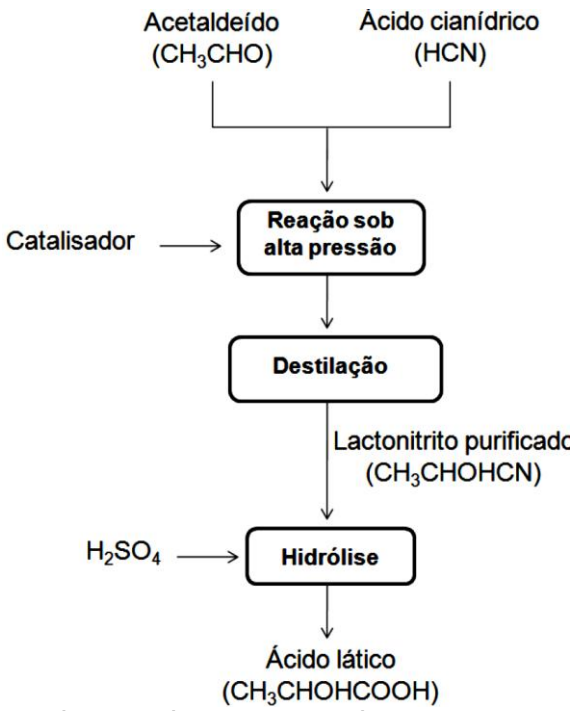

Figura 3.2. Esquema geral da síntese química do acido lático. Fonte: adaptado do LI & CUI, 2010

3.2.1.2. Rota fermentativa

A produção fermentativa do ácido lático pode ser realizada por bactérias, leveduras e fungos, sendo as bactérias ácido láticas (LAB) os micro-organismos mais empregados na fermentação de carboidratos. No processo fermentativo pode ser utilizada uma grande variedade de matérias-primas como fonte de substratos tais como: açúcares cristalizados, soro de leite, melaço de cana-de-açúcar, resíduos que contenham carboidratos complexos como o amido, celulose e hemicelulose (ABDEL, TASHIRO & SONOMOTO, 2011).

De acordo a rota 3 da Figura 3.3, quando o soro de queijo ou açúcares simples como a glicose são usados em processos fermentativos, os mesmos podem ser convertidos diretamente em ácido lático. Para biomassa amilácea, conforme mostra a rota 2 da Figura 3.3, é necessário ser hidrolisada à glicose pelo cozimento e liquefação, seguido de resfriamento e sacarificação enzimática e então, fermentada para produzir ácido lático. Quando a biomassa lignocelulósica é usada, um processo de pré-tratamento é necessário para romper as ligações presentes nas estruturas da celulose, hemicelulose e da lignina. A celulose e hemicelulose são hidrolisadas em açúcares que podem ser fermentados a ácido lático, conforme mostra a rota 1 da Figura 3.3. Cabe ressaltar que, após o processo de fermentação é necessário realizar etapas envolvendo a separação e a purificação do ácido lático (LI & CUI, 2010).

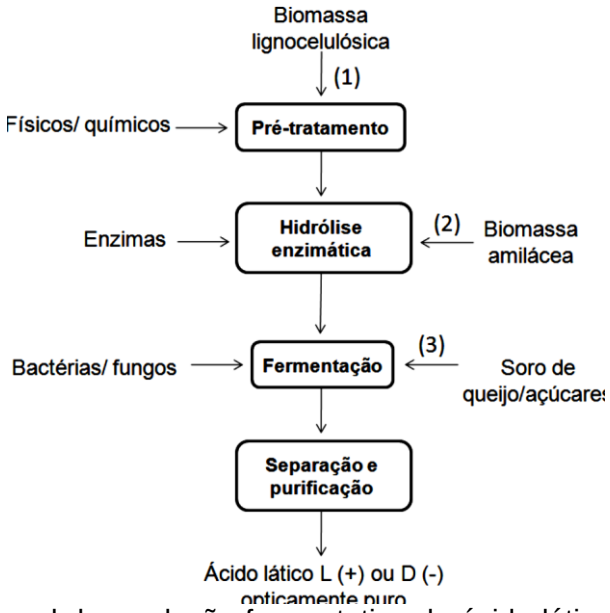

Figura 3.3. Esquema geral da produção fermentativa de ácido lático, a partir de diferentes matérias primas. Fonte: adaptado de LI & CUI, 2010

A produção microbiana possui vantagens quando comparada com a síntese química de tal ácido, uma vez que é possível utilizar substratos de baixo custo, além de uma diminuição da temperatura do processo, a qual reduz consideravelmente a energia consumida. Adiciona-se, ainda, o fato de ser um processo de síntese de ácido orgânico ambientalmente correto, uma vez que utiliza uma fonte de matéria-prima renovável sem emissão de poluentes durante a fermentação (LI & CUI, 2010).

3.2.2 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. 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 nas etapas *"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).

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). 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).

Os processos de separação por membranas, 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). 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) 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. Essas membranas são capazes de separar cátions ou ânions presentes em uma solução aquosa.

Para reduzir o efeito inibitório sobre o crescimento celular e incrementar os parâmetros do processo, vários sistemas de extração de ácidos, integrados ao processo fermentativo, têm sido propostos (DA COSTA *et al.,* 1999; 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 ou acidificação, troca iônica e cristalização, processos menos poluentes e de mais altos rendimentos na recuperação do produto.

O processo de separação e purificação do ácido D(-) lático, durante a etapa de "*downstream",* não faz parte do foco de estudo no presente trabalho, mas pode-se concluir que, apesar das vantagens que os processos biotecnológicos apresentam, um dos 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 um fator economicamente limitante do processo.

3.2.3. Aplicações do ácido lático

Considerado uma substância química versátil, o ácido lático tem aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, têxtil e química. Sua maior aplicação se encontra na indústria de alimentos como acidulante, flavorizante, agente antimicrobiano, estabilizador, umectante, emulsificador e plastificante, sendo classificado como GRAS (Gernerally Recognized As Safe) pela FDA (Food and Drug Administration) nos EUA, onde, aproximadamente 85% da demanda têm aplicação em alimentos e o restante, em torno de 15%, é aplicado em indústrias não alimentícias (VIJAYAKUMAR *et al.,* 2008).

Na indústria química o ácido lático pode sofrer uma variedade de conversões em substâncias químicas potencialmente úteis, como o óxido de propileno via hidrogenação, acetaldeído via descarboxilação, ácido acrílico mediante desidratação, dilactídio por auto-esterificação e ácido propanóico via redução, sendo considerado um *"commoditie"* de ampla aplicação industrial, com uma demanda estimada em torno de 367.300 toneladas para o ano 2017 com crescimento anual entre 5 a 8 % (ABDEL, TASHIRO & SONOMOTO, 2013).

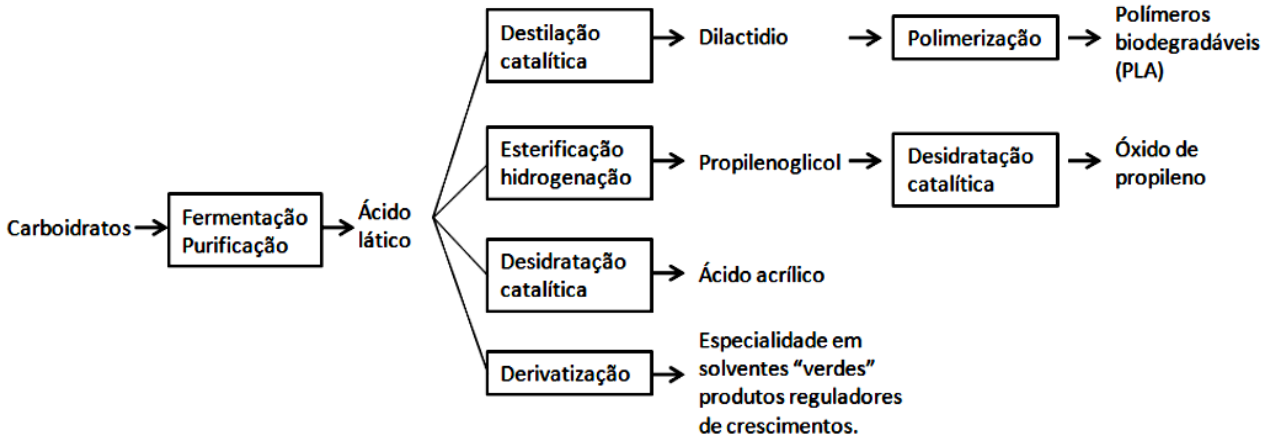

Figura 3.4.Principais tecnologias e produtos obtidos a partir do ácido lático na indústria química. Adaptado de VIJAYAKUMAR *et al.,* 2008

Na Figura 3.4 são apresentadas algumas importantes aplicações do ácido lático no setor da indústria química. A polimerização para a produção de polilactato (PLA) tem despertado a atenção para a produção de polímeros biodegradáveis, por ser um monômero facilmente polimerizado (JOHN, NAMPOOTHIRI &

PANDEY,2007). Pode ser utilizado em embalagens de alimentos, embora seu principal potencial encontra-se na área da Biomedicina com a produção de órgãos artificiais biocompatíveis, estruturas autodissolúveis e carreadores de drogas com liberação controla (NAMPOOTHIRI, NAIR & JOHN, 2010).

3.2.4. Biopolímeros, bioplásticos e plásticos biodegradáveis

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 (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 (COUTINHO *et al.,* 2004).

A maioria dos biopolímeros é biodegradável e biocompatível, não produzindo efeito tóxico, 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, portanto, plásticos biodegradáveis podem ser obtidos de polímeros naturais ou sintéticos e podem ser produzidos por fontes renováveis ou não-renováveis (NOLAN, 2002).

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, pelo desenvolvimento de rotas alternativas que dentro do contexto da biorrefinaria que permita redução de

custos de produção, de modo a tornar os biopolímeros como o PLA uma alternativa aos polímeros convencionais (COUTINHO *et al.,* 2004).

3.2.4.1. Polilactato PLA

Conforme já mencionado, uma das aplicações que apresentam maior interesse industrial para o ácido lático é sua utilização como intermediário na produção de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, principalmente polilactato (*poly lactic acid* ou PLA) para aplicações na área médica como implantes de liberação controlada de drogas, suturas cirúrgicas, próteses, entre outros, por ser hidrolisável no corpo humano. Dependendo de sua composição em relação ao conteúdo de cada um dos isômeros do ácido lático e pureza pode apresentar algumas deficiências em propiedades como flexibilidade baixa, biodegradação demorada e alta cristalinidade (NAMPOOTHIRI, NAIR & JOHN, 2010).

O PLA é um poliéster alifático, que pode ser obtido por dois métodos: a) policondensação direta de ácido lático; b) polimerização por abertura do anel láctico (que é o dímero cíclico do ácido lático, denominado lactide) Figura 3.5. A policondensação gera polímeros de baixa massa molar, devido à presença de água e impurezas e em alguns casos ausência de propriedades mecânicas, com racemização do polímero. No caso da polimerização pela abertura do anel, leva a formação de polímeros de maior massa molar, mas de maior custo pela necessidade de catalizadores e alto valor do lactide (NAMPOOTHIRI, NAIR & JOHN, 2010; RASAL *et al.,* 2010).

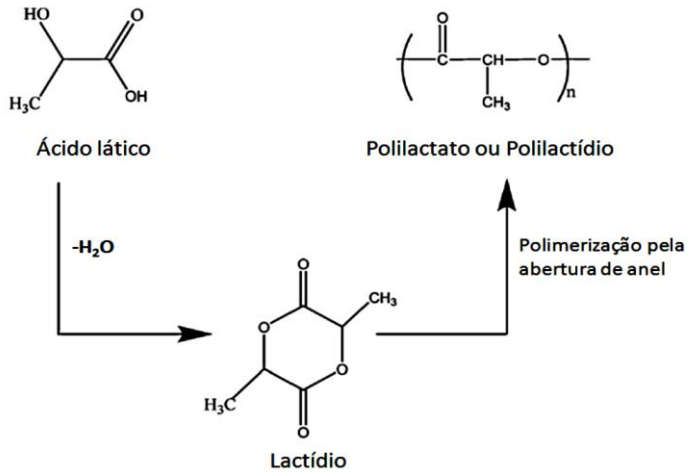

Figura 3.5. Esquema das reações para obtenção de PLA. Adaptado de RASAL *et al.,* 2010

A produção de PLA requer ácido lático de alta pureza óptica e química, pois as propriedades físicas e biológicas do polímero, como o ponto de fusão, resistência mecânica, cristalinidade e biodegradabilidade, são determinadas pela estrutura do polímero, relacionada com a pureza enantiomérica dos estereocopolímeros de ácido lático (proporções do L, D ou meso-lactide) e pela massa molar. A polimerização de ácido L (+) lático resulta em PLLA (L- polilático) e polimerização de ácido D(-) lático resulta em PDLA (D- polilático). Atualmente a maioria do PLA comercial é uma mistura de L(+) ácido lático (> 95%) e D(-) ácido lático (< 5%) (SHEN *et al.,* 2010).

Dependendo do tipo de aplicação se requerem características especificas, por exemplo, PLA de alta massa molecular e alta cristalinidade é necessário para produzir dispositivos de elevada resistência mecânica para cirurgias ortopédicas, contrariamente ao necessário quando é usado em carregadores de liberação controlada de drogas, que precisa de polímeros de baixa massa molecular é amorfo, por apresentar maior degradação e dispersão uniforme. A composição óptica afeita a cristalização cinética e o grau de cristalinidade, o nível de cristalinidade afeita o ponto de fusão do polímero e porem suas características, assim, a presença do isômero D(-) lático introduz a irregularidade necessária para limitar a cristalinidade, resultando em PLA com uma larga escala de valores de dureza e rigidez com maior velocidade de biodegradação quando se tem polímeros amorfos.

O PLA pode desempenhar um papel relevante no que se refere às questões de problemas ambientais pelas suas características de biodegradabilidade. A degradação do PLA se dá através da hidrólise de grupos de ésteres. A taxa de degradação depende de: massa molar, taxa de difusão da água no polímero, distribuição morfologia e cristalinidade a qual está relacionada com o conteúdo estereoisomérico, sendo considerado PLA amorfo quando o conteúdo de D(-) isômero é alto e PLA cristalino quando o conteúdo de D(-) isômero é muito baixo., sendo a taxa de biodegradação maior em estruturas amorfas (NAMPOOTHIRI, NAIR & JOHN, 2010; RASAL *et al.,* 2010; SHEN *et al.,* 2010), daqui a importância do desenvolvimento de pesquisas em relação a produção de acido D(-) lático a partir de processos fermentativos economicamente viáveis.

3.3. Aspectos mercadológicos na produção mundial de ácido lático

3.3.1. Preços e custos

O ácido lático apresenta um preço comercial que varia entre 1,38 US$/kg para 50% de pureza e 1,54 US$/kg para 88% de pureza (WEE *et al.,*2006). A produção sintética possui custo entre 1,30 e 1,40 US$/kg e para ser competitivo o custo precisa ser menor que 0,8 US$/kg, (WEE *et al.,* 2006, ZACCHI & AKERBERG, 2000). Tendo em conta o panorama econômico, diferentes aspectos como o desenvolvimento de micro-organismos potencialmente produtores, redução de custo associado à matéria-prima, otimização de processos fermentativos e de purificação precisam ser estudados e melhorados para manter sua competitividade em relação os processos químicos (WEE *et al.,* 2006).

3.3.2. Estimativas de oferta e mercado

Estima-se que a demanda de ácido lático no mundo teve um crescimento anual, entre 5 a 8%, com produção de 259.000 toneladas no ano de 2012 e uma projeção de 367.300 toneladas para o ano 2017. Mundialmente, pode ser estimado um mercado na substituição de solventes em torno de US$ 4,5 bilhões por ano, US$ 0,9 bilhões por ano nos polímeros biodegradáveis e de US$ 5,4 bilhões por ano na química de oxigênio (BOLAÑOS *et al.,* 2000), sendo que as vendas nos Estados Unidos são maiores que US$ 3,0 bilhões por ano (Wisconsin Iniciativa de Desenvolvimento Biorefining, 2006).

O crescimento da demanda no setor de polímeros mantém a expectativa dos produtores em aumentar seus ganhos com o potencial monômero ácido polilático, podendo ser mencionadas as algumas das principais empresas produtoras: NatureWorks LLC (USA), Cargill Incorporated (USA), Purac (Holanda), Galactic (Bélgica) e algumas companhias chinesas (ABDEL, TASHIRO & SONOMOTO, 2013).

3.4. Micro-organismos produtores de ácido lático

Existem mais de 100 diferentes micro-organismos produtores de ácido lático, entre bactérias, fungos filamentoos, leveduras, cianobácterias e algas, sendo as bactérias ácido láticas (LAB) as de maior destaque (LI & CUI, 2010; ABDEL, TASHIRO & SONOMOTO, 2013). As LAB são micro-organismos Gram-positivos, usualmente catalase negativos, citocromo ausente, sem esporos e capazes de crescer sob condições de microaerofilia e anaerobiose estrita. São exigentes quanto a fatores nutricionais e normalmente sem mobilidade, com exceção de algumas linhagens e podem sobreviver em pH baixo (VIJAYAKUMAR *et al.,* 2008; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000; KLEIN *et al.,* 1998).

Os gêneros LAB de maior importância são *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Weissella, Carnobacterium, Tetragenococcus* e *Bifidobacterium (*KLEIN *et al.,* 1998), sendo que os principais micro-organismos empregados industrialmente para a produção do ácido láctico são do gênero *Lactobacillus* (ABDEL, TASHIRO & SONOMOTO, 2013).

3.4.1. O gênero *Lactobacillus*

As bactérias do gênero *Lactobacillus* possuem a forma de bacilos curtos ou alongados, podendo ocorrer em cadeia ou isoladamente e, são tolerantes ao pH ácido, aerotolerantes ou aneróbicos estritos, com o ácido lático resultante do produto da degradação de açúcares em processos fermentativos. Possuem necessidades nutricionais complexas como aminoácidos, carboidratos e vitaminas, com destaque para o pantotenato de cálcio, niacina e tiamina (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000; COSTA, 2006).

Com base no metabolismo, conforme mostra a Figura 3.6, são definidos dois grandes grupos, denominados de homofermentativo e heterofermentativo (LI & CUI, 2010; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000; CASTILLO *et., al,* 2013), cujas características principais se apresentam no quadro 3.2, sendo as cepas homofermentativas as mais usadas devido ao caráter de seletividade na produção de acido lático. Dessa forma, os grupos podem ser descritos como:

- **Homofermentativos (Grupo A):** através da via *Embden- Meyerhof*, convertem 1 mol de hexose em 2 moles de ácido lático e 2 moles de ATP. Nesta via, o metabolismo é caracterizado pela quebra de frutose 1,6-bifosfato em duas trioses fosfato (3C), as quais são posteriormente convertidas a lactato. Dentre as espécies homofermentativas de hexoses podemos citar: *Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus coryniformis (*LI & CUI, 2010; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000). Recentemente se tem reportes de espécies homofermentativas de pentoses através da via Fosfato pentose, as quais convertem 1 mol de pentose em 1,67 mol de ácido lático, entre elas *Enterococcus mundtii QU 25 e Lactobacillus plantarum* (ABDEL, TASHIRO & SONOMOTO, 2013).

- **Heterofermentativos Facultativos (Grupo B):** realizam fermentação da forma semelhante ao grupo homofermentativo, contudo algumas espécies produzem outros ácidos em condições limitantes da glicose. Convertem pentose em ácido lático e acético via fosfocetolase indutível. Na presença de glicose, as enzimas da rota do fosfogluconato são inibidas. Algumas espécies heterofermentativas facultativas são: *Lactobacillus alimentarius, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus lactis, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus xylosus (*LI & CUI, 2010; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Heterofermentativos Obrigatórios (Grupo C):** as bactérias utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase para a formação de hexoses. Em condições de anaerobiose, as hexoses são convertidas em quantidades equimolares de ácido lático, etanol e/ou acido acético, gás carbônico e ATP. Tais bactérias realizam a oxidação de glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, que sofre descarboxilação (perda de uma molécula de gás carbônico) e posterior ruptura da pentose resultante (xilulose-5-fosfato) em duas moléculas de três (gliceraldeido-3-fosfato) e dois (acetil-fosfato) átomos de carbono. O gliceraldeido-3-fosfato dá origem ao lactato enquanto que o acetil-fosfato pode seguir dois caminhos distintos. Quando acetil-fosfato é convertido a acetato ao invés de etanol, um mol adicional de ATP pode ser produzido. Algumas especies de bactérias láticas heterofermentativa obrigatórias, são: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum e Lactobacillus reuteri (*LI & CUI, 2010; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

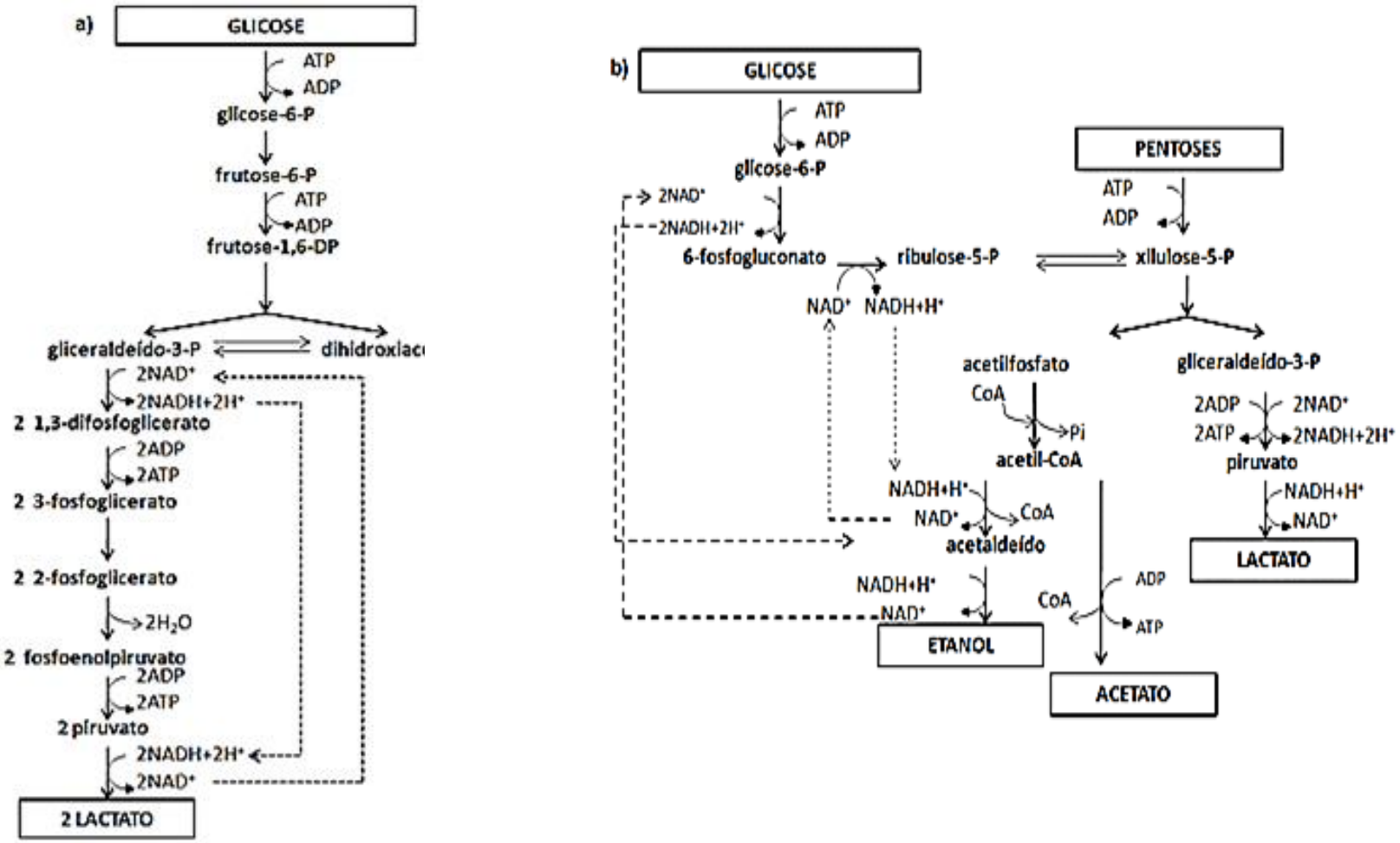

Figura 3.6. Etapas bioquímicas durante a fermentação das baterias ácido láticas: a) fermentação homofermentativa de glicose b) fermentação heterofermentativa de glicose e pentoses. Adaptado de CASTILLO, 2013.

Quadro 3.2. Caracteristicas principais das rotas metabolicas para LAB

Caracterização	LAB Homofermentativas	LAB heterofermentativas
Produtos	Ácido Lático	Ácido lático, etanol, ácido acético, dióxido de carbono
Rotas metabólicas	Hexoses: *Embdeb-Meyerhof* Pentoses: Fosfato pentose	Hexoses: Fosfogluconato/fosfocetolase Pentoses: Fosfocetolase
Rendimento Teórico	Hexose: 1,0 g/g (2,0 mol/mol) Pentose: 1,0 g/g (1,67 mol/mol)	Hexose: 0,5 g/g (1,0 mol/mol) Pentose:0,6 g/g (1,0 mol/mol)
Gênero	*Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus, Lactobacillus*	*Leuconostoc, Oenococcus, Lactobacillus*
Viabilidade comercial	Viabilidade por sua alta seletividade	Pouca viabilidade pela variedade de produtos

Fonte: Adaptado de RAHMAN, TASHIRO & SONOMOTO (2013)

3.5 Fatores que afetam o processo fermentativo

Os processos fermentativos representam 90% da produção mundial de ácido lático, em sua maioria, através da fermentação descontínua. Possui tolerância ao oxigênio, mas em condições anaeróbias ou microaerófilas o processo fermentativo é mais eficiente. Além do conteúdo de oxigênio no meio, a eficiência do processo medida como concentração de ácido lático produzido e produtividade são influenciados por diferentes parâmetros (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000), que estão descritos a seguir:

- **Micro-organismo**: cada linhagem tem condições de crescimento particulares, resultando em diferentes valores de produtividade, dependendo de sua capacidade metabólica, refletindo em variabilidade de produto e subprodutos, como o isômero do ácido lático (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Fonte de carbono:** diferentes tipos de substrato podem ser usados como fonte de carbono para a produção fermentativa de ácido lático. A fermentação de açúcares simples gera um produto mais puro, com menores custos na etapa de purificação, mas apresentando limitações pelo alto valor da matéria-prima para a geração de um produto com baixo valor comercial. Tendo como objetivo a viabilidade econômica dos processos, o uso de substratos alternativos residuais da agricultura vem sendo apontados como fonte de carbono

alternativos, sendo necessária a complementação do meio de fermentação para se atender às necessidades nutricionais do micro-organismo produtor. Cabe ressaltar que a concentração de substrato não possui um efeito muito forte sobre os valores finais de rendimento e produtividade (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Fonte de nitrogênio:** uma baixa concentração de nutrientes gera uma capacidade metabólica limitada. Neste sentido, a adição de nutrientes na forma de extrato de carne, extrato de levedura e peptona, em altas concentrações entre 10 e 25 g/L, promovem um efeito positivo na produção de ácido lático. Pesquisas mostram que o uso de extrato de levedura em altas concentrações incrementa a produção de ácido lático em comparação com a mistura de extrato de levedura e peptona em baixas concentrações (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Formação de subprodutos***:* durante a produção de ácido lático podem ser gerados alguns subprodutos, incluindo ácido acético, acido fórmico, dióxido de carbono, etanol, entre outros, os quais devem ter sua concentração reduzida o máximo possível. Os subprodutos dependem da rota metabólica da linhagem utilizada, podendo ser alterados pela concentração de oxigênio no meio, tipo de fonte de carbono, concentração de substrato e demais nutrientes. A fermentação de pentoses gera ácido acético e etanol em todos os casos (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **pH:** a produção de ácido lático está associada com a redução do pH, podendo ter um efeito inibidor no metabolismo do micro-organismo produtor. O pH pode ser controlado por titulação, extração, absorção ou eletrodiálise. O mais usado é a titulação a um pH constante, com adição de um agente neutralizante como: hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, entre outros, gerando concentrações de ácido lático maiores do que nos casos sem controle, pela redução do efeito inibidor (RAHMAN, TASHIRO & SONOMOTO, 2013) . O pH ótimo para a produção de ácido lático varia na faixa entre 5,0 e 7,0 (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Temperatura:** alguns micro-organismos podem apresentar os melhores resultados em relação aos valores de produtividade e rendimento, em diferentes valores de temperaturas. No entanto, outros mantêm a mesma temperatura para obter os maiores valores de produtividade e rendimento (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000). Pode-se concluir que a temperatura é um parâmetro importante, cujo efeito deve ser avaliado de forma particular para cada um dos micro-organismos produtores de ácido lático.

- **Densidade Celular:** a fermentação para a produção de ácido lático é associada ao crescimento celular, com produção de biomassa na faixa de 48 a 103 g/L em processos com recirculação celular e de 60 a 77 g/L em processo sem recirculação, sendo a biomassa bacteriana um subproduto não desejado, que pode ser usado como matéria-prima na produção de probióticos. A fermentação de maltose, lactose e manose geram maior densidade celular quando comparado com a fermentação de glicose, frutose e xilose resultam em menores densidades celulares (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Imobilização e recirculação de células:** as cepas de LAB podem ter suas células recirculadas ou imobilizadas sobre suportes sólidos a fim de aumentar a densidade celular. Até agora a imobilização de células na produção de ácido lático não apresenta sucesso ou benefício em termos de rendimento e produtividade. Na maioria dos estudos reportados na literatura, os melhores resultados foram obtidos usando células livres. De outro lado, a recirculação de células pode aumentar a concentração de ácido lático, com efeitos positivos sobre o rendimento e produtividade (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Isômero do ácido lático:** a enzima lactato desidrogenase é estereoespecífica, produzindo ácido D ou L lático e sua forma presente na bactéria determina qual isômero é produzido. Para a síntese de polilactato (PLA) deseja-se um produto opticamente puro ou uma mistura racêmica de composição constante. A produção do isômero pode ser afetada pela variação de parâmetros como: pH, agente neutralizante, concentração de nutrientes, tipo e concentração de substrato, tipo de cultivo, aeração e temperatura. Em algumas LAB como *Lactobacillus amylophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* não se apresenta o isômero D(-) quando não se tem controle do pH e quando se apresentam

mudanças nos nutrientes do meio de fermentação. *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* só produz o ácido D(-) lático a partir de glicose e lactose. Espécies como *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus plantarum* produzem uma mistura racêmica com composição variável, afetada pela mudança nas condições de aeração, temperatura, de pH e na concentração de substrato (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

- **Formas de operação da fermentação:** os processos fermentativos podem ser operados por diferentes formas: batelada simples, batelada alimentada, contínua e semicontinua. 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).

O ácido lático é produzido tradicionalmente por fermentação em batelada simples. Comparando os processos de batelada simples e contínuo para a produção de acido lático, o primeiro apresenta maiores concentrações de ácido lático e rendimento na maioria dos estudos, devido ao consumo total de substrato, enquanto a fermentação continua apresenta maiores valores de produtividade, resultando em altas taxas de produção. Já a batelada alimentada e o processo semicontinuo apresentam maiores rendimentos em comparação com a batelada simples (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

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, cujas produções podem empregar matérias-primas renováveis, particularmente, os resíduos agrícolas e agro-industriais, como por exemplo, decorrentes do processamento da cana de açúcar (ZEIKUS *et al.,* 1999).

3.6. Matérias-primas para a produção do ácido lático

Atualmente, substratos alternativos de baixo custo da indústria de alimentos e da agroindústria regional para a fermentação corroboram o interesse de diversas empresas a cerca da tecnologia de produção do ácido lático (SREENATH *et al, 2001*). Alguns dos resíduos reportados na literatura para a produção de ácido lático podem ser exemplificados: soro de leite, água de maceração de milho, xarope de milho, levedura de destilaria, melaços, entre outros. Neste contexto, os materiais lignocelulósicos constituem-se em matéria-prima para a produção de ácido lático como é apresentado no quadro 3.3, dentre outras fontes utilizadas em diversos segmentos industriais, devido ao seu caráter renovável, abundante e de seu baixo custo (RAHMAN, TASHIRO & SONOMOTO, 2011).

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, caldo 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.

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).

Quadro 3.3. Produção de acido lático a partir de materiais lignocelulósicos. Fonte: RAHMAN, TASHIRO & SONOMOTO, 2011

Linhagens	Substrato	Estratégia de fermentação	P (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Qp (g/L.h)	Referências
E. mundtii QU 25	Celobiose	Batelada simples	119	0,83	1,12	Abdel-Rahman *et al*. (2011a)
	Xilose	Batelada simples	86,7	0,84	0,90	Abdel-Rahman *et al*. (2010a, 2011b)
	Glicose / Celobiose	Batelada simples	35,1	0,91	2,99	Abdel-Rahman *et al.* (2010b, 2011a)
	Glicose/ Xilose	Batelada simples	-	0,83	3,6 d	Abdel-Rahman *et al.* (2010b)
	Glicose/Xilose/ celobiose	Batelada simples	–	– 0.79	2.6d	Abdel-Rahman *et al.* (2010b)
E. faecalis RKY1	Hidrolisado de madeira	Batelada simples	93.0	0.93	1.7	Wee *et al.* (2004)
E. casseliflavus e Lb. casei	Xilose/ Glicose	Batelada simples	95.0	-	-	Taniguchi *et al.*, 2004
Lb. bifermentans DSM 20003	Hidrolisado farelo de trigo	Batelada simples com células imobilizadas	62.8	0.83	1.17	Givry *et al.* (2008)
Lb. brevis	Sabugo de milho	Batelada simples	39.1	0.70	0.81	Guo *et al.* (2010)
Lb. brevis e Lb. pentosus	Hemicelulose de palha de trigo	Batelada simples	7.1	0.95	–	Garde *et al*. (2002)
Lb. casei NCIMB 3254	Bagaço de mandioca	Batelada simples/ SSF	83.8	0.96	1.40	John *et al.* (2006a)
Lb. casei subsp rhamnosus	Madeira macia	Batelada simples	21.1–23.75	0.74–0.83	0.15–0.23	Iyer *et al.* (2000)
Lb. coryniformis ATCC 25600	Celulose	SSF	54.0	0.89	0.5	Yanez *et al*. (2003)
Lb. coryniformis spp. torquens ATCC 25600	Cartão pré-tratado	Batelada simples/SSF	23.4	0.56	0.48	Yanez *et al*. (2005)
Lb. delbreuckii	Fibras de alfafa	SSF	35.4	0.35	0.75	Sreenath *et al.* (2001)
Lb. delbreuckii NRRL-B445	Celulose	SSF	65.0	0.18	–	Iyer and Lee (1999a,b)
Lb. delbrueckii IFO 3202	Farelo de arroz	SSF	28.0	0.28	0.77	Tanaka *et al*. (2006)
Lb. delbrueckii mutant Uc-3	Celobiose	Batelada simples	90.0	0.90	2.25	Adsul *et al.* (2007b)
	Melaço	Batelada simples	166	0.95	4.15	Dumbrepatil *et al.* (2008)
Lb. delbrueckii NCIM 2025	Bagaço de mandioca	Batelada simples/SSF	81.9	0,94	1.36	John *et al.* (2006a)
Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii Mutant Uc-3	Bagaço cana de açúcar	Batelada simples/SSF	67.0	0.83	0.93	Adsul *et al*. (2007a)

Lb. delbrueckii UFV H2B20	Grãos de cerveja	Batelada simples	35.5	0.99	0.59	Mussatto *et al.* (2008)
Lb. delbrueckii ZU-S2	Resíduo da espiga de milho	Batelada simples/ continuo	48.7/ 44.2 0	0.95/ 0.92	1.01/ 1.57	Shen and Xia (2006)
Lb. casei e Lb. lactis	Data de suco	Batelada simples	60.3	-	3.2d	Nancib *et al.*, 2009
Lb. lactis RM 2-24	Celobiose	Batelada simples	80.0	0.8	1.66	Singhvi *et al.* (2010)
Lb. lactis RM 2-24	α celobiose	SSF	73.0	0.73	1.52	Singhvi *et al.* (2010)
Lb. pentosus	Os sarmentos	Batelada simples	24.0	0.76	0.51	Moldes *et al.* (2006)
	Hidrolisados cascas de farelo de cevada	Batelada simples	33.0	0.57	0.60	Moldes *et al.* (2006)
	Sabugo de milho	Batelada simples	26.0	0.53	0.34	Moldes *et al.* (2006)
Lb. pentosus ATCC 8041	Resíduos de corte de videira	Batelada simples		0,77	0,84	Bustos *et al.* (2004)
	A forragem de milho	Fed-batch SSF	74,8	0,65	-	Zhu *et al.* (2007)
Lb. planlarum	Fibras de alfafa	SSF	46.4	0.46	0.64	Sreenath *et al.* (2001)
Lb. plantarum (Recombinant)	Glucano / Cellopentaose / Cellohexaose	Batelada simples	1,47/1 ,27/1, 27			Okano *et al*. (2010a)
	Arabinose	Batelada simples	38.6	0.82	3.78d	Okano *et al*. (2009a)
	Xilose	Batelada simples	41.2	0.89	1.6d	Okano *et al*. (2009b)
Lb. rhamnosus and Lb. brevis	A forragem de milho	SSF	20.95	0.70	0.58	Cui *et al.* (2011)
Lb. rhamnosus ATCC 7469	Lodo de papel	Batelada simples/ SSF	73.0	0.97	2.9	Marques *et al*. (2008)
Lb. rhamnosus ATCC 9595 (CECT288)	Bagaço de maçã	Batelada simples	32.5	0.88	5.41	Gullon *et al.* (2008)
	biosludge celulósico	SSF	39.4	0.36	0.82	Romani *et al*. (2008)
Lactobacillus sp. RKY2	Farelo de arroz e trigo	Batelada simples	129	0.95	2.9	Yun *et al.* (2004)
	Hidrolisado lignocelulosico	Continuo com reciclo de células	27.0	0.9	6.7	Wee and Ryu (2009)
Lc. lactis IO-1	Xilose	Batelada simples	33.26	0.68	–	Tanaka *et al.* (2002)
	Bagaço cana de açúcar	Batelada simples	10.9	0.36	0.17	Laopaiboon *et al*. (2010)
Leuconostoc lactis SHO-47 and SHO-54	Hidrolisado de Xilana	Batelada simples	2,3	-	-	Ohara *et al.* (2006)

E, Enterococcus; Lb, Lactobacillus; Lc, Lactococcus; SSF, sacarificação e fermentação simultâneas.

3.7. 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 3.7) 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%)]. Estes componentes estão associados a uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas, denominada *lignina* (15-25%). (PEREIRA JR, COUTO & SANTA ANNA, 2008).

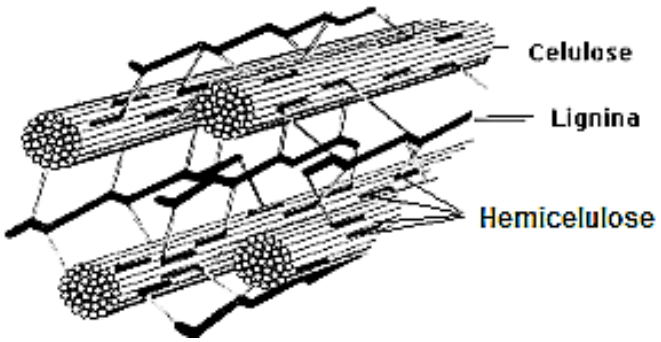

Figura 3.7. Polímeros constituintes do material lignocelulósico. Fonte: SHLESER, 1994

- *Celulose*. A celulose (C6H1005)n, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como homopolissacarídeo linear e composto por unidades de β-D-glicose, unidas por ligações β (1-4) carbono-carbono. É a matéria orgânica mais abundante sobre a Terra, consistindo de aproximadamente de 50% de toda a biomassa (YANG *et al.,* 2007).

- *Hemicelulose.* Outro componente essencial da parede celular das plantas é um polissacarídeo formado por diferentes unidades de açúcares pertencentes aos grupos das pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxiexoses; linear ou ramificado, além de amorfo com massa molar relativamente baixa. Esta macromolécula está intimamente ligada à celulose, definindo propriedades à parede celular e desempenhando funções de regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (YANG *et al.,* 2007).

- *Lignina.* È uma substância de estrutura complexa, tridimensional fenilpropanóidica, rica em compostos aromáticos. Formada pela polimerização desidrogenativa dos álcoois trans-coniferílico, trans-p-cumárico e trans-sinapílico; a proporção destes três compostos resulta em diferentes tipos de ligninas com variação da complexidade estrutural, sendo importante destacar que a lignina quando é liberada dificulta os processos fermentativos. Presente em todas as plantas superiores, esta estrutura é responsável pela rigidez da parede celular em vegetais (YANG *et al.,* 2007).

Como a biomassa lignocelulósica, em geral, é recalcitrante e encontra-se em uma forma que não pode ser diretamente atacada por agentes biológicos eficientemente, faz-se necessário fracioná-la para que os polissacarídeos possam ser transformados em açúcares que serão assimilados, principalmente glicose, xilose e arabinose. Este processo de transformação (Figura 3.8) requer inicialmente um pré-tratamento da biomassa (físico, químico, físico-químico ou biológico), seguido de hidrólise enzimática.

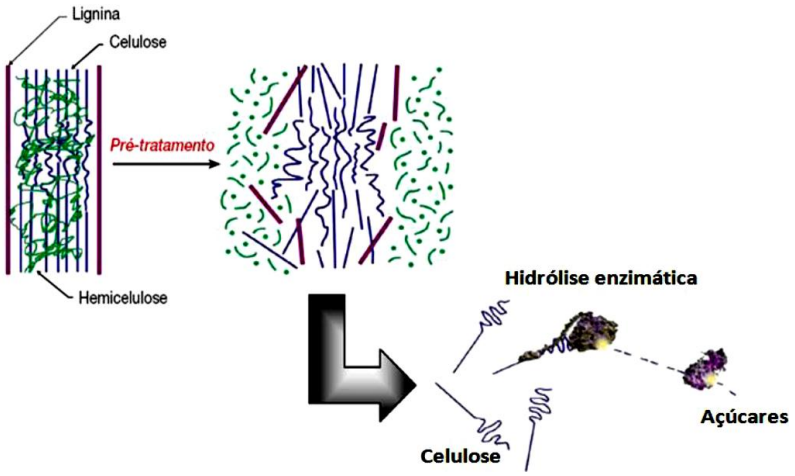

Figura 3.8. Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos seguida de hidrólise enzimática
Fonte: CANILHA *et al.,* 2009

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). Outros constituintes menores presentes são compostos orgânicos também chamados de

extrativos (ésteres, álcoois, esteróides e outros) e inorgânicos (sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio, principalmente). As proporções entre os diferentes constituintes dependem do tipo de material (PEREIRA JR, PEIXOTO & MELO, 2008).

Quadro 3.4. Composição de resíduos agroindustriais

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: BORGES & PEREIRA., (2011)

Dentre os resíduos agroindustriais de composição lignocelulósica de maior importância destacam-se: bagaço e palha de cana-de-açúcar; sabugo e palha de milho; palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada e resíduos municipais baseados em papel (Quadro 3.4). Especificamente para o bagaço de cana-de-açúcar, só 2013-2014 foi estimada em torno de 185 milhões de toneladas de bagaço (MAPA, 2014).

3.7.1. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos

O pré-tratamento tem a finalidade de alterar a estrutura lignocelulósica, para aumentar a acessibilidade da celulose às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentáveis, além da remoção de grande parte da fração hemicelulósica e da lignina. O pré-tratamento de biomassa lignocelulósica é uma etapa que aumenta significativamente a eficiência da hidrólise enzimática da celulose para posterior fermentação, realizada por leveduras ou bactérias (RAHMAN, TASHIRO & SONOMOTO, 2011).

Existem diferentes tipos de pré-tratamentos, em relação a sua natureza podem se classificar em três grupos: físicos, químicos e biológicos, sendo as melhores opções de pré-tratamento aquelas que combinam elementos, principalmente físico-químicos (RAHMAN, TASHIRO & SONOMOTO, 2011). No quadro 3.5 se apresentam alguns exemplos de pré-tratamentos e as mudanças geradas na matriz do material. Para o presente trabalho o se tem combinação de elementos físicos (moagem) e pré-tratamento ácido para a hidrólise e separação da fração hemicelulósica, seguido do pré-tratamento alcalino para remoção de parte da fração de lignina, tornando as fibras de celulose acessíveis ao ataque enzimático.

Quadro 3.5. Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática

Método	Operações ou fatores que ocasionam mudança na estrutura	Tipo de mudança
Físico	Moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, presssão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios γ, micro-ondas), altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor).	Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula, diminuição do grau de polimerização.
Químico	Bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores, solventes organicos.	Deslignificação, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com inchaço da amostra, aumento da porosidade.
Biológico	Bolor branco (*Pleurorus, Pycnoporus, Ischnoderma, Phlebia*, etc).	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose.
Combinado	Tratamento alcalino associado com explosão a vapor, moagem acompanhada com tratamento alcalino ou tratamento ácido.	Degradação da hemicelulose, deslignificação, aumento da área superficial e tamanho dos poros.

Fonte: RABELO, SARITA CÂNDIDA, 2010

3.7.2. Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas, chamadas de celulases (Figura 3.9) que são um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulases:

- ✓ *Endoglucanases:* que clivam randomicamente as ligações internas da região amorfa, liberando oligossacarídeos com terminações redutoras e não redutoras livres.

- ✓ *Exoglucanases*: subdivididas em celobiohidrolases, que são responsáveis pela hidrólise dos terminais redutores (CBHs do tipo I) e não redutores (CBHs do tipo II), e glucanohidrolases (GHs), que são capazes de liberar moléculas de glicose diretamente dos terminais do polímero.

- ✓ *β-glucosidases*: que hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis de baixo grau de polimerização (menor que 7) a glicose. As enzimas do complexo celulásico sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (ARANTES & SADDLER, 2010).

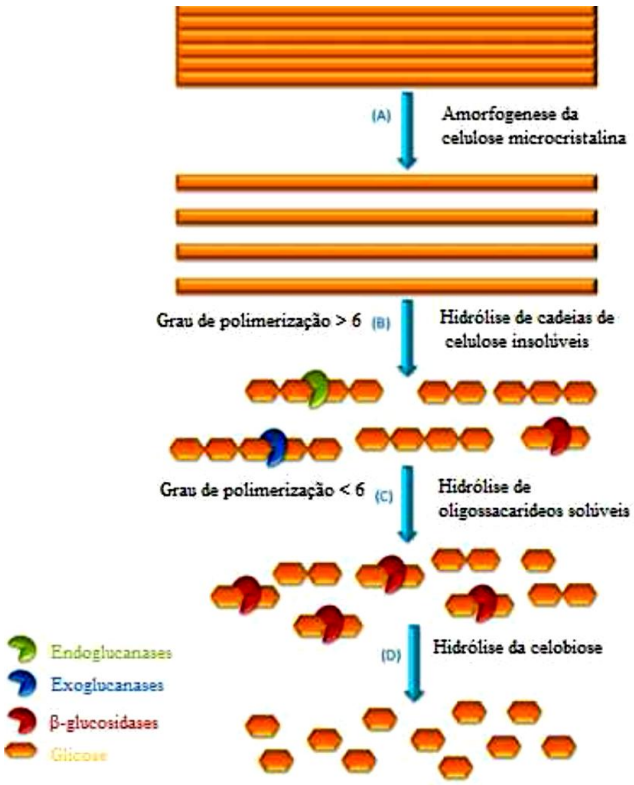

Figura 3.9. Amorfogênese da celulose microcristalina e ação das enzimas que fazem parte do complexo celulásico (ARANTES & SADDLER, 2010)

Individualmente, as enzimas do complexo celulásico não hidrolisam a celulose de maneira eficiente, sendo necessária uma ação em conjunto (sinérgica), para que

o rendimento grupal seja melhor do que a soma dos rendimentos individuais, tendo assim três formas de sinergia (LYND *et al.,* 2002):

- *Sinergia endo-exo:* as endoglucanases atuam nas regiões amorfas, liberando terminais redutores e não redutores, nos quais atuarão as CBHs do tipo I e do tipo II, respectivamente.

- *Sinergia exo-exo***:** as CBHs I e CBHs II atuam simultaneamente nos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglucanases.

- *Sinergia exo-BG e endo-BG:* as exoglucanases e endoglucanases liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos da β-glucosidase.

Durante a hidrólise de substratos solúveis, ocorrem basicamente os seguintes fenômenos: a adsorção das celulases aos sítios disponíveis no substrato celulósico; formação de um complexo ativo celulases-substrato; hidrólise das ligações glicosídicas do polímero celulósico; e dessorção do complexo celulásico do substrato hidrolisado (ZHANG & LYND, 2004).

A hidrólise enzimática da celulose é geralmente realizada sob condições brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45°C e 50°C), não acarreta problemas de corrosão dos equipamentos, permite maiores rendimentos (75%- 85%) e possibilita a sacarificação e fermentação simultâneas *SSF* (LYND *et al.,* 2002; ZHANG & LYND, 2004).

3.8. Bagaço de cana-de-açúcar

Um importante subproduto lignocelulósico agroindustrial é o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), resíduo fibroso dos colmos da cana remanescente após o esmagamento e extração do caldo da cana-de-açúcar. As usinas de açúcar geram aproximadamente 270 – 280 kg de bagaço (50% de umidade) por tonelada de cana-de-açúcar, representando cerca de 30% do total produzido.

Tradicionalmente é principalmente utilizado na geração de vapor e eletricidade necessária às plantas de processamento de açúcar e etanol; sendo, tradicionalmente, queimado em caldeiras de baixa eficiência para produzir quantidades modestas de energia, o bagaço remanescente é geralmente estocado, constituindo um problema ambiental devido ao risco de combustão espontânea e ao mesmo tempo constitui uma fonte de recurso renovável (BAUDEL *et al.,* 2005; PESSOA-JR *et al.,* 2005).

O bagaço é composto de celulose (32-44%), hemicelulose (27-32%), lignina (19-24%) e cinzas (4,5-9%). Quimicamente, o bagaço contém cerca de 50% de celulose, 30% de pentoses e 2,4% de cinzas (SOCCOL *et al.,* 2010). Devido ao seu alto conteúdo de carboidrato (celulose e hemicelulose), relativo baixo conteúdo de lignina e sua disponibilidade como produto de resíduo industrial (baixo custo), o bagaço é particularmente um substrato apropriado para a bioconversão para uma grande variedade de produtos de valor agregado por processos microbianos, biocombustíveis e produtos químicos, como o ácido lático. 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.

A taxa de consumo de ácido lático tem crescido em média 15 % (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000), justificando a necessidade de diminuição dos custos de produção associados principalmente à matéria-prima e etapas de separação e purificação. O que corresponde à matéria-prima o uso de materiais lignocelulósicos para produção de ácido lático de segunda geração, de forma eficiente e economicamente viável, dentro da Biorrefinaria, (PEREIRA JR, COUTO & SANTA ANNA, 2008).

3.9. Aproveitamento de materiais lignocelulósicos no contexto de biorrefinaria

O aproveitamento de materiais de composição lignocelulósica tem focalizado a produção não convencional de produtos de valor agregado como o ácido D(-) lático, 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, principalmente biomassa lignocelulósica, de maneira mais integral e diversificada, para a produção de uma variedade de valiosas substâncias e energia, com mínima geração de resíduos e emissões (PEREIRA JR, COUTO & SANTA ANNA, 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 biotecnológica 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. Sendo a plataforma biotecnológica aquela sobre a qual o presente trabalho está baseado (PEREIRA JR, COUTO & SANTA ANNA, 2008).

3.10. Sacarificação e Fermentação Simultânea (*Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF*)

Neste processo, a hidrólise enzimática de celulose e a fermentação ocorrem na mesma etapa (Figura 3.10). Essa estratégia de processo apresenta inúmeras vantagens, dentre elas: a redução da inibição das celulases pelos seus produtos de hidrólise, uma vez que os glicídios não se acumulam no meio; menor complexidade e custo do processo, pois reduz o número de reatores; minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre no meio; e maiores rendimentos de hidrólise, já que o equilíbrio das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida (TAHERZADEH & KARIMI, 2007).

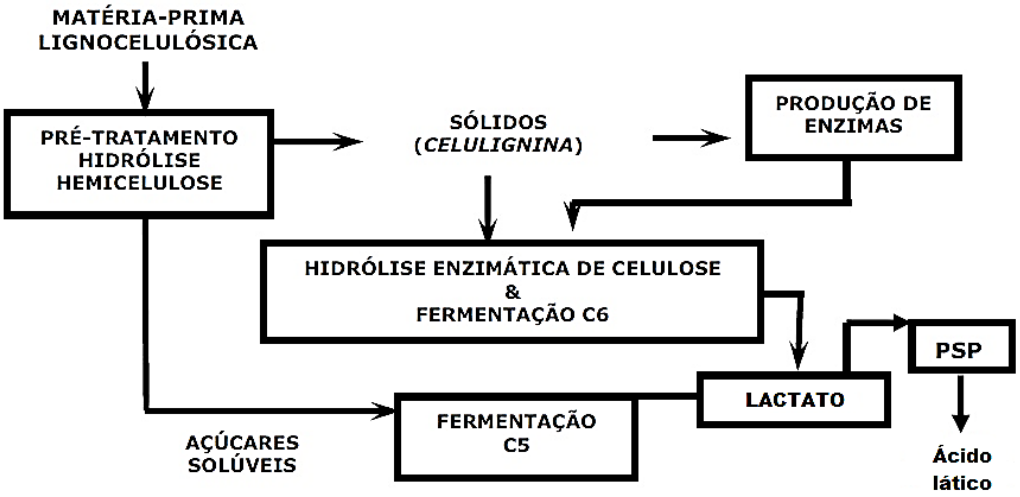

Figura 3.10. Diagrama de blocos do processo *SSF*. Adaptado de PEREIRA JR, 2010.
PSP: Processo de separação e purificação

Entretanto, o não favorecimento da cinética enzimática devido à necessidade de conduzir o processo dentro da faixa ótima do micro-organismo fermentador constitui uma desvantagem. Em relação a este aspecto, estudos têm sido realizados no sentido de produzir celulases que atuem em valores de pH e temperatura próximos daqueles ótimos para o processo fermentativo (TAHERZADEH & KARIMI, 2007).

3.11. 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. Maiores detalhes sobre os planejamentos de PB podem ser obtidos em PLACKETT & BURMAN (1946).

Com o numero de variáveis reduzidas é possível o desenvolvimento de planeamentos experimentais mais complexos que como o caso do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que permite desenvolver um modelo empírico para o processo estudado e obter respostas com maior precisão. O planejamento DCCR permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se assim a análise de uma variável, sujeita a todas as combinações das demais e realizar estudos de otimização de processos para determinação de condições ótimas (BRUNS, 1995).

3.12. Considerações gerais

A demanda por combustíveis, bens de consumo e de serviço têm intensificado a pesquisa e desenvolvimento para a utilização de forma mais diversificada e integral 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 devem ter seu potencial avaliado em processos de produção de biocombustíveis e substâncias químicas de alto valor agregado como o ácido D(-) lático na plataforma bioquimica da biorrefinaria (PEREIRA, 2005).

Para o caso especifico do ácido D(-) lático, sua obtenção só pode ser feita a traves de processos fermentativos, porem a importância no desenvolvimento de processos que permitam uma produção viável economicamente, neste caso focando a redução de custos associados a matérias primas e fatores nutricionais, além da procura de micro-organismos homofermentativos com alta seletividade para produção de ácido D(-) lático como é o caso das bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus.*

Sumariamente, na estratégia de operação visada no presente trabalho inclui realizar o pré-tratamento químico em condições moderadas do material lignocelulosico, que resulta na hidrólise da hemicelulose e eliminação da maior parte da lignina, 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*), com o intuito de inserir a produção de ácido lático de 2ª geração no contexto de Biorrefinaria.

Os isômeros puros do ácido lático são obtidos por síntese microbiana, tendo importância relevante nas propiedades dos biopolímeros de PLA, as quais dependem da aplicação especifica. No caso do isômero D(-) lático, sua inserção na matriz polimérica afeita o grau de cristalinidade e como consequência suas propiedades mecânicas, oferecendo uma estrutura amorfa com maior grau de biodegradabilidade. A demanda do ácido lático tem estimado um aumento entre 5 a 8% anualmente, com uma produção estimada de 367.300 tonelada para o ano 2017 e um mercado no sector de biopolímeros em torno de um bilhão de dólares por ano, sendo necessário chagar a valores de produção de 0,8 US$/kg para alcançar e manter viabilidade econômica, justificando assim pesquisas para o desenvolvimento de processos de segunda geração.

CAPÍTULO 4

METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento dos experimentos do presente trabalho, os quais ficaram divididos em três etapas:

a) Seleção do micro-organismo com potencial para produção de ácido D(-) lático, cujos experimentos tiveram início após a ativação das células, armazenadas em ampolas de liofilização, método utilizado para preservação de células a mediano prazo.

b) Com o micro-organismo selecionado foi padronizado o tempo de preparo do inóculo e foram desenvolvidos planejamentos experimentais em frascos agitados para otimização do meio sintético de fermentação e obtenção de um meio de composição simples, o qual foi avaliado posteriormente em biorreator instrumentado.

c) Finalmente, o material lignocelulosico, neste caso, bagaço de cana-de-açúcar, foi submetido à pré-tratamento e pré-hidrólise enzimática para avaliação preliminar da estratégia de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) em frascos agitados, visando a produção de ácido D(-) lático de segunda geração.

No diagrama (Figura 4.1) se apresenta de forma geral o esquema para os ensaios de laboratório. O banco de micro-organismo corresponde à padronização das amostras de origem para os experimentos, foi feito um estoque de amostras congeladas tendo como agente crio-protetor o glicerol.

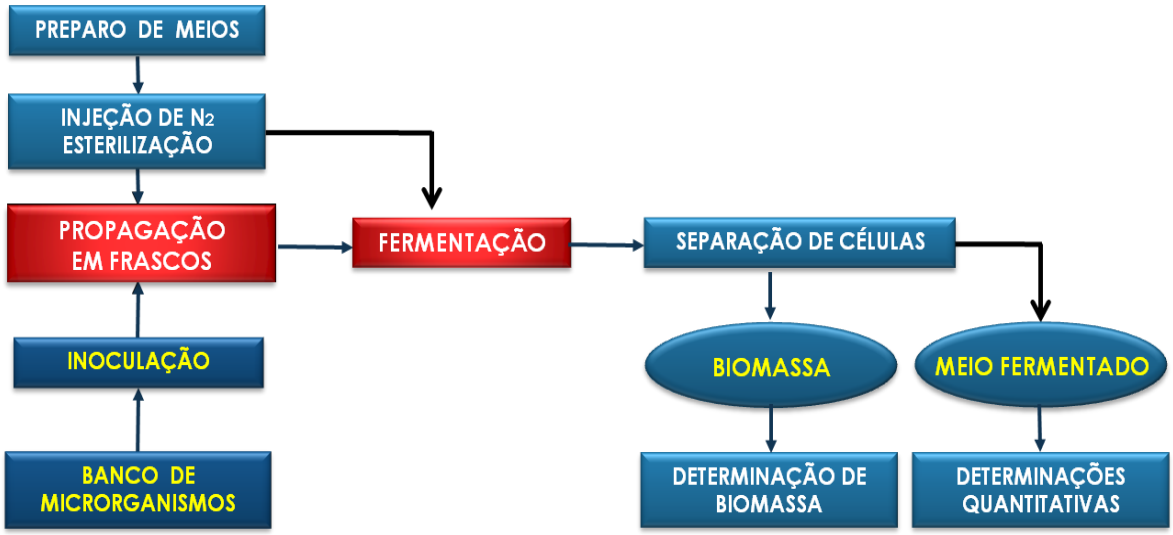

Figura 4.1. Esquema geral das etapas para desenvolvimento dos ensaios para produção de ácido D(-) lático

A primeira etapa dos experimentos inicia com a preparação dos meios de cultivo e fermentação, os quais foram levados a uma condição de anaerobiose pela injeção de N_2 e posteriormente esterilizados em autoclave; seguidamente se tem a etapa de ativação do micro-organismo e preparo do inóculo em frascos de penicilina; posteriormente a etapa de fermentação em frascos agitados ou biorreator; apos da fermentação se tem a separação da biomassa bacteriana e o meio fermentado e finalmente as determinações quantitativas.

4.1. Material microbiológico

4.1.1. Micro-organismo utilizado

O laboratório de Desenvolvimento de Bioprocesso da EQ/UFRJ conta com quatro amostras importadas de micro-organismo produtores de acido lático (Quadro 4.1). As linhagens de *Lactobacillus* foram obtidas do banco de cepas americano *"American Type Culture Collection* - ATCC", mantidas em liofilização, armazenadas em ampolas devidamente lacradas, isenta de luz. As linhagens foram ativadas mediante a suspensão de células em um meio líquido MRS (*Manga-Rogosa-Sharpe*, Quadro 4.2), para obtenção das células microbianas.

Quadro 4.1. Bactérias produtoras de ácido lático

Micro-organismos estudados	Código de identificação
Lactobacillus delbrueckii lactis	ATCC 12315
Lactobacillus helveticus	ATCC 15009
Lactobacillus coryniformis torquens	ATCC 25600
Lactobacillus coryniformis coryniformis	ATCC 25602

Quadro 4.2. Composição do meio MRS

Componente	Concentração g/L
Peptona	10,0
Extrato de carne	10,0
Extrato de levedura	5,0
Glicose	20,0
Polisorbato 80	1,0
Citrato de amônio	2,0
Acetato de sódio	5,0
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de manganês	0,05
Fosfato dipotássico	2,0
pH: 6,5 ± 0,2	

Inicialmente, o meio MRS foi preparado e esterilizado. Em seguida tubos de ensaio contendo alíquotas de 5 mL deste meio foram utilizados para promover a ativação das células liofilizaçãdas (de forma separada para as quatro linhagens), que foram transferidas assepticamente para o meio de manutenção e incubadas à 37ºC por 24 horas em câmara de anaerobiose. Posteriormente, foram feitos ensaios em meio sintético MRS para a seleção da linhagem com maior potencial para a produção de acido D(-) lático.

4.1.2. Manutenção do micro-organismo

Como método de preservação foi utilizado o congelamento (-80ºC) usando glicerol como agente protetor. Foi feita a ativação e propagação da cultura em frascos de penicilina contendo 50 ml de meio MRS a temperatura de 37ºC e 120 rpm

por 12 horas em condição de anaerobiose. Posteriormente as células foram separadas por centrifugação a 8000 rpm por 10 min e resuspendidas em uma mistura de meio MRS com glicerol 50% a fim de preservar a integridade celular, e estocadas em criotubos dentro de câmara asséptica.

4.1.3. Observação microscópica

Após o crescimento bacteriano nos meios de cultura, foram retiradas amostras assepticamente e preparados esfregaços em lâminas para posterior coloração, seguindo o método Gram. As preparações foram analisadas por microscopia óptica, usando microscópio binocular com aumento de 1000x.

4.2. Meios empregados para ativação, propagação e fermentação

Em todos os experimentos, as células foram ativadas e propagadas em meio líquido MRS. As etapas de ativação e de propagação foram feitas em frascos de penicilina, onde o oxigênio presente no meio de cultura foi reduzido com injeção de nitrogênio gasoso por 10 min, seguido de esterilização em autoclave durante 10 min, sob pressão de 0.5 kg_f/cm^2 e temperatura de 120ºC.

4.2.1. Ativação de células congeladas para obtenção do pré-inóculo

Foram utilizados frascos de penicilina de 100 mL contendo 50 mL de meio MRS reduzido e esterilizado. Em cada frasco foi injetado o conteúdo de um criotubo, com aproximadamente 1,3 ml da mistura MRS-glicerol contendo as células bacterianas em câmara asséptica. Os frascos contendo a células suspendidas em meio fresco MRS foram mantidos em agitação de 120 rpm, temperatura de 37ºC durante 7 horas (aproximadamente a metade da fase exponencial) atingindo uma concentração e condições metabólicas apropriadas células no pré-inóculo.

4.2.2. Inóculo

Para o preparo do inóculo foram igualmente utilizados frascos de penicilina de 100 mL contendo 50mL de meio MRS reduzido e esterilizado. No meio foi injetado

um inóculo de 10% (v/v) contendo as células bacterianas ativas, dentro de câmara asséptica. Os frascos contendo a células suspendidas foram mantidos em agitação de 120 rpm, temperatura de 37ºC durante 7 horas (aproximadamente a metade da fase exponencial) atingindo uma concentração de células e condições metabólicas apropriadas para obtenção do inóculo destinado à etapa de fermentação.

4.2.3. Meios de Fermentação

Inicialmente, foi utilizado o meio MRS como meio sintético de fermentação, com ligeiras variações na concentração inicial de glicose. Para os ensaios do efeito da presença de xilose, foi mantida a composição do meio MRS, tendo a substituição da glicose por xilose. Posteriormente, a composição do meio sintético foi modificada de acordo com planejamentos experimentais para estudo dos efeitos dos componentes do meio MRS na produção fermentativa de ácido D(-) lático e finalmente a otimização para obtenção de um meio de composição simples, tendo como fonte de carbono em todos os casos glicose.

4.3. Ensaios de fermentação em frascos agitados

As fermentações foram realizadas em frascos de penicilina de 100 mL contendo entre 50 mL e 80 mL do meio correspondente de acordo com as concentrações de nutrientes definidas pelo planejamento experimental. O meio de fermentação foi reduzido e esterilizado, posteriormente no meio foi injetado um inóculo de 10% (v/v) contendo as células bacterianas ativas dentro de câmara asséptica. As fermentações foram sob agitação de 120 rpm, a 37ºC. Os tempos de fermentação foram definidos de acordo com o planeamento experimental na faixa entre 12 a 24 horas. Alguns experimentos foram desenvolvidos sem controle de pH, para experimentos com controle de pH, foi adicionado $CaCO_3$ (5%) como agente neutralizante. O crescimento celular e consumo de substrato foram monitorados para os experimentos de cinéticas de crescimento; o consumo de substrato e formação de produtos foram acompanhados durante as fermentações.

Em todos os experimentos em frascos foram retiradas alíquotas de 1 mL, com auxílio de seringa e agulha estéril em câmara asséptica. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante destinado para dosagens de açúcares e produtos, por cromatografia liquida; o sedimento (células) foi completado até 2 mL com água destilada e homogeneizado em agitador tipo vortex, para promover a ressuspensão das células antes da quantificação por espectrofotometria correlacionada com peso seco.

4.4. Fermentação em biorreator instrumentado com de meio sintético

Figura 4.2. Biorreator BIOFLO III (*New .Brunswick*) utilizado na produção de ácido lático

Para a realização das fermentações sob condições controladas foi utilizado biorreator instrumentado (New Brunswick BioFlo 310®, Figura 4.2), agitado mecanicamente, empregando um vaso reacional de 2L, contendo 800 mL de meio de fermentação. Os experimentos conduzidos em batelada foram controlados automaticamente a uma temperatura de 37ºC, agitação de 120 rpm, e pH entre 6,5-7,0 monitorado utilizando-se um eletrodo de pH esterilizado e controlado mediante a adição de NaOH (4M). A operação foi conduzida em batelada simples com o meio de fermentação resultante dos planejamentos em frascos agitados.

4.5. Fermentação da fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açucar possui uma fração com alto conteúdo de celulose, que pode ser utilizada para a obtenção de ácido D(-) lático por fermentação, mediante técnicas que possibilitem o aproveitamento de glicose contida no resíduo. Entre as técnicas que podem ser avaliadas encontra-se a sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*).

4.5.1. Pré-tratamento ácido

O Bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cedido pela Destilaria Costa Pinto (SP-Brazil), foi previamente lavado, seco e então cominuído em moinho. Inicialmente uma etapa de pré-tratamento ácido foi realizada para desorganizar a matriz de composição lignocelulósica visando remoção da fração hemicelulósica (Figura 4.3).

Figura 4.3. 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).

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 121ºC, durante 30 minutos em autoclave (BETANCUR, 2010). O hidrolisado, licor resultante deste processo (hemicelulose), foi separado utilizando uma prensa hidráulica. Posteriormente o bagaço resultante foi submetido a um

processo de lavagem, ajuste do pH em torno de 5, com adição de solução de NaOH 4M, finalmente o material foi submetido a secagem.

4.5.2. Pré-tratamento alcalino

A celulignina, resultante da metodologia para obtenção de hemicelulose (pré- tratamento ácido), foi submetida à deslignificação mediante um tratamento alcalino, com NaOH 4% (m/v) e uma relação sólido-líquido 1:20, seguido de tratamento térmico a 121ºC, durante 30 minutos em autoclave, conforme mostra a Figura 4.4. Sequencias de lavagens com água foram feitas, garantindo a eliminação da lignina seguido do ajuste do pH em torno de 5 com adição de H_2SO_4 1% e posterior secagem, gerando a celulignina parcialmente deslignificada (VÁSQUES, 2007).

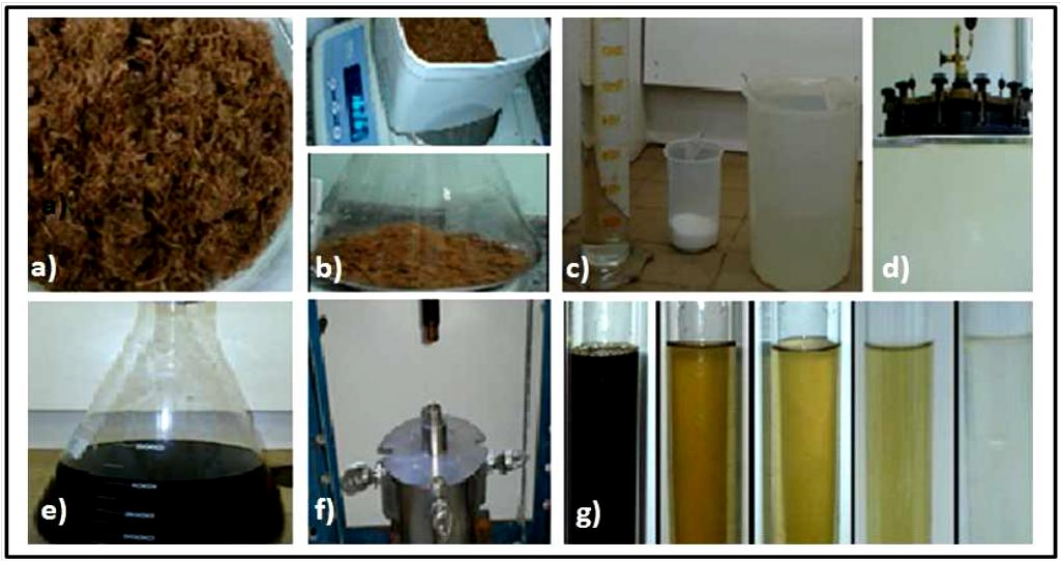

Figura 4.4. Etapas do tratamento alcalino: Celulignina sendo pesada (a,b); Tratamento alcalino com NaOH diluído (c); Tratamento térmico em autoclave (d); Celulignina obtida/licor alcalino (e); Separação em prensa hidráulica(f), Sequência de lavagens até clarificação da água utilizada para remoção da lignina (h).

4.5.3. Pré-hidrólise enzimática e a concepção de SSF

Após os pré-tratamentos químicos com ácido e base diluídos, foi realizada a etapa de pré-hidrólise enzimática, na qual a celulose pôde ser convertida a açúcares fermentáveis (glicose). Dessa forma, a celulignina pré-tratada alcalinamente e

lavada com água destilada foi submetida à hidrólise enzimática com uso de um preparado celulásico comercial (Multifect, Genencor, USA). A pré-hidrólise foi desenvolvida em frascos agitados, utilizando-se uma atividade enzimática de 25 FPU/g, sob temperatura constante de 50ºC, relação sólido-líquido 3:10 durante 12 horas (SANTOS, 2009). A Figura 4.5 apresenta a celulignina seca obtida após a deslignificação; após a adição da enzima e o meio obtido após o período de hidrólise enzimática.

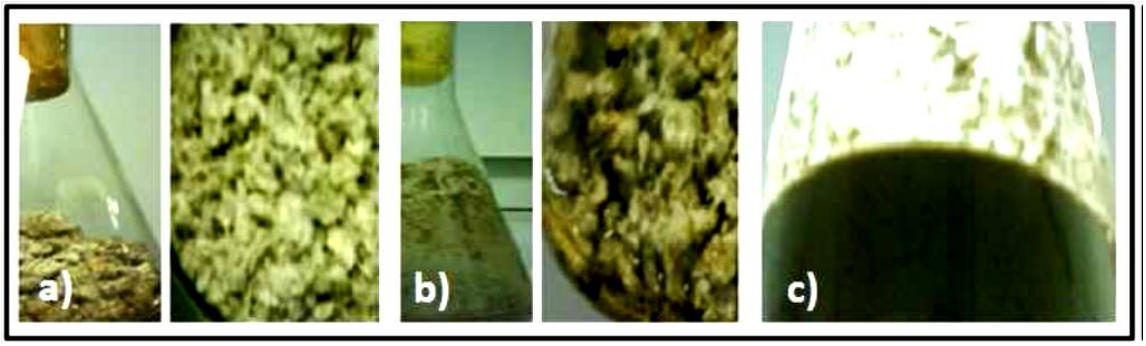

Figura 4.5. Aspecto da celulignina após a deslignificação (a); após a adição de enzimas e meio (b) e aspecto após a hidrólise enzimática em frascos agitados (c).

O hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açucar para a fermentação foi suplementado com o meio resultante dos planejamentos experimentais, o processo *SSF* foi conduzido em frascos agitados, com o emprego de 10% v/v de inóculo a uma temperatura de 37ºC, 120 rpm sem controle de pH por um tempo de 16 horas.

4.6. Métodos Analíticos

4.6.1. Determinação de biomassa

A concentração de massa celular foi acompanhada por espectrofotometria a 600 nm (LEAL, 1998) tendo água destilada como referência de calibração. Inicialmente, uma curva padrão correlacionando o peso da massa seca das células com a absorvância foi construída usando a biomassa obtida do cultivo em frascos de penilicina de 100 mL contendo 70 mL de meio de ativação, a 37ºC em agitador rotatório a 120 rpm. Após 7 horas de incubação diferentes diluições foram feitas e para cada concentração de biomassa foi determinada a absorbância a 600nm. A

massa seca foi determinada após a centrifugação do meio fermentado a 10000 rpm por 10 min, seguido de lavagem das células com água destilada e nova centrifugação e posterior secagem em dissecador até peso constante.

4.6.2. Determinações quantitativas

Inicialmente, a concentração de glicose residual foi medida no sobrenadante livre de células pelo método oxidase-peroxidase utilizando um kit enzimático (Laborclin, Pinhais, Brazil), e uso de curva padrão. A quantificação das amostras, contendo glicose e xilose, 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 concentrações dos produtos das fermentações 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 concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento.

4.6.3. Determinação do isômero de ácido lático

O enantiômero do ácido lático produzido foi determinada por cromatografia liquida de alta eficiência com fase estacionaria quiral (*CLAE-FEQ*), através do detector ultra-violeta (*UV/VIS*) – 254 nm e fase móvel $CuSO_4$, 0,001 mol/L. A identificação do enantiômero D(-) lático foi mantida para as amostras finais de cada experimento a fim monitorar a formação exclusiva do isômero de interesse.

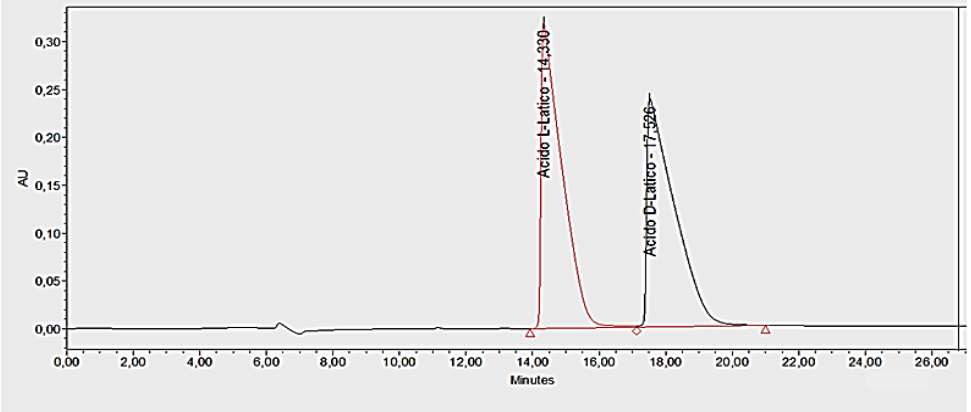

Figura 4.6. Cromatograma para identificação dos isômeros do acido lático

De forma geral os principais tipos de interações, responsáveis pela discriminação, entre os enantiômeros de um analito e o seletor quiral, no sentido decrescente de intensidade, são: interação coulômbica, ligação de hidrogênio e interação estérica (muito forte), interação π-π e íon-dipolo (fortes), interação dipolo-dipolo (intermediária), interação dipolo-dipolo induzido (fraca) e dispersão de London (muito fraca). As interações coulômbicas e do tipo π-π podem ser atrativas ou repulsivas, a estérica é repulsiva e as demais são todas atrativas. (BERTHOD, 2006)

Para o presente trabalho, o mecanismo de separação e idenficação dos enantiômeros estão baseados na formação de complexos diastereoisoméricos ternários envolvendo um enantiômero de uma molécula quiral (L), L-prolina; um íon de um metal de transição (M), Cu^{2+}; e os enantiômeros do analito racêmico (R e S). Os complexos formados, representados por L-M-R e L-M-S, podem ser separados se possuírem estabilidades diferentes, reflexadas nos diferentes tempos de retenção. (BERTHOD, 2006).

4.6.4. 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, para os experimentos em frascos agitados o pH inicial e final foi estimado mediante fita colorimétrica.

4.7. Planejamentos experimentais

Foi realizado um planejamento *Plackett* & *Burman* (PB), para determinação dos componentes do meio com maio significância para produção de ácido D(-) lático. A partir dos resultados obtidos do planejamento PB, foi conduzido um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), para otimização do meio de fermentação sendo como principais critérios: redução da concentração dos componentes e maximizar a produção de acido D(-) lático.

4.8. Avaliação de resultados

a) *Fator de rendimento de produção de ácido lático (g/g)*

$$Y_{P/S} = (\Delta P/-\Delta S) = (P-P_0)/(S_0-S)$$

Sendo:

P: Concentração final de ácido lático (g/L)
Po: Concentração inicial de ácido lático (g/L)
S: Concentração final de substrato (g/L)
So: Concentração inicial de substrato (g/L)

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

$$Y_{X/S} = (\Delta X/-\Delta S) = (X-X_0)/(S_0-S)$$

Sendo:

X: Concentração final de biomassa (g/L)
Xo: Concentração inicial de biomassa (g/L)
S: Concentração final de substrato (g/L)
So: Concentração inicial de substrato (g/L)

c) *Produtividade volumétrica (g/L.h)*

$$Q_P = (P-P_0)/ t_f$$

Sendo:

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

d) *Eficiência do processo (%)*

$$Ef = \frac{Y\ p/s(Processo)}{Yp/s(Teórico)} * 100$$

A eficiência de ácido D(-) lático é medida de acordo com a quantidade de ácido produzido/1 g de substrato consumido (expressos em porcentagem), a partir do valor de $Y_{P/S}$ teórico para bactérias láticas homofermentativas. Para cada mol de substrato são produzidos dois mols de ácido lático, sendo una eficiencia representativa del rendimiento teórico ($Y_{P/S\ teorico,}$ 1,0 g ácido lático / g de glicose consumida) (RAHMAN, TASHIRO & SONOMOTO, 2013).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo foi destinado à exposição e discussão dos resultados, obtidos a partir dos experimentos planejados para elaboração desta dissertação. Nos estudos para seleção da linhagem com maior potencial para produção de ácido D(-) lático foram desenvolvidos experimentos em frascos de penicilina, por conta da necessidade de se reduzir a concentração de oxigênio em todos os meios de cultivo. Nos estudos de otimização do meio sintético de fermentação, foram realizados planejamentos experimentais e os efeitos sobre a variável de resposta escolhida, concentração de ácido lático, foram analisados a partir de metodologias de superfície de resposta, definindo o meio sintético otimizado para a operação do processo, o qual foi avaliado em biorreator instrumentado. Finalmente, foi conduzido um experimento em frascos cônicos a fim de se avaliar a produção de ácido D(-) lático de segunda geração, a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com metodologias LADEBIO, empregando a concepção tecnológica de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas, denominada de processo *SSF*, da literatura inglesa *simultaneous saccharification and fermentation*.

5.1. Seleção da linhagem produtora de ácido D(-) lático

O desempenho das quatro amostras de *Lactobacillus* foi avaliado em anaerobiose, visando selecionar o micro-organismo mais adequado para a produção do ácido D(-) lático e dar continuidade aos ensaios programados. Os experimentos foram realizados em meio MRS com glicose como fonte de carbono. Os resultados desta série experimental estão apresentados na Figura 5.1. Observa-se que as quatro amostras de *Lactobacillus* apresentaram desempenho bastante satisfatório em diferentes extensões.

As linhagens de *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus delbrueckii lactis, Lactobacillus coryniformis torquens e Lactobacillus coryniformis coryniformis*

mostraram expressivo aumento da densidade celular, variando de 2,5 g/L a 4,0 g/L, e ausência de fase *lag* durante o processo de crescimento.

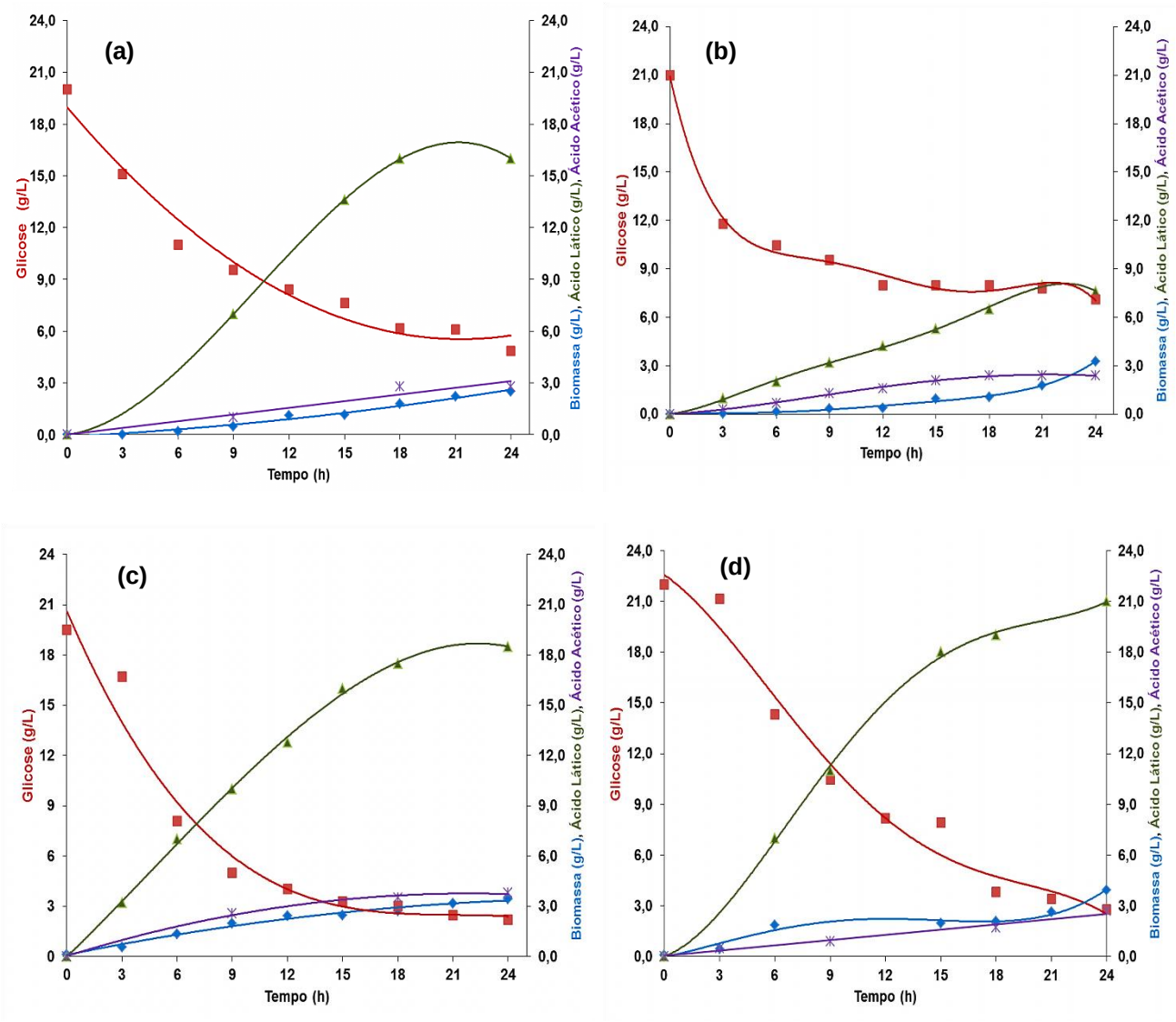

Figura 5.1. Cinéticas de crescimento e fermentação das amostras de Lactobacillus para a produção de ácido lático, em glicose como única fonte de carbono. (a) *Lactobacillus helveticus,* (*b) Lactobacillus delbrueckii lactis, (c) Lactobacillus coryniformis torquens, (d) Lactobacillus coryniformis coryniformis.*

As variáveis de respostas do processo em condição de anaerobiose para cada uma das linhagens estão apresentadas na Tabela 5.1, na qual se observam valores extremamente interessantes. A taxa específica de crescimento das linhagens variou de 0,376 a 0,462 h^{-1}, correspondendo a valores do tempo de duplicação da massa bacteriana de aproximadamente 1,8 a 1,5 h. No que concerne

ao fator de rendimento de produto por substrato consumido ($Y_{P/S}$), os valores variaram de 0,36 g/g a 0,90 g/g, mostrando a superioridade da espécie *Lactobacillus coryniformis*, corroborada também pelo elevado valor da produtividade volumétrica em ácido lático.

Tabela 5.1. Variáveis de respostas do processo fermentativo para a produção de ácido lático

Microrganismos	Variáveis de resposta				
	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	μ_x (h^{-1})	t_d (h)
Lactobacillus helveticus	0,17	0,79	0,67	0,462	1,49
Lactobacillus delbrueckii lactis	0,24	0,36	0,32	0,389	1,77
Lactobacillus coryniformis torquens	0,20	0,90	0,77	0,386	1,79
Lactobacillus coryniformis coryniformis	0,20	0,88	0,88	0,376	1,84

As linhagens de *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus coryniformis torquens e Lactobacillus coryniformis coryniformis* apresentaram variação moderada na produção de ácido lático em aerobiose quando comparada à condição de anaerobiose, mostrando-se tolerantes à presença de oxigênio (Tabela 5.2). No entanto, como esperado a maior produção de ácido lático, foi em todos os casos, na condição de anaerobiose.

Tabela 5.2. Concentração de ácido lático obtida pelas linhagens estudadas

Microrganismos	Produção de ácido lático (g/L)		Isômero quiral Identificado
	Anaerobiose	Aerobiose	
Lactobacillus helveticus	15,0	12	Mistura racêmica
Lactobacillus delbrueckii lactis	7,6	1,8	D(-) Lático
Lactobacillus coryniformis torquens	18,5	14,5	D(-) Lático
Lactobacillus coryniformis coryniformis	20,0	13,7	D(-) Lático

A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* apresentou maior intolerância à presença de oxigênio com uma forte redução na produção de ácido lático, sendo a linhagem que apresentou menor capacidade produtora nas condições avaliadas, indicando

uma severa restrição à presença de oxigênio no processo fermentativo. O mesmo comportamento foi reportado por LI & CUI (2010) e, ainda de acordo com outros pesquisadores, as bactérias do gênero *Lactobacillus* podem crescer em condições de microaerofilia e anaerobiose estrita (VIJAYAKUMAR *et al.,* 2008; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000; e KLEIN *et al.,* 1998).

A Figura 5.2 exibe os resultados da cromatografia quiral dos meios fermentados com as linhagens em estudo. Observa-se que a bactéria *L. helveticus* produziu uma mistura racêmica D-L lático e as demais linhagens produziram exclusivamente o isômero D(-) lático (Figura 5.2 b, c, d), indicando a elevada estereoespecificidade da enzima lactato desidrogenase em algumas espécies de *Lactobacillus* na produção de ácido D(-) lático, como reportado por Hofvendahl & Hägerdal (2000).

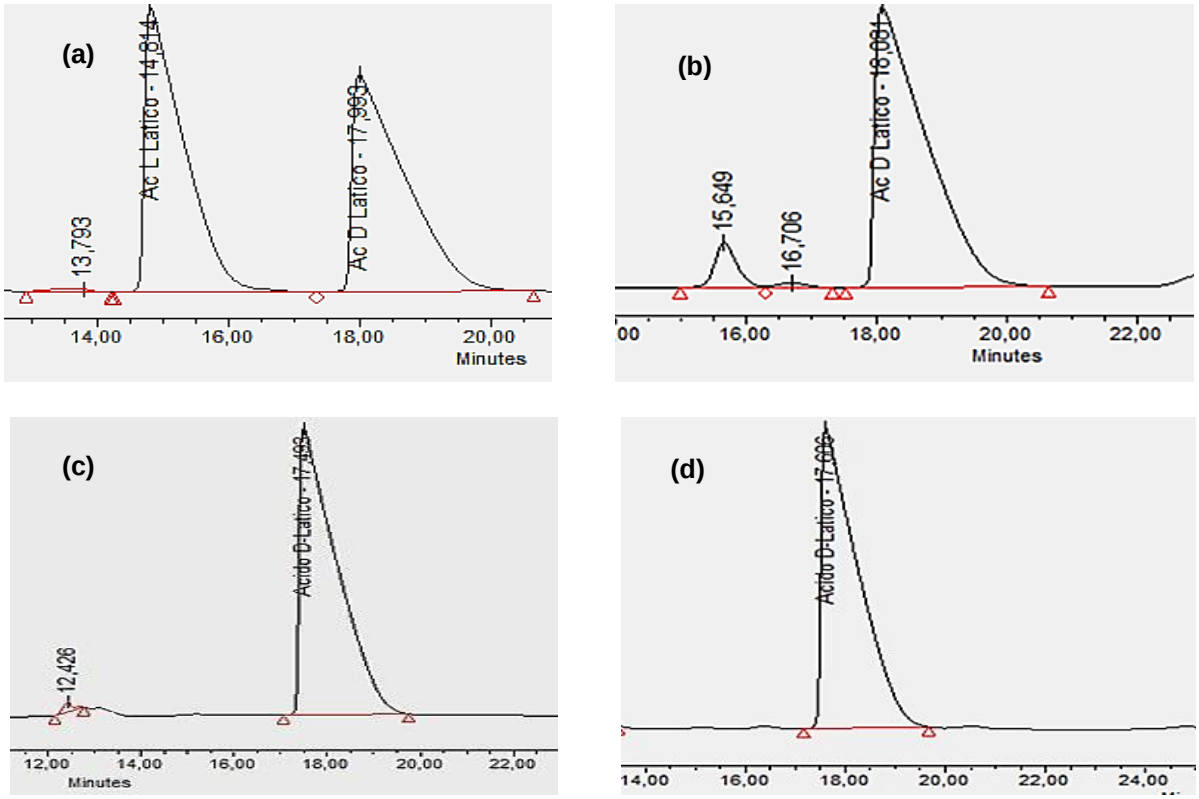

Figura 5.2. Identificação do isômero óptico produzido por as linhagens avaliadas. *(a) Lactobacillus helveticus, (b) Lactobacillus delbrueckii lactis, (c) Lactobacillus coryniformis torquens, (d) Lactobacillus coryniformis coryniformis.*

Tendo em vista os resultados desta série de experimentos, apresentaram a espécie *Lactobacillus coryniformis* como a mais promissora para produção de ácido D(-) lático e selecionou-se a linhagem *Lactobacillus coryniformis torquens* pela sua maior tolerância á presencia de oxigênio com uma redução de 3 g/L de ácido D(-) lático, para se dar continuidade ao trabalho.

5.2. Morfologia das linhagens de *Lactobacillus*

Como complemento dos ensaios anteriores, procedeu-se a verificação da pureza das linhagens através de microscopia óptica. A Figura 5.3 apresenta microfotografias de células de *Lactobacillus*, mediante o uso da técnica coloração diferencial de Gram. Através da coloração roxa foi possível confirmar as características do tipo Gram (+) e pureza para as quatro linhagens avaliadas.

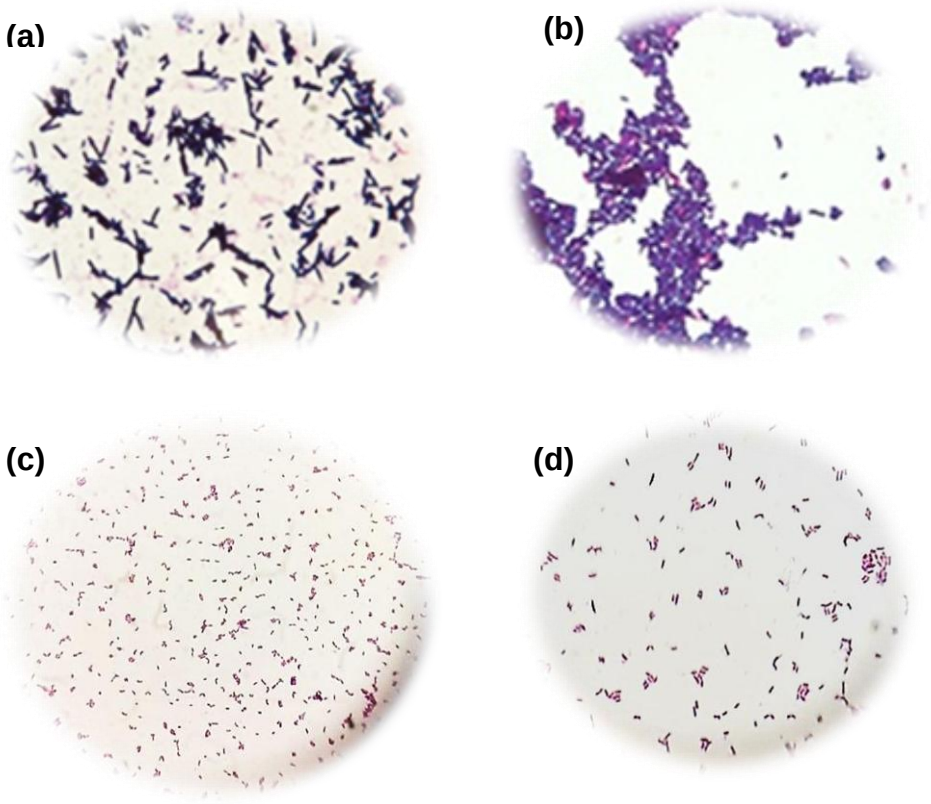

Figura 5.3. Observação microscópica das linhagens com aumento de 1000 vezes. (a) *Lactobacillus delbrueckii lactis, (b) Lactobacillus helveticus, (c) Lactobacillus coryniformis torquens, (d) Lactobacillus coryniformis coryniformis*

5.3. Padronização da metodologia para ativação celular e preparo de inóculo em meio sintético MRS

Com o objetivo de se padronizar o tempo utilizado em cada uma das etapas de propagação celular (ativação e preparo de inóculo) foi realizado o monitoramento das principais variáveis do processo relacionadas ao crescimento celular e ao consumo de glicose.

5.3.1. Cultivo de ativação em meio sintético MRS

Os ensaios para obtenção de células viáveis (pré-inóculo) foram realizados em meio sintético MRS *standard,* para cultivos com agitação mecânica e estático. A concentração da fonte de carbono (glicose) e de biomassa bacteriana foram analisadas e os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 5.4. Por intermédio desta figura, é possível constatar que o crescimento celular cessa com 13 horas de cultivo de ativação, embora com uma redução percentual de substrato de apenas 39%. As células cresceram exponencialmente com uma taxa específica de crescimento de 0,374 h^{-1}, o que corresponde a um tempo de duplicação da massa celular de 1,85 h. Para se garantir um inóculo ativo com adequado estado metabólico para a etapa de propagação de células, foi escolhido o tempo de 7 horas (aproximadamente na metade da fase exponencial) para se coletarem as células destinadas ao preparo do inóculo da linhagem de *Lactobacillus coryniformis torquens.*

Com este ensaio foi possível também prescindir de agitação mecânica no cultivo de ativação, o que traz implicações de natureza tecnológica, já que os custos operacionais com esta operação podem impactar negativamente a economicidade do processo.

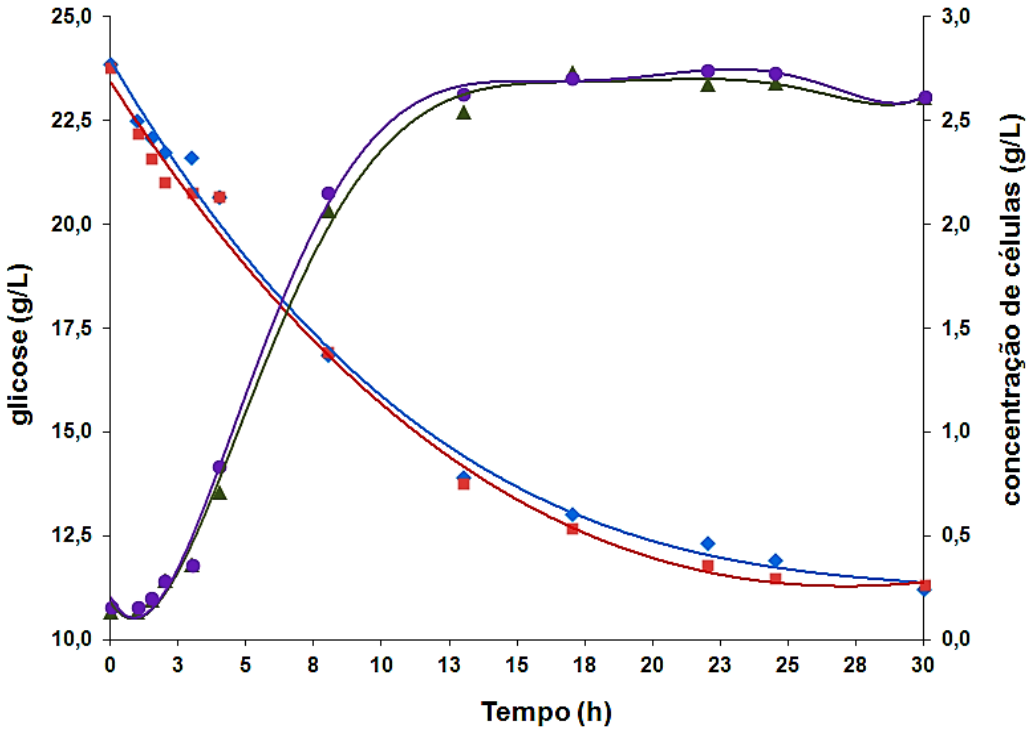

Figura 5.4. Cinética de crescimento do cultivo de ativação da bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* ATCC 25600 em meio MRS Standard, contendo glicose como fonte de carbono ◆Consumo de glicose 0 rpm; ■ Consumo de glicose 120 rpm; ▲Biomassa bacteriana gerada 0 rpm; ●Biomassa bacteriana gerada 120 rpm

5.3.2. Cultivo de crescimento para obtenção do inóculo

As células ativadas, nas condições descritas anteriormente, foram utilizadas para a obtenção do inóculo da linhagem selecionada. O mesmo meio MRS standard utilizado no cultivo de ativação foi empregado no cultivo de propagação da biomassa bacteriana e os ensaios foram conduzidos em meio agitado mecanicamente e em condições estáticas (Figura 5.5), por intermédio desta figura, é possível constatar que o crescimento celular cessa com 11 horas de cultivo. Novamente, constata-se a não necessidade de agitação mecânica, tendo em vista a superposição das curvas de crescimento celular e consumo de glicose em ambas as condições. Como as células bacterianas já haviam sido expostas ao meio de cultivo MRS, o valor da taxa específica de crescimento foi maior (0,449 h^{-1}) do que no cultivo de ativação. Observa-se mais uma vez que o substrato não foi integralmente consumido, resultando em uma redução percentual de substrato de 43%.

Tanto no cultivo de ativação quanto no de preparo do inóculo, o não consumo total de substrato deve-se, seguramente, a falta de controle do pH, já que os cultivos foram realizados em frascos de penicilina, sem adição de agente neutralizante para permitir o quantificação de células e manter a condição de anaerobiose.

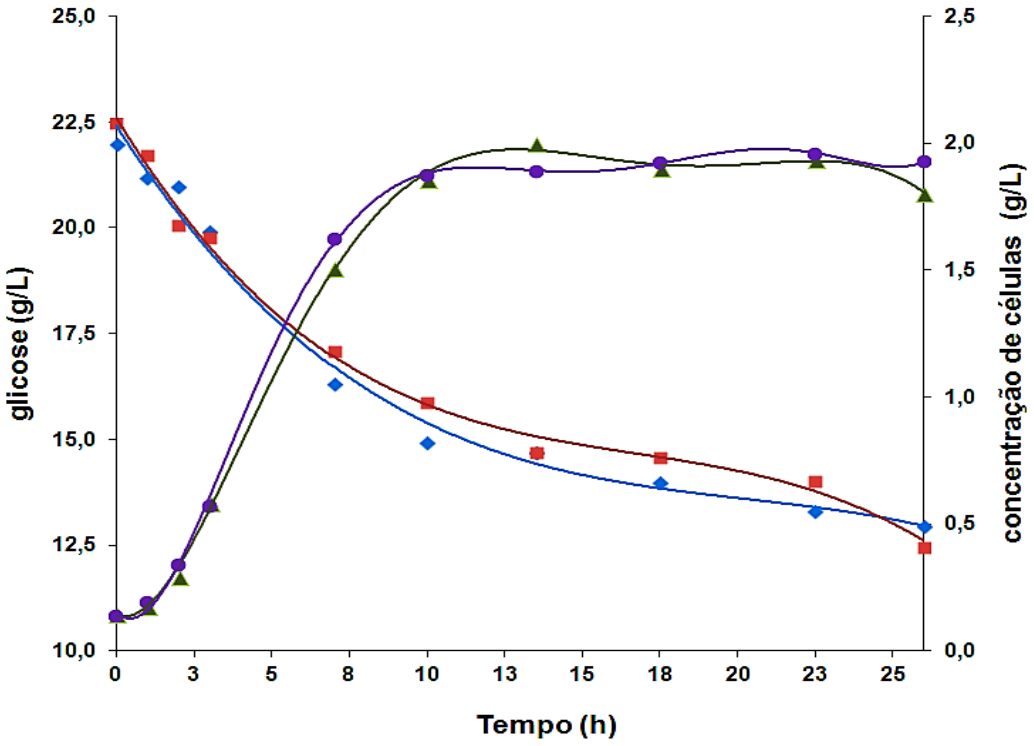

Figura 5.5. Cinética de crescimento do cultivo de propagação da bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* ATCC 25600 em meio MRS Standard, contendo glicose como fonte de carbono ◆Consumo de glicose 0 rpm; ■ Consumo de glicose 120 rpm; ▲Biomassa bacteriana gerada 0 rpm; ●Biomassa bacteriana gerada 120 rpm

5.4. Ensaios de fermentação com e sem agente de neutralização para o controle da acidez do meio

O efeito da redução do pH foi avaliado mediante ensaios comparativos em frascos agitados com e sem adição de $CaCO_3$, permitindo observar o efeito no consumo de substrato devido ao não neutralização do meio fermentado. a medida que o ácido lático era formado. O carbonato de cálcio foi utilizado como agente neutralizante por ser uma base fraca, que não afeita às características do meio de fermentação e sua ação só acontece na medida em que o ácido D(-) lático seja produzido. Nas Figuras 5.6 e 5.7 estão apresentados os perfis cinéticos de

fermentação com a linhagem *Lactobacillus coryniformis torquens* para as duas condições avaliadas.

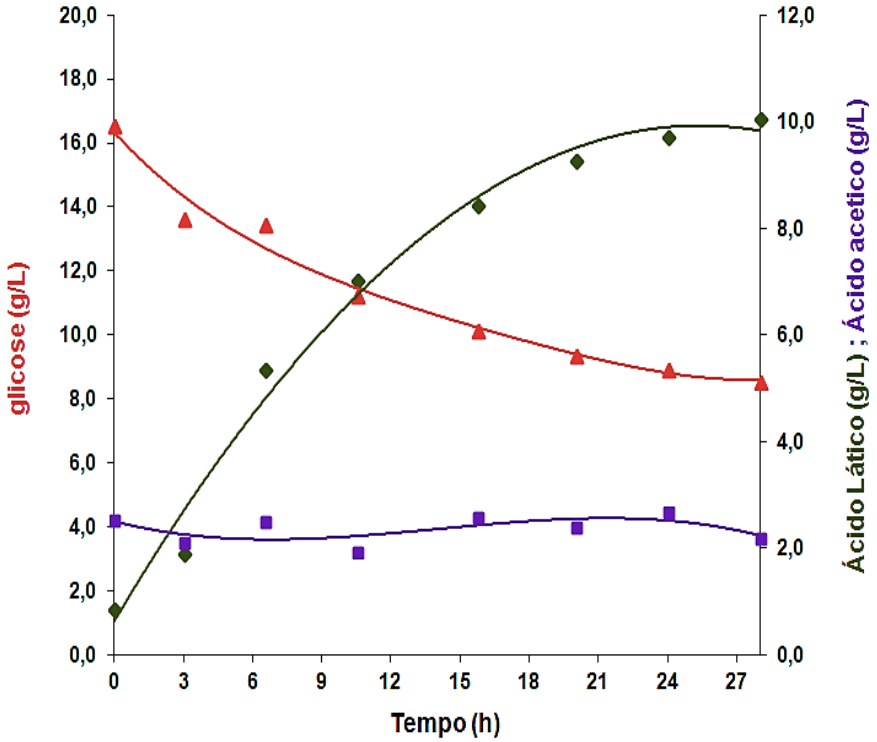

Figura 5.6. Fermentação sem controle de pH em meio MRS; pH inicial= 6,5; pH final= 3,0

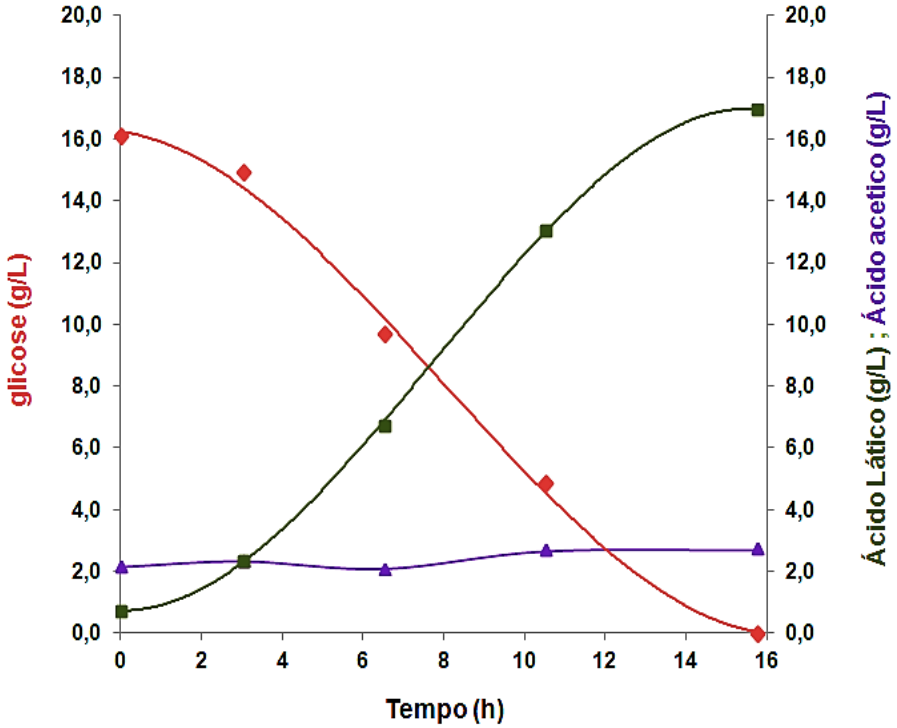

Figura 5.7. Fermentação com controle de pH em meio MRS; pH inicial= 6,5; pH final= 6,0

A comparação das duas figuras mostra a importância da neutralização do meio em fermentação para que o substrato seja consumido totalmente pela bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens*. Na ausência do agente neutralizante, o pH do meio de fermentação apresentou uma queda de 6,5 até aproximadamente 3,0, com redução percentual do substrato de 48,3%, enquanto que no meio adicionado de $CaCO_3$ o substrato foi consumido integralmente com um pH final em torno de 6,0. Os valores máximos da concentração de ácido D(-) lático foram de 10,0 g/L e de 16,8 g/L para os ensaios sem e com agente neutralizante, respectivamente. A estratégia de se neutralizar o meio teve também impacto na taxa global de produção (produtividade volumétrica), que aumentou de 0,370 g/L.h para 1,05 g/L.h, quando o meio foi neutralizado a medida que o ácido era formado.

De acordo com Wee (2006), isso se deve ao fato de que, normalmente, a bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* apresenta uma forte sensibilidade em ambientes com redução nos valores de pH, sendo seu metabolismo fortemente inibido pela variação do potencial redox. O autor considera ainda que, com a queda de acidez, ocorre a passagem das moléculas não associadas de ácido lático, através da membrana celular, fazendo com que o citoplasma se acidifique. Esse fenômeno afeta diretamente o gradiente de pH da membrana, diminuindo consideravelmente a energia direcionada para o crescimento celular e resultando em uma queda na produção final de ácido lático.

Adicionalmente, de acordo com a literatura o lactato de cálcio, produto resultante da neutralização pode também inibir o crescimento de algumas bactérias Gram-positivas (NAKANO, UGWU e TOKIWA, 2012). Entanto, a presença deste agente neutralizante em uma concentração de 5% m/m não afeta o metabolismo celular da bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens,* conforme pode ser observado na Figura 5.7, onde a concentração do ácido D(-) lático aumentou rapidamente com uma taxa estequiometricamente definida e simples em relação ao consumo total de glicose como fonte de carbono.

5.5. Avaliação da capacidade de consumo de xilose pela linhagem selecionada de *Lactobacillus coryniformis torquens*

Experimentos foram desenvolvidos para se verificar o comportamento da linhagem selecionada face à sua capacidade de consumo de xilose em duas concentrações iniciais (14,1 g/L e 29,5 g/L) e na presença de glicose também em duas concentrações iniciais (14,8g/L e 3,0 g/L). Observa-se nas duas condições (Figura 5.8 a e b) a inabilidade da bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* em consumir xilose. Há um consumo discreto desta pentose, o que provavelmente se deve à sua absorção por transportadores de glicose.

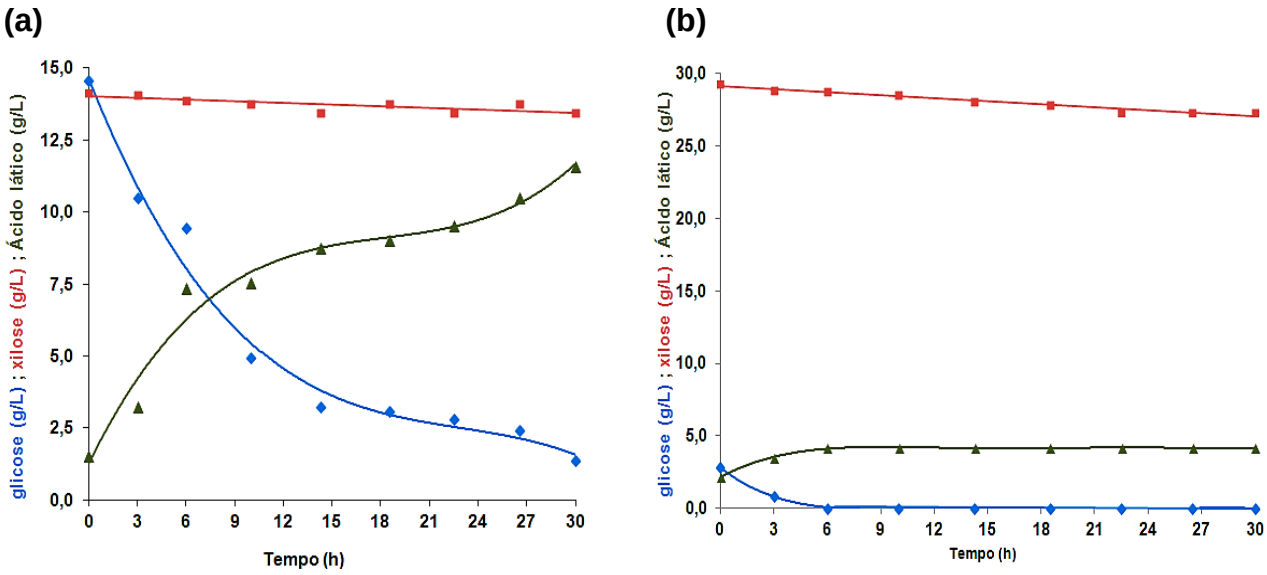

Figura 5.8. Avaliação da capacidade de *Lactobacillus coryniformis torquens* em consumir xilose em meio MRS, (a) relação de glicose- xilose em torno de 50% como fonte de carbono; (b) xilose como principal fonte de carbono.

Castillo *et al* (2013) sinalizam que em condições distantes do ótimo fisiológico celular, como no caso de uma limitação nutricional e/ou presença de outros substratos como fontes de carbono diferentes da glicose, alguns micro-organismos homofermentativos podem produzir o ácido fórmico pela ação da enzima piruvato formato liase. LIU *et al.* (2008) reportaram que formato de sódio exerce inibição mediante interferências na membrana transportadora de fosfato.

Na Figura 5.9 se apresenta o crescimento celular depois de 30 horas de processo de forma comparativa para meio de fermentação contento como fonte de

carbono: (1) glicose, (2) uma relação aproximada glicose/xilose (50/50), (3) xilose como fonte principal, para os tres experimentos iniciou-se com uma concentração inicial de celulas em torno de 0,14 g/L, observou-se crescimento celular nos meios contendo glicose como fonte de carbono, para o caso da xilose como fonte de carbono não aprensentou-se crescimento significativo como consequencia da inabilidade de consumo da pentose, o crescimento discreto obvervado foi resultado do consumo de glicose residual prevenente do inóculo.

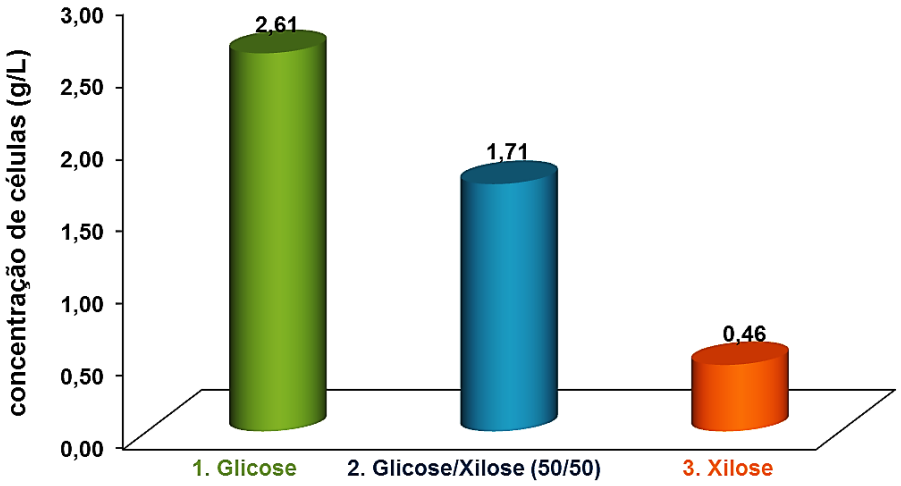

Figura 5.9. Produção de biomassa com meio MRS tendo como fonte de carbono: glicose, relação de glicose- xilose em torno de 50% e xilose.

No entanto, mesmo que bactéria não tenha sido capaz de assimilar xilose, a presença desta pentose parece não ter inibido o crescimento celular nem tampouco a produção de ácido lático, alem de não apresentar formação de ácido fórmico resultando uma caracteristica positiva da bacteria.

5.6. Seleção de componentes do meio sintético com maior influência no processo fermentativo.

O planejamento Plackett & Burman (PB), também conhecido como planejamento não geométrico, é um planejamento de "*screening*" ou de seleção de variáveis, permitindo estabelecer uma relação entre as variáveis de estudo e a variável resposta. O PB é um planejamento ortogonal utilizado quando o número de variáveis independentes a serem usadas é elevado e se pretende racionalizar os

experimentos a serem realizados, reduzindo-os em números (PLACKETT & BURMAN, 1946).

Na tabela 5.3 são apresentados os resultados de produção de ácido D(-)lático de acordo com o planejamento experimental desenvolvido para avaliação dos componenentes do meio sintético MRS em um intervalo de confiança de 90% (p<0,1), o que permitiu a seleção dos componentes com maior significância estatística para se dar prosseguimento a etapa de otimização da composição do meio de fermentação. Os valores de produção de ácido D(-) lático variaram de 3,65 g/L (experimento 5, onde todos os componentes do meio se encontravam na concentração mínima) a 13,23 g/L (experimento 6, no qual os componentes se encontravam no ponto central).

A partir dos resultados obtidos no PB foi gerado o Diagrama de Pareto (Figura 5.11), no qual se observou que as variáveis que apresentaram maior significância estatística sobre a produção de ácido D(-) lático foram, de acordo com a ordem hierárquica de influências: o acetato de sódio, o extrato de carne, o fosfato dipotássico e o extrato de levedura. Contrariamente, o citrato de amônio apresentou um efeito negativo e significativo, justificando a sua retirada nos experimentos posteriores, envolvendo o DCCR.

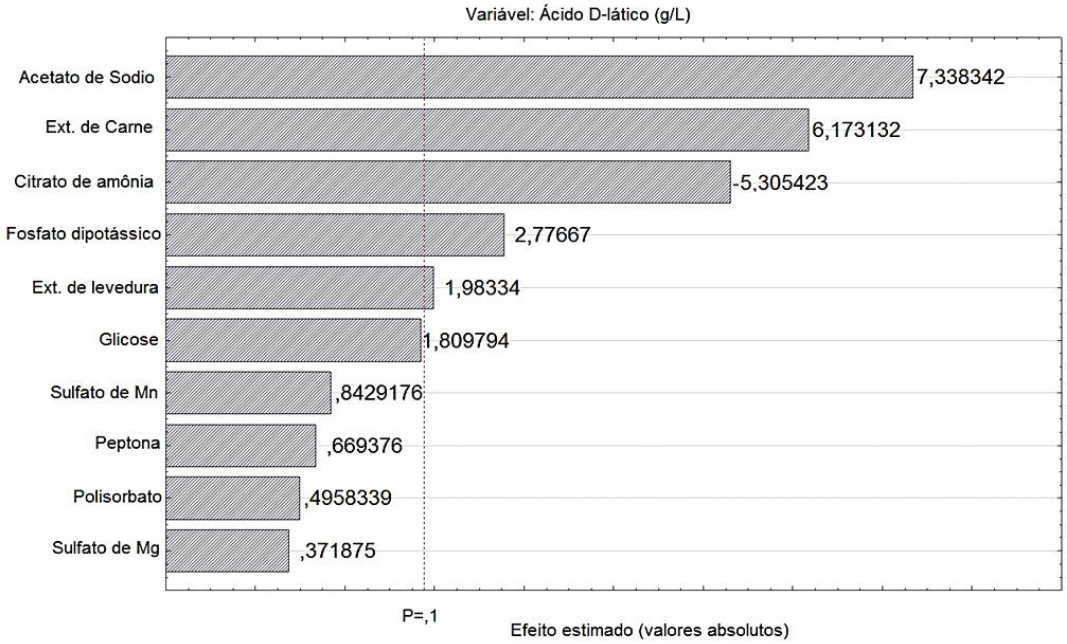

Figura 5.10. Diagrama de Pareto para planejamento PB

Tabela 5.3. Planejamento Plackett-Burman para avaliação dos componentes do meio sintético MRS

Ensaio	Peptona	Ext. de carne	Ext. de levedura	Glicose	Polisorbato	Citrato de amônio	Acetato de sódio	Sulfato de Mn	Sulfato de Mg	Fosfato dipotássico	Ácido D(-) lático (g/L)
1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	9,74
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	9,81
3	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	7,75
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	12,46
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3,65
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**13,23**
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	10,55
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	12,70
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	6,96
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**11,51**
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	4,24
12	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	8,13
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**10,77**
14	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	5,75
15	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	5,45

Nota: os valores apresentados correspondem ao tempo de 24 hr para todos os experimentos

O extrato de carne apresentou elevada significância estatística, já que é uma fonte de nitrogênio complexa, contribuindo para reduzir o tempo de produção, refletindo positivamente nos valores de produtividade (CHAUHAN *et al.,* 2007). Apesar de apresentar um custo econômico considerável, o extrato de carne contém vitaminas, sais minerais diversos e outros elementos traços como o magnésio, zinco e selênio, que suprem uma série de requerimentos nutricionais microbianos. De acordo com Wee (2006), as bactérias do gênero *Lactobacillus* possuem essas necessidades nutricionais complexas, devido à habilidade biossintética limitada.

Mesmo tendo influência menor do que o extrato de carne, o extrato de levedura foi também incluído na seleção de componentes, como fonte de nitrogênio e vitaminas do complexo B (B1, B2, B6) e aminoácidos. Quando comparado com a peptona, o extrato de levedura representa um insumo de baixo custo para o bioprocesso, já que pode ser produzido a partir de leveduras residuais de diferentes segmentos industriais (sucro-alcooleiro e cervejeiro). Adicionalmente, a peptona não mostrou uma importância significativa para produção de acido lático, diferentemente do que foi reportado para as linhagens de *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 e *Lactobacillus sp. KCP01* (KISHOR, TRIVEDI &PATEL, 2007). No âmbito do presente trabalho esta não influência da peptona, seguramente, irá favorecer economicamente o processo de produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens.*

O acetato de sódio apresentou elevada significância estatística, contribuindo para o crescimento celular e para a produção de acido lático, assim como o fosfato dipotássico, sendo ambos selecionados para o posterior planejamento experimental. Alguns componentes do meio ($MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$) foram excluídos, uma vez que não foram variáveis significativas no processo. Tais elementos servem como cofatores e provavelmente já se encontravam em concentrações requeridas no extrato de carne e de levedura. O polissorbato foi também excluído por ter apresentado de forma análoga ao citrato de amônio um efeito negativo e pouco significativo na produção de ácido lático.

No caso da glicose, como não houve o controle do pH durante a execução dos experimentos envolvidos no PB, gerando um consumo parcial dessa fonte de carbono, o Diagrama de Pareto indicou a glicose com mediana importância significativa na faixa avaliada. Em decorrência da queda de pH, uma quantidade de glicose residual geralmente é encontrada ao final do processo fermentativo para obtenção do ácido lático, devido a efeitos de inibição sobre o crescimento celular ocasionados pelo ambiente gerado pelo ácido, provocando inibição do metabolismo celular, como mencionado anteriormente (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000; ABDEL *et al.,* 2011). De qualquer forma, nos experimentos seguintes envolvendo DCCR a concentração de glicose foi estabelecida em 20,0 g/L, dada sua essencial importância para o crescimento microbiano e conversão em ácido lático.

5.7. Planejamento Delineamento Composto Central Rotacional

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma metodologia utilizada em estudos de otimização de processos, cujo objetivo é desenvolver um modelo empírico para o processo estudado e obter respostas com maior precisão na determinação de condições ótimas (BRUNS, 1995). O planejamento DCCR permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se assim a análise de uma variável, sujeita a todas as combinações das demais.

Conforme discutido anteriormente, o planejamento PB desenvolvido como ferramenta para "*screening"* levou à escolha do extrato de carne, extrato de levedura, acetato de sódio e fosfato dipotássico como componentes que tiveram maior significância estatística e, desta forma, foram selecionados para avaliação mediante um planejamento mais completo, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização do meio (tabela 5.4). O modelo obtido foi validado em frascos agitados e, posteriormente, otimizado com ajuda da ferramenta Design-Expert 7.0, na qual o aumento da produção de ácido D(-) lático foi definido como o critério de maior peso estatístico, tendo em vista a maior redução possível na concentração dos componentes do meio de fermentação.

Tabela 5.4. Variáveis analisadas e respectivos níveis codificados e reais do planejamento DCCR para uma concentração de glicose inicial igual a 20 g/L

Variáveis (g/L)	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
Extrato de carne	0,25	3,5	6,75	10,0	13,25
Extrato de levedura	0,05	1,7	3,35	5,0	6,65
Acetato de sódio	0,05	1,7	3,35	5,0	6,65
Fosfato dipotássico	0,05	0,7	1,35	2,0	2,65

A tabela 5.5 apresenta a matriz do planejamento (27 experimentos e 3 pontos centrais) juntamente às respostas, cuja variação observada foi de 7,06 g/L (experimento 11) a 12,29 g/L (experimento 12) de ácido lático. Todos os experimentos foram realizados em condições de anaerobiose pela injeção de N_2, com temperatura de 37ºC, agitação de 120 rpm, inóculo 10% (v/v) e adição de $CaCO_3$ (5% g/g) como agente neutralizante, durante 13 horas de fermentação.

Tabela 5.5. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização dos componentes do meio de fermentação contendo glicose como fonte de carbono.

Experimento	Ext. carne	Ext. levedura	Acetato de sódio	Fosfato dipotássico	Ácido D(-) lático (g/L)
1	0	0	-2	0	11,30
2	0	0	0	0	10,82
3	-1	1	1	-1	10,12
4	0	0	0	0	9,84
5	1	-1	1	1	11,42
6	0	0	2	0	10,85
7	-1	-1	-1	-1	8,42
8	0	0	0	-2	8,67
9	1	1	-1	1	11,92
10	0	0	0	0	10,28
11	-1	-1	1	-1	7,06
12	0	2	0	0	12,29
13	2	0	0	0	11,42
14	0	-2	0	0	8,69
15	1	1	1	-1	10,92
16	0	0	0	0	10,59

17	-1	1	-1	1	11,92
18	0	0	0	0	10,99
19	1	1	1	1	12,17
20	0	0	0	0	10,88
21	-1	1	-1	-1	10,34
22	-1	-1	1	1	10,45
23	1	-1	-1	1	9,62
24	1	1	-1	-1	11,19
25	0	0	0	2	10,90
26	-1	1	1	1	10,56
27	1	-1	-1	-1	9,27
28	-1	-1	-1	1	10,35
29	-2	0	0	0	9,26
30	1	-1	1	-1	9,16

A partir dos resultados obtidos foi gerado o Diagrama de Pareto (Figura 5.11), em um intervalo de confiança de 95% (p<0,05), no qual se observou que as variáveis com maior significância estatística na produção de ácido D(-) lático foram: o extrato de carne, o extrato de levedura e o acetato de sódio. O fosfato dipotássico como variável individual não apresentou significância estatística, mas foi mantido em concentração mínima por estabelecer uma leve interação com o acetato de sódio (1Lby3L).

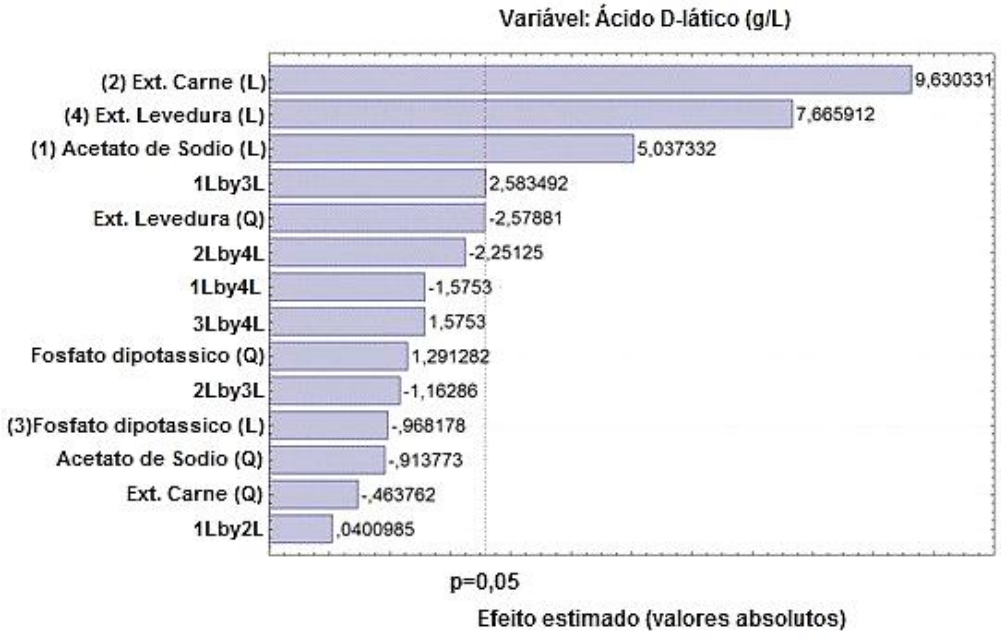

Figura 5.11. Diagrama de Pareto para Planejamento DCCR

A Tabela 5.6 apresenta os parâmetros estatísticos indicando a validade dos resultados, além de mostrar que o modelo mais adequado para o ajuste dos fatores foi o Modelo Quadrático Reduzido, com altos valores de R^2, indicando a confiabilidade da resposta. O modelo obtido pela análise estatística da fermentação realizada por *Lactobacillus coryniformis torquens* é representado pela equação ajustada (1), que representa a concentração de ácido D(-) lático (g/L), com os valores dos componentes em g/L.

Tabela 5.6. Análise de variância (ANOVA) para concentração de ácido D(-) lático no delineamento composto central rotacional (DCCR), para glicose como fonte de carbono

Efeito	SM	DF	QM	F valor	p valor
(1) Acetato de sódio (L)	4,83304	1	4,83304	25,37472	0,003976
Acetato de sódio (Q)	0,15904	1	0,15904	0,83498	0,402749
(2) Ext. de carne (L)	17,66450	1	17,6645	92,74328	0,000205
Ext. de carne (Q)	0,04096	1	0,04096	0,21507	0,662308
(3) Fosfato dipotássico (L)	0,17854	1	0,17854	0,93737	0,377422
Fosfato dipotássico (Q)	0,31759	1	0,31759	1,66741	0,253078
(4) Ext. de levedura (L)	11,19300	1	11,193	58,76621	0,000602
Ext. de levedura (Q)	1,26666	1	1,26666	6,65028	0,049503
1L by 2L	0,00031	1	0,00031	0,00161	0,969566
1L by 3L	1,27126	1	0,127126	6,67443	0,049223
1L by 4L	0,47266	1	0,47266	2,48157	0,176006
2L by 3L	0,25756	1	0,25756	1,35224	0,297365
2L by 4L	0,96531	1	0,96531	5,06811	0,074161
3L by 4L	0,47266	1	0,47266	2,48157	0,176006
Lack of Fit	0,23221	10	0,232212	1,21918	0,437731
Pure Error	0,19047	5	0,95233		
Cor Total		29	42,50707		

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 < 0,05)

$$[\text{Ác. D(-) lático}] = +10{,}56 + 0{,}45*A + 0.86*B - 0{,}09*C + 0.68*D + 0.28*AC + 0.21*D^2 \quad \textbf{(equação 1)}$$

Onde, A=acetato de sódio, B=extrato de carne, C=fosfato dipotássico e D=extrato de levedura.

O análise de ANOVA para o Modelo Quadrático Reduzido é apresenta na tabela 5.7, onde o valor de *Fisher* indica um amplo grau de sinergismo entre os nutrientes durante a fermentação por *Lactobacillus coryniformis torquens*, resultando em variações na concentração de ácido lático, dependendo das concentrações de nutrientes utilizadas no meio, sugerindo uma interação positiva bastante relevante entre o extrato de carne e extrato de levedura.

Tabela 5.7. Análise de variância (ANOVA) para o Modelo Quadrático Reduzido

Efeito	SM	DF	QM	F valor	Prob >F
Modelo	36,48	6	6,08	23,16	<0,0001
(1) Acetato de sódio (L)	4,86	1	4,83	18,38	0,0003
(2) Ext. de carne (L)	17,68	1	17,68	67,35	<0,0001
(3) Fosfato dipotássico (L)	0,18	1	0,18	0,68	0,4192
(4) Ext. de levedura (L)	11,19	1	11,19	42,64	<0,0001
1L by 3L	1,28	1	1,28	4,89	0,0373
Ext. de levedura (Q)	1,32	1	1,32	5,02	0,0349
Residual	6,04	23	0,26		
Lack of Fit	5,09	18	0,28	1,49	0,3489
Pure Error	0,95	5	0,19		
Cor Total	42,51	29			
[Ácido D(-) lático]: [R-Squared = 0.8580, Adj R-Squared = 0.8209]					

SQ: Soma Quadrática (Sum of Squares); MQ: Média Quadrática (Mean square);
F= Fisher Calculado; *p* >F= Probabilidade de Fisher.

A superfície de resposta apresentada na Figura 5.12 mostra a produção de ácido D(-) lático, mantendo fixas as concentrações de acetato de sódio e fosfato dipotássico nos pontos centrais, e variando-se as concentrações de extrato de carne e extrato de levedura. Aumentando-se as concentrações de extrato de carne e extrato de levedura, obtém-se melhores resultados de produção, confirmando o maior efeito positivo, embora altas concentrações desses componentes podem interferir no processo fermentativo devido a problemas de solubilidade. Adicionalmente, altas concentrações de nutrientes representam altos custos de produção, sendo necessário manter suas concentrações baixas, sem, entretanto, comprometer o desempenho do micro-organismo, a fim de se viabilizar economicamente o processo.

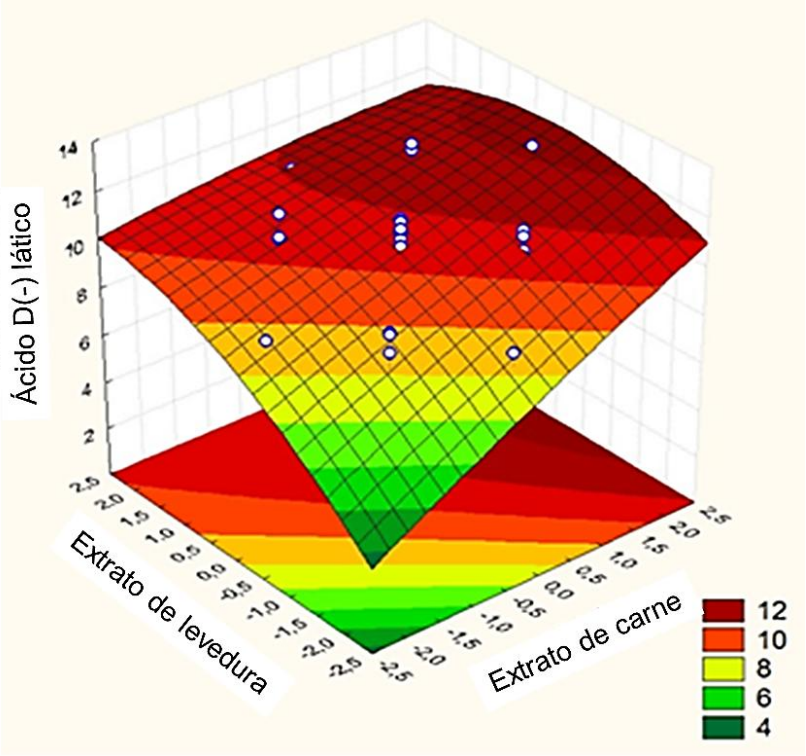

Figura 5.12. Produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens* em função da concentração de extrato de carne e extrato de levedura.

A Figura 5.13 mostra a produção de ácido D(-) lático, mantendo fixas as concentrações de fosfato dipotássico e extrato de levedura nos pontos centrais, e variando-se as concentrações de extrato de carne e acetato de sódio. Aumentando-se a concentrações de extrato de carne obtém-se melhores resultados de produção de ácido e o aumento da concentração de acetato de sódio gera um ligeiro aumento na produção do produto alvo desta dissertação, tendo um efeito positivo pouco significativo.

Como pode ser observado na figura 5.14, mantendo-se fixas as concentrações de acetato de sódio e extrato de levedura nos pontos centrais e aumentando-se a concentrações de extrato de levedura obtém-se melhores resultados de produção de ácido D(-) lático, ao passo que a elevação da concentração de fosfato dipotássico não aumenta consideravelmente na produção de ácido D(-) lático, apresentando então um efeito reduzido como variável independente, como já havia sido sinalizado na Tabela ANOVA para o Delineamento Composto Central Rotacional.

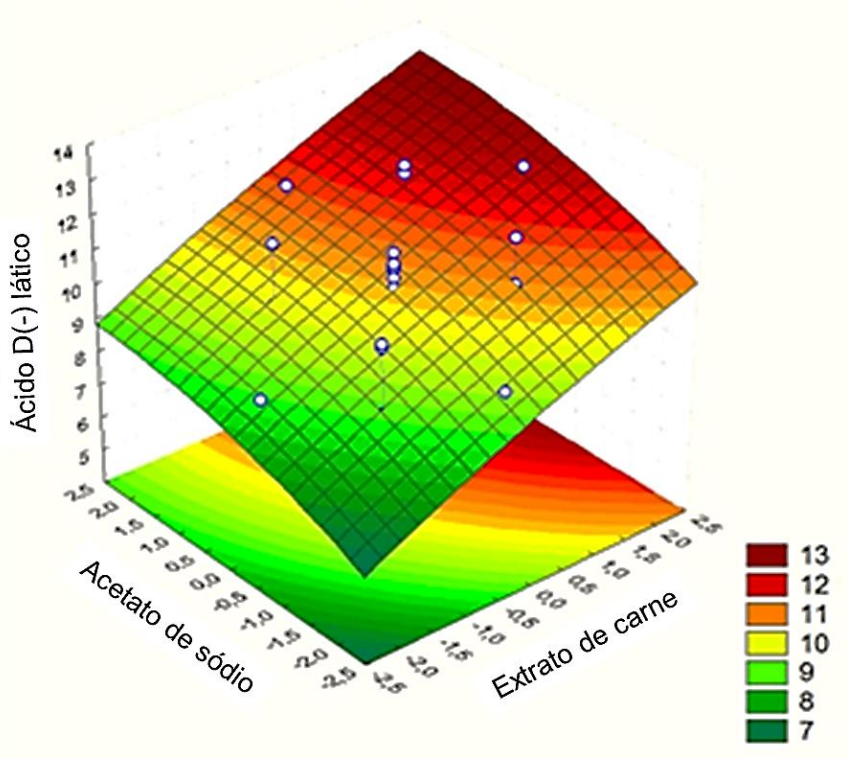

Figura 5.13. Produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens* em função da concentração de extrato de carne e acetato de sódio.

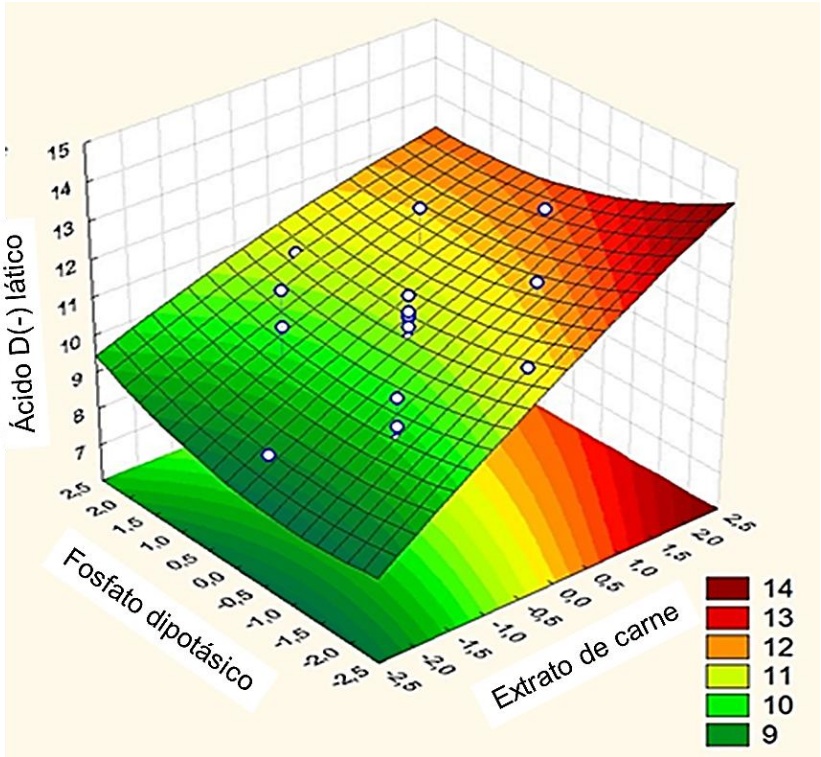

Figura 5.14. Produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens* em função da concentração de fosfato dipotássico e extrato de carne.

5.7.1. Validação do modelo otimizado em frascos agitados

Do ponto de vista técnico-econômico, o Modelo Quadrático Reduzido obtido do planejamento DCCR foi otimizado com ajuda da ferramenta *Design-Expert* 7.0, mantendo como critério de maior peso estatístico o aumento da produção de ácido D(-) lático e redução da concentração dos componentes do meio de fermentação, principalmente do extrato de carne, devido ao seu valor comercial. Os critérios usados e os resultados preditos para a otimização são apresentados na tabela 5.8, onde a composição para o meio otimizado foi: 2,3 g/L para o extrato de carne; 3,58 g/L para o extrato de levedura; 0,05 g/L para o acetato de sódio e 0,05 g/L para o fosfato dipotássico, com um coeficiente *Desirability* de 0,693. Desta forma, foi possível atender em torno de 70% às necessidades conjuntas de produção de ácido lático com redução dos custos associados ao meio de fermentação, especialmente ligados à concentração do extrato de carne.

Tabela 5.8. Condições de otimização para meio de fermentação

Efeito	Critério	Limite inferior	Limite superior	Importância
(1) Acetato de sódio	Minimizar	-2	2	2
(2) Ext. de carne	Minimizar	-2	2	**5**
(3) Fosfato dipotássico	Minimizar	-2	2	2
(4) Ext. de levedura	Minimizar	-2	2	3
Ácido D(-) lático	Maximizar	7,06312	12,2876	**5**
Otimização Desirability 0,693	**Valor codificado**	**Valor Real (g/L)**		
(1) Acetato de sódio	-2	**0,05**		
(2) Ext. de carne	-1,37	**2,3**		
(3) Fosfato dipotássico	-2	**0,05**		
(4) Ext. de levedura	0,14	**3,58**		
Resposta	**Predição**	**SE Pred**	**95% PI low**	**95%PI High**
Ácido D(-) lático (g/L)	**9,887**	0,8	8,22	11,55

Para validação do meio sintético otimizado foi desenvolvido um ensaio em frasco, conduzido em triplicata com as mesmas condições adotadas no decorrer do DCCR (condição de anaerobiose pela injeção de N_2, temperatura de 37ºC, agitação de 120 rpm, inoculo 10% (v/v), adição de $CaCO_3$ (5% g/g), com um tempo de

fermentação de 13 horas). O resultado obtido para produção de ácido D(-) lático foi de 10,72 g/L, encontrando-se dentro da faixa predita pelo modelo e configurando validade estatística.

O meio resultante nestes ensaios mostrara-se mais promissorio do que alguns reportados na literatura. Lopes (2010) modificou o meio MRS, tendo chegado a seguinte composição (g/L): glicose 20; peptona 10; extrato de levedura 4; extrato de carne 8; citrato de amônio 2 e acetato de sódio 5, tendo resultado numa produção de ácido lático de 15,3 g/L por *Lactobacillus delbrueckii*. Ressalta-se que as concentrações utilzadas no trabalho de Lopes foram muito superiores àquelas resultantes de estudos de planejamento experimental reportados na pressente dissertação. Verificou-se, ainda, notória diferença, em termos de produtividade volumétrica (g/L.h), de 0,21 para 0,82, atingidas no estudo desenvolvido por Lopes (2010) e o presente trabalho, respectivamente. Assim, o meio otimizado se encontra dentro das características normalmente desejadas pela indústria acerca da formulação de meios simplificados e menos onerossos

Os resultados obtidos com as variáveis e valores significativamente favoráveis à produção de ácido D(-) lático, segundo os experimentos conduzidos anteriormente em frascos agitados, foram validados em biorreator está descrito na seção que se segue.

5.8. Ensaios experimentais em Biorreator

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em biorreator intrumentado com meio sintético complexo (MRS standard) e posteriores aos estudos de otimização, com meio sintetico otimizado (compisição simples), tendo como variáveis de resposta a concentração final de ácido D(-) lático, produtividade volumétrica (Qp), rendimento em produto ($Y_{P/S}$) e eficência de conversão em produto (Ef), de acordo com o tempo para o esgotamento do substrato. As concentrações iniciais de glicose adotadas para a condução dos exerimentos ficaram em torno de 30 g/L para não conferir efeito inibitório ao micro-organismoinibiçao pelo sustrato. Os ensaios foram desenvolvidos em condições de anaerobiose, descritas em Materiais e Métodos.

5.8.1. Ensaio em Biorreator com meio sintético MRS

A figura 5.15 apresenta o perfil cinético da fermentação lática em meio sintético rico em nutrientes (MRS), com as concentrações preliminares de componentes, concentrações anteriores aos estudos de otimização da composição do meio de fermentação. O ensaio foi realizado com um tempo de 17 horas de fermentação, tendo a glicose sido consumida totalmente em um tempo de aproximadamente 12 horas. A concentração final de ácido D(-) lático foi de 29,0 g/L, resultando em fator de rendimento em produto por substrato consumido, $Y_{P/S}$, de 0,95 g/g, uma produtividade volumétrica, Q_P, igual a 2,36 g/L.h e uma eficiência de fermentação de 95%.

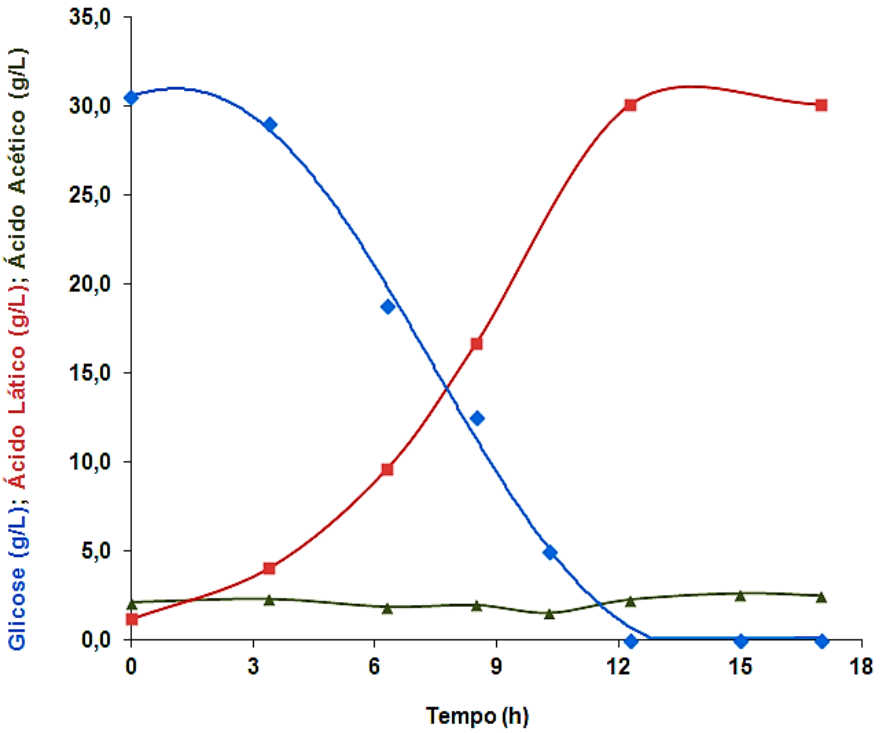

Figura 5.15. Fermentação em biorreator com meio sintético MRS complexo por *Lactobacillus coryniformis.*

O alto valor de produtividade indica a execução de um processo fermentativo rápido, como consequência da riqueza de nutrientes. Isso associado ao adequado controle de pH, contribui para alcançar valores de eficiência próximos ao 100%, uma vez que a inibição que ocorreria pela formação do produto se mantém numa faixa sub-inibitória, promovendo o bom andamento do processo (CASTILLO *et al.*, 2013).

5.8.2. Ensaio em Biorreator com meio sintético otimizado

O perfil cinético da fermentação para a obtenção de ácido D(-) lático em meio sintético otimizado (composição simplificada), após os estudos de otimizacão, é apresentado Figura 5.16. O tempo total do cultivo foi de 48 horas, mas o substrato foi totalmente consumido em um tempo de 38 horas, quando a concentração de ácido D(-) lático alcançou o valor de 32,4 g/L. As demais variávies de respostas, como o fator de rendimento em produto por substratro consumido, produtividade volumétrica e eficiência de fermentação, assumiram os valores de 0,95 g/g, 0,85 g/L.h e 95%, respectivamente.

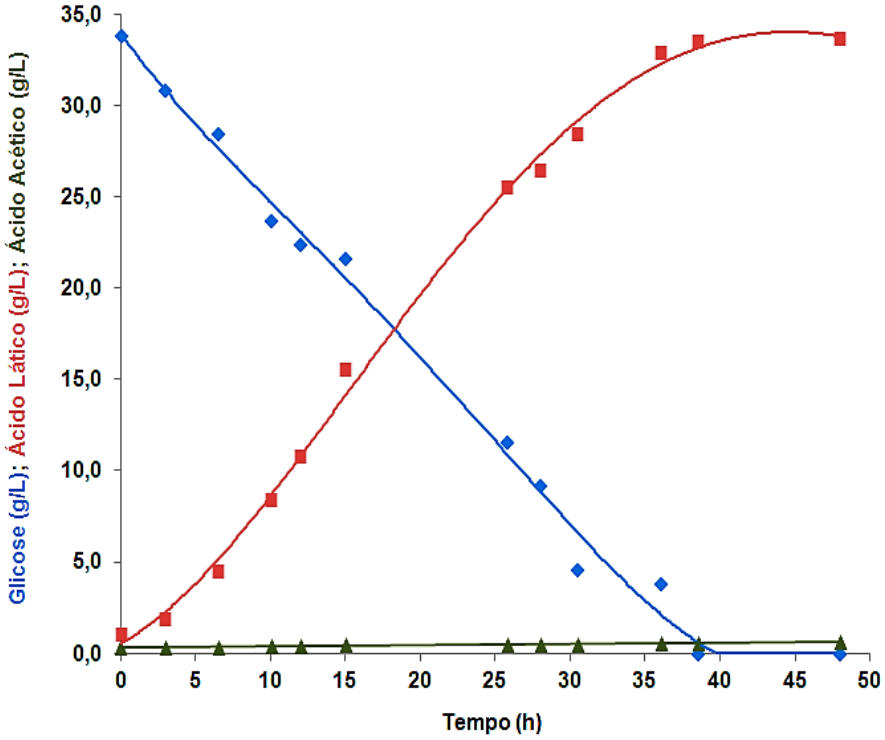

Figura 5.16. Fermentação em biorreator com meio sintético otimizado por *Lactobacillus coryniformis torquens*.

O menor valor para a produtividade volumétrica é seguramente uma consequência da redução na composição nutricional do meio de fermentação, que foi decorrente do nosso compromisso com a possibilidade de produção industrial do ácido lático, dificilmente economicamente viável, com um meio de composição muito rica, como o meio MRS. Por outro lado, o menor valor da produtividade volumétrica no meio otimizado não significa ser um fator que impeça desdobramentos industriais

desse processo fermentativo, na medida em que se pode aumentar esta variável de resposta por meio de adoção de outras estratégias, como o tamanho do inoculo.

A Tabela 5.9 apresenta os parâmetros e variáveis de resposta, de forma mais objetiva, como: tempo de fermentação, concentração inicial de glicose (S_o), concentração final de ácido lático (P), fator de rendimento em produto ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica de ácido lático (Q_P) e eficiência de fermentação (Ef), em relação ao rendimento máximo teórico (1,0 g/g).

Comparando os ensaios a partir de meio sintético inicial (MRS) e meio sintético com a concentração de nutrientes definida após os estudos de otimização, alguns aspectos gerais foram discutidos. Em suma, para os experimentos com concentração inicial de glicose na faixa de 30 a 33 g/L, verifica-se uma variação na concentração final de ácido lático de 29,0 para 32,4 g/L; na produtividade, de 2,36 para 0,85 g/L.h. Os valores de rendimento em produto e eficiência foram de 0,95 g/g e 95%, em ambos os casos. Conclui-se que os ganhos foram concentrados nos valores de produtividade, devido a composição de nutrientes.

Muitos autores reportaram o uso de meios mais onerosos em relação ao presente trabalho, com valores semelhantes ou inferiores em termos de concentração final de produto em longos períodos de fermentação, que resultam em menores valores de produtividade. Bustos *et. al.* (2004) conduziram um processo de fermentação com *Lactobacillus coryniformis*, por 44 horas, obtendo uma concentração final de ácido lático de 31,6 g/L, a partir de um meio de fermentação contendo 100 g/L de glicose, 5 g/L de licor de milho, 2,9 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de peptona. As variáveis de resposta do trabalho desses autores não apresentaram valores mais satisfatórios do que aqueles encontrados no presente estudo (Tabela 5.9); além disso, o meio formulado apresentava uma elevada concentração de peptona, insumo também de alto custo, o que poderá também impactar negativamente a viabilidade econômica do processo em tela.

Tabela 5.9. Variáveis de resposta obtidas a partir dos processos de fermentação, a partir de meio sintético MRS (complexo) e meio otimizado (composição simples)

Processo Fermentativo	Condições		Variáveis de resposta			
	So (g/L)	t_f (h)	P (g/L)	Q_P (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	E_f (%)
Meio MRS (presente trabalho)	30,0	17	29,0	2,36	0,95	95
Meio simplificado (presente trabalho)	**33,0**	**38**	**32,4**	**0,85**	**0,95**	**95**
Bustos *et.,al* (2004)	100	44	31,6	0,72	-	-
Oliveira *et.,al* (2003).	-	37	37,5	0,78	0,89	89

S_0: concentração inicial de glicose, P: concentração final de ácido lático Q_P: produtividade; $Y_{P/S}$: rendimento em produto; Ef: eficiência em relação ao máximo teórico ($Y_{P/S}$ teórico = 1,0 g ácido lático/g glicose consumido).

Ainda analisando a Tabela 5.9, é importante ressaltar que nossos resultados situam-se na faixa dos melhores resultados reportados na literatura, no entanto há que chamar também a atenção de que o meio utilizado por Oliveira *et al.* (2003) possuía insumos onerosos e adicionados em elevadas concentrações, como o extrato de carne (20 g/L) e peptona (40 g/L), tendo como fonte de carbono açucares do melaço de cana conduziram um processo de fermentação com *Lactobacillus curvatus*, por 48 horas, obtendo uma concentração final de ácido lático de 37,5 g/L.

Pode-se concluir, portanto, que, o comportamento apresentado pela bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* mostra suas exigências quanto aos nutrientes para o desenvolvimento de processos fermentativos de forma mais rápida, no entanto, há que se buscar um balanço entre o atendimento às necessidades das bactérias e a economicidade do processo fermentativo. A fim de se aumentar a taxa global do processo, uma alternativa adotável para se reduzirem os tempos de fermentação é a possibilidade de se trabalhar com inóculos mais concentrados, levando a um consumo mais rápido dos nutrientes, em particular da fonte de carbono/substrato (LI *et al.,* 2007)

5.9. Produção de ácido lático pelo processo *SSF* em frascos a partir do bagaço de cana pré-tratado

Várias estratégias tecnológicas podem ser adotadas para a produção de etanol de segunda geração, a saber: hidrólise e fermentação separadas, hidrólise e fermentação simultâneas, hidrólise e co-fermentação simultâneas, hidrólise e co-fermentaçâo separadas e bioprocesso consolidado. Estas concepções tecnológicas podem ser empregadas para a produção de outras moléculas de interesse comercial, dentro do conceito de Biorrefinaria. Neste contexto, a hidrólise e fermentação simultâneas, processo SSF, do inglês *simultaneous saccharification and fermentation* foi avaliada para a produção de ácido D(-) lático.

O bagaço de cana-de-açúcar foi previamente submetido ao pré-tratamento ácido, seguido do pré-tratamento alcalino, conforme preconizado por Betancur (2010), com posteriores lavagens sequenciais e secagem do resíduo. Na figura 5.17 se apresentam imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras do bagaço de cana-de-açúcar previa e posteriormente ao pré-tratamento, pode-se observar à alteração da estrutura do material indicando a eficácia do pré-tratamento com a remoção da fração hemicelulósica e a maior parte da lignina, deixando expostas as fibras de celulose para posterior ataque enzimático.

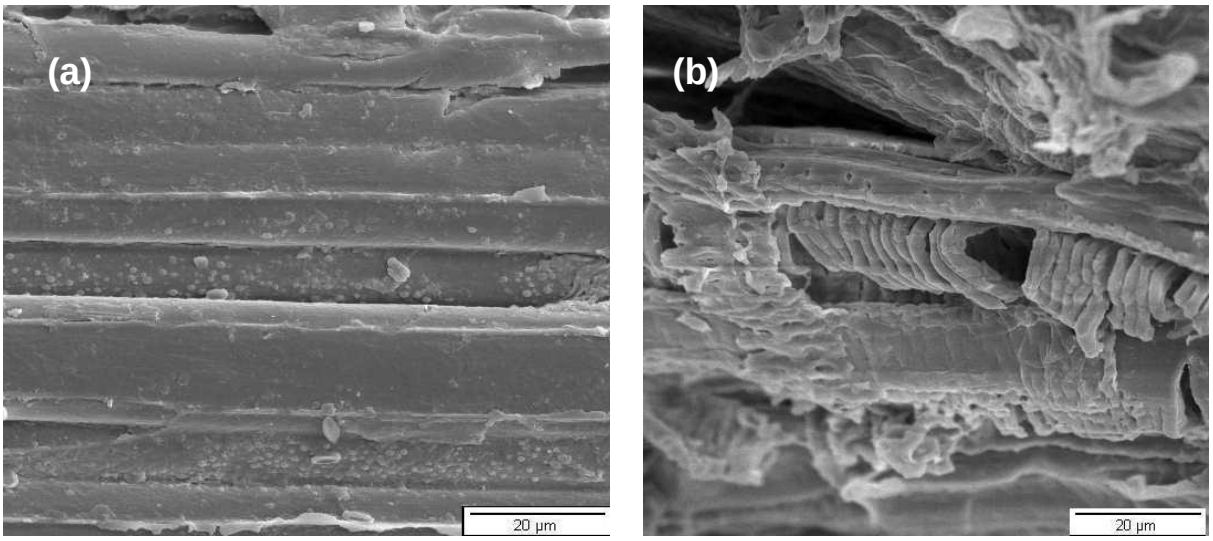

Figura 5.17. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (a) bagaço de cana in-natura; (b) celulignina de bagaço de cana.

Uma quantidade de 100 g/L de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foi submetida à pré-hidrólise enzimática por um período de 12 horas (na temperatura de 50°C e carga enzimática de 25 FPU/g da enzima comercial *Multifect* (*Genencor,*

USA)). O processo *SSF* foi iniciado inoculando o sistema de fermentação com uma concentração volumétrica de células bacterianas de 10% (v/v), crescidas previamente em meio MRS.

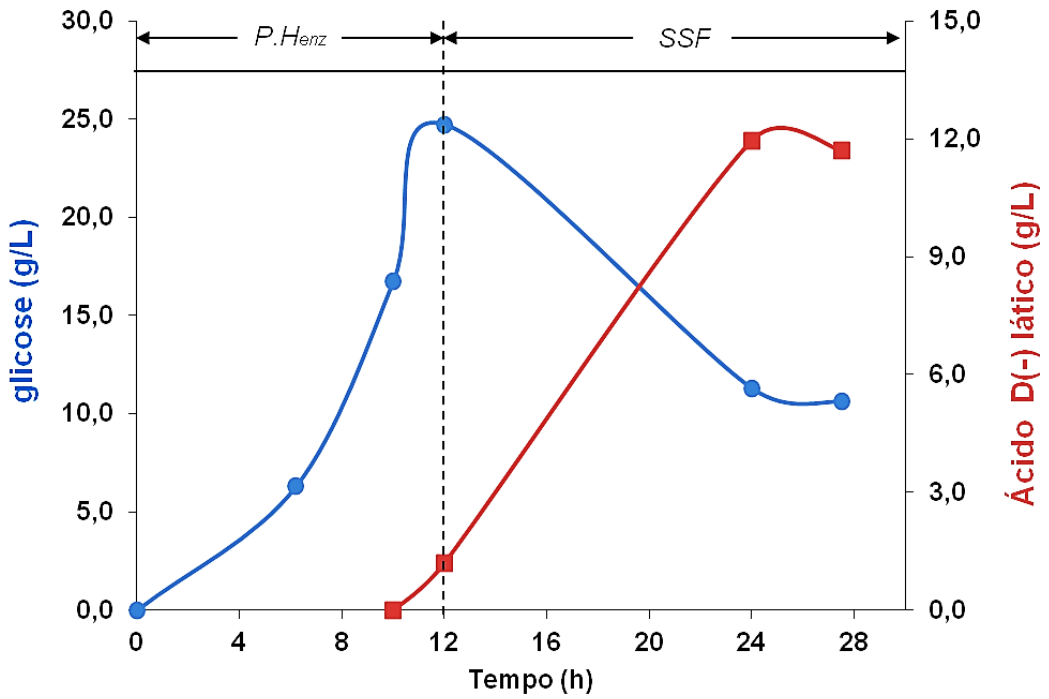

Figura 5.18. Perfil cinético do processo de hidrólise enzimática de celulose e fermentação simultâneas a partir de bagaço de cana pré-tratado por *Lactobacillus coryniformis torquens*, onde *P.H*$_{enz}$.= pré-hidrólise enzimática; *SSF*: fermentação e sacarificação simultâneas.

A figura 5.18 apresenta o perfil cinético da formação de ácido D(-) lático e consumo de glicose desse experimento conduzido em batelada simples e empregando o processo *SSF*, em frascos agitados. A primeira etapa corresponde a fase de pré-hidrólise enzimática, que resultou em uma produção de glicose de, aproximadamente, 25 g/L, após a qual se inoculou o sistema de fermentação com a linhagem de *Lactobacillus coryniformis torquens*. A concentração final de ácido D(-) lático foi de, aproximadamente, 12 g/L, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,9 g/L.h. Não foi possível calcular o fator de rendimento em produto por substrato consumido, pois não foi acompanhado o consumo de celulose efetivamente.

Hassan *et al.* (2001) avaliaram o processo *SSF* com as espécies de *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus plantarum* a partir de resíduos da soja,

processo conduzido com temperatura variando de 37 a 41 ºC, com controle de pH em 6.0, agitação de 130 rpm em um tempo de 96 horas, alcançando uma concentração final de ácido lático igual 45 g/L para ambas as linhagens. Yáñez *et al.* (2003) também reportaram a produção de ácido lático por *Lactobacillus coryniformis* em processo *SSF* a partir de celulose pura; o processo foi conduzido em batelada na temperatura de 37ºC , pH 6 e teve a duração de 25 horas tendo resultado em um fator de rendimento de 0.89 g/g e produtividade volumétrica de 0,5 g g/L.h. Tanaka *et al.* (2006), durante a produção de ácido D(-) lático em processo *SSF* a partir de resíduos do arroz, utilizaram uma linhagem modificada geneticamente de *Lactobacillus delbrueckii IFO 3202, a*o final do processo (38 horas) os autores obtiveram uma concentração de ácido lático de 28 g/L. Outros autores, como Adbel, Tashiro e Sonomoto, (2013) alcançaram um rendimento de 0.7 g/g utilizando resíduos de milho.

Tabela 5.10. Produção de ácido lático a partir do processo SSF

Matéria prima	**Variáveis de Resposta**		
	P (g/L)	Q_p (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)
Residuos de soja Hassan *et.,al,* (2001)	45	-	-
Celulose pura Yáñez *et, al* (2003),	54	0,50	0,89
Residuos de arroz Tanaka *et.,al,* (2006),	28	0,77	0,28
Residuos de milho Adbel, Tashiro e Sonomoto, (2013)	21	0,58	0,70
Bagaço de cana pré-tratado (presente trabalho)	12	0,90	-

P: concentração final de ácido D(-) lático; Qp: produtividade $Y_{P/S}$: rendimento em produto.

Por fim, a Tabela 5.10 apresenta a comparação dos resultados reportados na literatura com o processo SSF para a produção de lático, em meio contendo hidrolisado celulósico. Comparando os resultados, conclui-se que o processo *SSF* conduzido em frascos agitados, a partir do bagaço de cana-de-açúcar para produção de ácido D(-) lático por *Lactobacillus coryniformis torquens,* sem controle de pH, com meio otimizado (de composição simples) e consumo parcial da fonte de carbono em torno de 12,5 horas de fermentação se mostrou bastante satisfatório, considerando

se tratar de um resultado preliminar, ainda distante das condições controladas em reator instrumentado dos reportadas na literatura.

5.10. Considerações finais

O objetivo e o desenho experimental adotado para a execução do presente trabalho pautaram-se, fundamentalmente, na identificação de uma linhagem dentre aquelas adquiridas e nas questões econômicas do processo, mediante o uso de um meio simplificado para a produção de ácido D(-) lático, 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 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 e registrar a capacidade da linhagem em produzir ácido D(-) lático de segunda geração a partir do processo *SSF*, registrando com o desenvolvimento do presente trabalho uma oportunidade para o aproveitamento e a utilização da fração celulósica, oriunda do pré-tratamento da biomassa residual, de composição lignocelulósica.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

- ✓ De acordo com os resultados o microrganismo que apresentou melhor potencial para produção de ácido D(-) lático foi a bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens.*

- ✓ Nos estudos envolvendo as etapas de ativação e propagação celular, a bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* apresentou perfis cinéticos similares para as condições de agitação mecânica e estática, vislumbrando a possibilidade de redução dos custos associados ao aporte energético necessário para o preparo de inóculo durante a condução do processo.

- ✓ O pH mostrou-se uma variável de elevada importância, uma vez que a bactéria *Lactobacillus coryniformis torquens* sofre efeitos de inibição pelo produto. O controle deste parâmetro leva ao consumo total da fonte e carbono, incrementando a produção do ácido D(-) lático.

- ✓ Nos estudos envolvendo a comportamento celular em presença de xilose, ficou evidenciada a incapacidade da bactéria em consumir a pentose. No entanto, não foram observados efeitos indesejados de inibição pelo substrato nem mesmo a formação de ácido fórmico.

- ✓ A metodologia *Plackett-Burman* indicou, o extrato de carne, o acetato de sódio, fosfato dipotássico, extrato de levedura e glicose como os componentes que apresentaram considerável significância sobre a produção de ácido D(-) lático.

- ✓ A análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) mostrou o modelo quadrático reduzido

como o mais adequado para o ajuste dos dados experimentais. Sua otimização mediante ferramentas computacionais levo a um meio simples com composição: 2,3 g/L de extrato de carne; 3,58 g/L de extrato de levedura; 0,05 g/L de acetato de sódio e 0,05 g/L de fosfato dipotássico e concentração de glicose avaliada ate 33 g/L;

- ✓ Comparando os resultados dos ensaios conduzidos em batelada simples com meio MRS e meio otimizado, pode-se concluir que o meio otimizado (composição reduzida) leva a bactéria a consumir integralmente a glicose, com resultados similares a exceção da produtividade volumétrica, indicando a relação da taxa de produção com a concentração de nutrientes.

- ✓ Na produção de ácido D-lático pela rota biotecnológica a partir da fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar pelo processo SSF conduzido em frascos agitados sem controle de pH, obtendo uma concentração de ácido D(-) lático de 12 g/L se considera auspicioso;

- ✓ Com os resultados, obtidos no presente trabalho, ficaram evidenciadas as oportunidades para desenvolvimentos tecnológicos que permitam o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de ácido D-lático de segunda geração.

6.2. Sugestões

- Realizar ensaios de sacarificação e fermentação simultaneas *(SSF)* em biorreator instrumentado.

- Realizar estudos para avaliar a substituição dos nutrientes (extrato de levedura e extrato de carne) por outras fontes de nitrogênio alternativas com a finalidade de obter uma suplementação de meio mais econômica e diminuir os custos de processo;

- Avaliar as condições temperatura, agitação, e pH mediante a elaboração de planejamentos experimentais, visando estudos de sinergismos entre os parâmetros para determinar as condições ótimas de operação para fermentação com o meio de composição reduzida;

- Pesquisar e avaliar o uso de outras cepas com potencial para a produção de ácido lático D-lático a partir da fermentação da fração C5, bem como a possibilidade de conduzir processos com o uso de consórcios microbianos para o aproveitamento de forma mais integral e diversificada das frações hemicelulósica e celulósica do bagaço de cana-de-açúcar;

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO. K. Lactic acid production from lignocelluse-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. Journal of Biotechnology, v.156, p. 286-301, 2011.

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO. K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnology Advances, v.31, p. 877-902, 2013.

ARANTES, V. & SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels, v. 3, n. 4, 2010

BAILLY, M. Production of organic acids by bipolar electrodialysis: realizations and perspectives. Desalination, v.144, p. 157-162, 2002.

BANIEL, A.M. & EYAL, A.M, 1995. Citric acid extraction. *US Patent 5,426,220*.

BASTOS, V. D, 2007. “Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias”. Setorial, Rio de Janeiro, 25, p. 5-38.

BAUDEL, H.M.; ZAROR, C.; DE ABREU, C.A.M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. Industrial Crops and Products.; v. 21; p. 309-315; 2005.

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

BERTHOD, A., "Chiral recognition mechanisms". Analytical Chemistry 78 (7): 2093, 2006.

BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA JR., N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. Electronic Journal of Biotechnology, 2010

BOLAÑOS G, ACEVEDO A, YÉPEZ B, JIMÉNEZ AR. Acido láctico y sus derivados. Proyecto de investigación. Grupo de diseño de procesos. Universidad del Valle, Colombia, 2000.

BORGES, ELCIO RIBEIRO, PEREIRA JR. NEI. Desenvolvimento de um processo biotecnológico para produção de ácido succínico por *Actinobacillus Succinogenes* . 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.

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.

BRUNS, R.E, BARROS NETO, B., SCARMÍNIO, I.S, 1995. Planejamento e Otimização de experimentos. Editora UNICAMP.

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

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F., SILVIA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO,W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. Revista Analítica, n° 44, p. 48-91, 2009.

CASTILLO, F.A.; BALCIUNAS, E.M.; SALGADO, J.M.; DOMINGUEZ, J.M.;CONVERTI, A.; PINHEIRO, R. Lactic acid properties, applications and production: A review. Trends in Food Science & Technology, v. 30, p. 70-83, 2013

CHAUHAN, K; TRIVEDI, U; PATEL, K. Statistical screening of médium componentes by Plackett-Burman design for lactic acid production by Lactobacillus sp, KCP01 using date juice. Bioresource Technology 98 (2007) 98-103. 2007.

COSTA, Vanessa Moreira. Perfil de metabólitos excretados por Lactobacillus isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D (-) e L (+) do ácido lático. Dissertação (Tese de Mestrado). Escola Superior Agrícola Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 2006.

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 2004.

DA COSTA, 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.

FIORUCCI, A.R.; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano. Química Nova na Escola, v.15, p. 6-10, 2002.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. Biotechnology Advances v. 29, p. 930-939, 2011.

HABERT, A. C., BORGES, C.P., NÓBREGA, R, 1997. "Escola Piloto em Engenharia Química - Processos de Separação com Membranas", COPPE/UFRJ.

HASSAN K.S.;, MOLDES A.B.; KOEGEL R.G.; STRAUB R.J.; Lactic acid production from agriculture residues. Biotechnology Letters 23: 179–184, 2001

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.; HAHN–HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources[1]. Enzyme and Microbial Technology, v.26, p. 87-107, 2000.

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.

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

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. Biotechnology Advances, v. 27, p.145-152, 2009.

KISHOR C.; TRIVEDI U.; PATEL K. C. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design of lactic acid production by Lactobacillus sp. KCP01 using date juice. Bioresource Technology, v. 98, n. 1, p. 98-103, 2007.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, v. 41, p. 103-125, 1998.

KURZROCK, T. & WEUSTER-BOTZ D, 2010. Recovery of succinic acid from fermentation broth. Biotechnol Lett;32:331-9.

LASPRILLA, A.J.R.; MARTINEZ, G.A.R.; LUNELLI, B.H.; JARDINI, A.L.; FILHO, R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. Biotechnology Advances, v.30, p.321-328, 2012.

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.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. Sustainable Biotechnology. doi: 10.1007/978-90-481-3295-9_11, p 211-228, 2010.

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 S.Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. International Journal of Food Microbiology, v.83, p.115-131, 2003.

LOPES, ANGELA ; FRANCESCHI DE ANGELIS, DEJANIRA; CONTIERO, JONAS. Produção de ácido lático por lactobacilos em diferentes meios de cultivo. Depto. de Bioquímica e Microbiologia; 1Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2010.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66. n. 3, p. 506-577, 2002

MAIORELLA, B., BLANCH, H. W., WILKE, C. R, 1983. Byproduct inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*., Biotechnol. Bioeng. 25, 103 121.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em:

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/JULHO_2014/07_%20prod_cana_acucar_etanol(3).pdf.

MIYANO, K.-.I, Y.E., K., SHIMIZU, K, 2000. Improvement of vitamin B12 fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture. *Biochemical Engineering Journal,* v. 6, p. 207-214.

NAKANO, S.; UGWU, C.U.; TOKIWA, Y. Efficient production of D-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)2 as a neutralizing agent. Bioresource Technology, v.104, p.791-794, 2012.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Eletron. J. Biotechnol., n°2, v. 7, p. 167-179, 2004.

NAMPOOTHIRI, K.M.; NAIR, N.R.; JOHN, R.P. An Overview of the recent developments in polytactide (PLA) research. Bioresource Technology, v. 101, p. 8493-8501, 2012

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>.

OLIVEIRA H. M. C., ROCHA DE OLIVEIRA, A ; DE OLIVEIRA, A. S.;; Lactic acid production by L. curvatus in sugarcane molasses. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 24, n. 1, p. 133-142, jan./jun. 2003

PAYNE, M. J., SMITH, B. R, 1983. Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 25, 1251-1265.

PEREIRA JR., N, 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.

PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I.C.; MENOSSI, M.; SANTOS, R.R.; FILHO, S.O.; PENNA. T.C.V. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 121-124, p. 59-70, 2005.

PLACKETT R.L & BURMAN J.P, 1946. The design of optimum multifactorial experiments. biometrika 33:305–325

PRADELLA, JOSÉ G. C, 2006. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório Técnico, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), São Paulo.

RASAL, R.M.; JANORKAR, A.V.; HIRT, D.E. Poly(lactic acid) modifications. Progress in Polymer Science; v. 35; p. 338-356; 2010.

RODRIGUES M. I, 2010. Planejamento de experimentos visando a otimização de processos. Editora: Casa do Pão. FEA/UNICAMP.

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.

SREENATH, H.; MOLDES, A.B.; KOEGEL, R.G.; STRAUB, R.J. LActic acid production from agriculture residues. Biotechnology Letters, v. 23, p. 179-184, 2001.

SHEN, L.; WORREL, E.; PATEL, M. Perspective: Present and future development in plastics from biomass. Biofuels, Bioprod. Bioref. V.4, p. 25-40, 2010.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE,M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; LEITÃO, V.F.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignolleluloses: status and perspectives in Brazil. *Biores. Technol*., v. 101, p. 4820-4825, 2010.

TAHERZADEH, M.J. & KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. Bioresources, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TANAKA T,; HOSHINA M.; SUGURU T.; SAKAI B.; OHTSUBO S.C.; TANIGUCHI M.; Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource Technology , V.97, p 211–217, 2006.

TRINDADE, M.C. Estudo da recuperação de ácido lático proveniente de soro de queijo pela técnica de mebranas líquidas surfatantes. Belo Horizonte, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 119 f.

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.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chem. Biochem. Eng. Q.,* v. 22, n°2, p. 245-264, 2008.

WEE, Y.; KIM, J.; RYU, H. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. Food Technol. Biotechnol, v.44 (2), p.163–172 , 2006

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.

YANG, H.; YAN, R.;CHEN, H.; LEE, D., H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicelluloses, cellulose, and lignin pyrolysis. *Fuel*, v. 86, p. 1781-1788, 2007.

YAÑEZ, ANA.; MOLDES, B.; ALONSO, L.; PARAJÓ, J.C. Production of D(−)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using Lactobacillus coryniformis subsp. torquens. Biotechnology Letters, v.25, p. 1161–1164, 2003.

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.P. & LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.