



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

DAYANA DE GUSMÃO COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO BIOTECNOLÓGICO NA
SÍNTESE DO ÁCIDO PROPANÓICO POR FERMENTAÇÃO DA
GLICERINA**

Campinas

2014

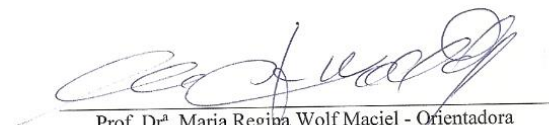
DAYANA DE GUSMÃO COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO BIOTECNOLÓGICO NA SÍNTESE DO ÁCIDO
PROPANÓICO POR FERMENTAÇÃO DA GLICERINA**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

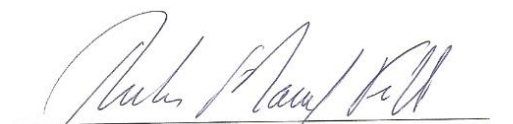
Orientadora: Maria Regina Wolf Maciel
Co-orientador: Rubens Maciel Filho

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



Prof. Dr.ª Maria Regina Wolf Maciel - Orientadora
FEQ/UNICAMP –Universidade Estadual de Campinas

Orientadora



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho – Co-orientador
FEQ/UNICAMP –Universidade Estadual de Campinas

Co-orientador

Campinas
2014

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

C65d Coêlho, Dayana de Gusmão, 1986-
Desenvolvimento de processo biotecnológico na síntese do ácido propanoico por fermentação da glicerina / Dayana de Gusmão Coêlho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Regina Wolf Maciel.
Coorientador: Rubens Maciel Filho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Glicerina. 2. Ácido propiônico. 3. Fermentação. 4. Modelagem matemática. 5. Separação (Tecnologia). I. Maciel, Maria Regina Wolf, 1955-. II. Maciel Filho, Rubens, 1958-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development biotechnological process in syntesis propionic acid by fermentation of glycerin

Palavras-chave em inglês:

Glycerin

Propionic acid

Fermentation

Mathematic model

Separation (Technology)

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Regina Wolf Maciel [Orientador]

Laura Plazas Tovar

Cibelem Iribarrem Benites

Eduardo Coselli Vasco de Toledo

João Inácio Soletti

Data de defesa: 05-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

DAYANA DE GUSMÃO COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO BIOTECNOLÓGICO NA SÍNTESE DO ÁCIDO
PROPANÓICO POR FERMENTAÇÃO DA GLICERINA**

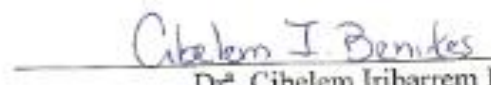
Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da Universidade Estadual de
Campinas, como requisito para obtenção do título
de Doutora em Engenharia Química.
Aprovação em 05/09/2014



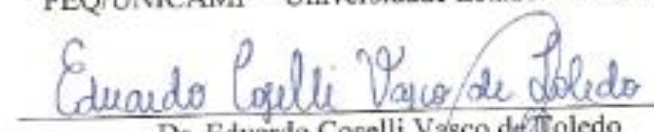
Prof. Dr.ª Maria Regina Wolf Maciel - Orientadora
FEQ/UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



Dr.ª Laura Plazas Tovar
FEQ/UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



Dr.ª Cibelem Iribarrem Benites
FEQ/UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



Dr. Eduardo Coselli Vasco de Toledo
REPLAN



Prof. Dr. João Inácio Soletti
CTEC/UFAL – Universidade Federal de Alagoas

Campinas
2014

RESUMO

COÊLHO, D. G. Campinas: UNICAMP, agosto, 2014. 152 fls. Projeto de Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Departamento de Desenvolvimento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

Para a evolução da ciência e melhoramento na qualidade de vida, o uso da tecnologia é imprescindível para solucionar os problemas relacionados com o uso desenfreado dos recursos naturais e poluição ambiental. A substituição de recursos não renováveis tem se apresentado como uma solução alternativa, na qual uma nova rota para a produção de ácido propanóico está inserida nesses preceitos. Atualmente a larga escala de produção do ácido propanóico advém da rota petroquímica, e a utilização da glicerina para a produção de ácidos orgânicos se tornou uma alternativa para amenizar os danos sensíveis ao meio ambiente. No entanto, a tese apresentada retrata de uma alternativa de síntese do ácido propanóico por rota fermentativa, neste são apresentadas as etapas do processo, desde a matéria-prima ao produto final. Neste âmbito surgem os estudos de análise e seleção do meio de cultura apresentando o direcionamento na escolha de alguns sais, do extrato de levedura e da concentração de glicerina em relação ao rendimento, eficiência e conversão em ácido propanóico, nesse estudo foi possível obter um rendimento de 80% na produção do ácido propanóico, uma eficiência de 99 % e conversão de 67 % para as concentrações de 20 g/L para a glicerina, 15 g/L para o extrato de levedura, 3 g/L para o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (g/L) e 1 g/L de KH_2PO_4 (g/L); o desenvolvimento de um processo inovador e de alto potencial industrial que foi realizado através de um processo de fermentação anaeróbica parcial na qual houve um consumo total do reagente alimentado e 100% de rendimento, obtendo como produto final da fermentação o ácido propanóico e o ácido succínico, quando comparada com a fermentação convencional no qual foi obtido apenas o ácido propanóico e apresentado resíduo no final do processo, o substrato; o estudo da influência do efeito combinado da concentração de ácido propanóico e da temperatura no processo fermentativo em que foi possível obter de 83 a 97 % de rendimento e uma conversão de 100% utilizando a temperatura de 30 °C; a escolha do modelo e estimativa dos parâmetros cinéticos em função da temperatura, onde os parâmetros

cinéticos foram calculados para o modelo não estruturado e não segregado através do método de otimização por algoritmo genético obtendo uma maior reprodutibilidade para as faixas de estudo; e a separação do ácido propanóico do meio fermentado utilizando um sistema evaporativo, neste o meio fermentado obtido foi facilmente separado através do pré-tratamento por separação sólido-líquido e obtida a separação do ácido propanóico dos demais componentes do meio fermentado no condensador externo na pressão de 100 mbar e temperatura de 130 °C.

Palavras-chave: glicerina; ácido propanóico; fermentação; modelagem matemática; separação.

ABSTRACT

COÊLHO, D. G. Campinas: UNICAMP, agosto, 2014. 152 fls. Projeto de Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Desenvolvimento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

For the evolution of science and improvement in quality of life, the use of technology is essential to solve the problems related to the rampant use of natural resources and environmental pollution. The substitution of non-renewable resources has emerged as an alternative solution, in which a new route for the production of propionic acid is inserted in these precepts. Today the large scale production propionic acid comes from petrochemical route, and the use of glycerin to produce organic acids has become an alternative to mitigate the environmentally sensitive damages that are a priori, a requirement for actually possible remain competitive in the market. However, the thesis presented portrays an alternative synthesis of propionic acid by fermentative route, this are the steps of the process, from raw material to finished product. In this context the study of analysis and selection of culture media presenting the guidance in the choice of some salts, yeast extract and glycerin concentration in relation to the performance, efficiency and conversion in propionic acid, this study arise was possible to obtain a yield 80% propionic acid in the production of an efficiency of 99% and 67% conversion for the concentration of 20 g / L glycerin, 15 g / L of yeast extract, 3 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ to (g/L) and 1 g / L of KH_2PO_4 (g/L); the development of a novel and high potential industry process was carried out through a process of anaerobic fermentation part in which there was complete consumption of the supplied reagent and 100% yield, obtained as an end product of fermentation propionic acid and succinic acid compared with conventional fermentation in which was only obtained propionic acid and the residue submitted at the end of the process the substrate; the study of the influence of the combined effect of concentration and temperature propionic acid in the fermentation process it was possible to obtain 83-97% conversion and a yield of 100% using a temperature of 30 °C; the choice of the model and estimation of kinetic parameters depending on the temperature, where the kinetic parameters were calculated for the model unstructured and not segregation by the method of optimization by a genetic algorithm for obtaining greater reproducibility study tracks;

and separating propionic acid fermentation broth using an evaporative system, in the fermentation medium was readily obtained by separate treatment by solid-liquid separation and separation of the obtained propionic acid from the other components of the fermentation broth external condenser at a pressure of 100 mbar and temperature of 130 °C.

Key-words: glycerin; propionic acid; fermentation; mathematic model; separation.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
1.1.1 Objetivo geral	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
1.2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO.....	6
1.3 DESAFIOS CIENTÍFICOS E TECNOLÓGICOS	9
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 FERMENTAÇÃO	10
2.1.1 Fermentação propiônica.....	10
2.1.2 Matéria-prima para produção de ácido propanóico por rota fermentativa 	13
2.1.3 Influência das variáveis de processo	16
2.1.3.1 Concentração de substrato	16
2.1.3.2 Meio de cultura	16
2.1.3.3 Temperatura.....	16
2.2 MODELAGEM MATEMÁTICA PARA BIOPROCESSOS.....	17

2.2.1 Modelos cinéticos para um sistema em batelada.....	17
2.3 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	19
2.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	26
2.4.1 Planejamento experimental em bioprocessos.....	26
2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	28
CAPÍTULO III – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA	29
3.1 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DO ÁCIDO PROPANÓICO ATRAVÉS DO GLICEROL POR <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	30
3.1.1 Introdução.....	31
3.1.2 Materiais e métodos	32
3.1.2.1 Micro-organismos e materiais de cultivo	32
3.1.2.2 Fermentação.....	32
3.1.2.3 Planejamento experimental.....	33
3.1.2.4 Métodos analíticos.....	33
3.1.3 Resultados e discussões	34
3.1.3.1 Estudo da influência do meio de cultura no rendimento do ácido propanóico.....	36
3.1.3.1 Estudo da influência do meio de cultura na eficiência do ácido propanóico..	38
3.1.3.1 Estudo da influência do meio de cultura na conversão do ácido propanóico.	40
3.1.4 Conclusões parciais	41

CAPÍTULO IV – FERMENTAÇÃO DA GLICERINA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPANÓICO.....	43
4.1 ESTUDO DA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA PERANTE CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE PARCIAL E ANAEROBIOSE TOTAL	43
4.1.1 Introdução.....	44
4.1.2 Materiais e métodos	44
4.1.2.1 Micro-organismo	44
4.1.2.2 Meio de manutenção do micro-organismo	44
4.1.2.3 Ativação do micro-organismo	45
4.1.2.4 Crescimento do micro-organismo.....	45
4.1.2.5 Fermentação.....	45
4.1.2.6 Fermentador	46
4.1.2.7 Métodos analíticos	47
Análise	47
4.1.3 Resultados e discussões.....	48
4.1.4 Conclusões parciais	54
4.2 EFEITO COMBINADO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICERINA NA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA	55
4.2.1 Introdução.....	55
4.2.2 Materiais e métodos	56
4.2.3 Resultados e discussões.....	56

4.2.4 Conclusões parciais	72
CAPÍTULO V–MODELAGEM MATEMÁTICA	73
5.1 MODELO MATEMÁTICO NÃO ESTRUTURADO PARA A FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA COM CÉLULAS LIVRES NA ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	73
5.1.1 Introdução.....	73
5.1.2 Materiais e métodos	74
5.1.2.1 Avaliação dos parâmetros do modelo.....	75
5.1.3 Resultados e discussões	76
5.1.3.1 Determinação dos parâmetros cinéticos	76
5.1.4 Conclusões parciais	80
CAPÍTULO VI–SEPARAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS.....	81
6.1 AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO PROPANÓICO UTILIZANDO UM SISTEMA EVAPORATIVO DE PASSO CURTO	81
6.2.1 Introdução.....	82
6.2.2 Metodologia experimental.....	82
6.2.2.1 Preparação do meio fermentado.....	82
6.2.2.1 Separação por evaporação de passo curto	84
6.2.2.2 Estudo experimental	85
6.2.2.3 Método analítico	85
6.2.2.4 Cálculo da recuperação do componente	86

6.2.3 Resultados e discussões	86
6.2.3.1 Purificação do ácido propanóico a partir do meio sintético por evaporação de passo curto	86
6.2.3.2 Purificação do ácido propanóico a partir do caldo fermentado por evaporação de passo curto	88
6.2.4 Conclusões parciais	90
CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES FINAIS	91
CAPÍTULO VIII - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95
CAPÍTULO IX - REFERÊNCIAS	96
APÊNDICES.....	105
APÊNDICE I – Curva padrão	105
APÊNDICE II – Análise do nível de confiança	107
ANEXOS	116
ANEXO A – Noções de estatística	116

À Deus, aos meus pais, aos meus irmãos, ao
esposo, ao Vinícius que está para chegar ao
mundo, e aos verdadeiros amigos

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por todo o aprendizado que dela obtive provenientes das vitórias e derrotas, dos erros e dos acertos.

Aos meus pais, Vanilo Vieira Coêlho e Danúzia de Gusmão Coêlho, pela vida, e também juntamente com meus irmãos Vanessa de Gusmão Coêlho e Daniel de Gusmão Coêlho; por todo apoio e paciência.

Ao Aldenyr pelo apoio, carinho, compreensão, o amor que me encorajou para que eu enfrentasse os percalços da jornada e ao maior presente da minha vida, um filho.

À minha família pelo incentivo e apoio.

Agradeço aos pesquisadores, minha orientadora Prof. Dra. Maria Regina Wolf Maciel e ao co-orientador Prof. Dr. Rubens Maciel Filho, pelas valiosas sugestões, pela disponibilidade, atenção dispensada, confiança, incentivo. Sem eles, a realização desse trabalho não seria possível, e aos quais tenho uma imensa gratidão e apreço.

Ao Eduardo Coselli pela valiosa contribuição a qual tenho uma imensa gratidão.

Aos professores, Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa, Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pelo apoio e disponibilidade do espaço físico para execução do trabalho.

Aos prof. Dr. Frede de Oliveira Carvalho, Dr. João Inácio Soletti e Dra. Sandra Helena Vieira de Carvalho pelo incentivo.

Ao professor Dr. José Vicente Hallak D'angelo pelo incentivo e pela contribuição no estágio docente.

Agradeço também aos funcionários da FEA e FEQ pela contribuição, que tornou possível a realização dos trabalhos.

A todos os colaboradores e parceiros que se dedicaram à elaboração de artigos.

Aos amigos do LEPFE, LEB/FEA e LOPCA especialmente a Cristiane, Daniele, Suzan, Filipe, Fátima Costa, Priscila Carvalho pela contribuição.

Aos meus amigos, especialmente a Danielle Brito, Leandro Melo, Livia Feitosa, Bruno Guzzo pelo apoio.

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química e ao Departamento de Desenvolvimento de Processos e Produtos, bem como a Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste projeto.

“O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcutá

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Fluxograma do projeto destacando cada uma de suas etapas e seus produtos	8
Figura 2.1 - Fermentação da glicose, ácido lático e glicerina (enzimas envolvidas 1 (S)-methylmalonyl- CoA-pyruvatetranscarboxylase, 2 malatedehydrogenase; 3 fumarase, 4 fumaratereductase, 5 CoAtransferase, 6 (R)-methylmalonyl-CoAmutase, and 7 methylmalonyl-CoAracemase) (Adaptado de Zidwick et al. 2013).	11
Figura 2.2 - Produção de ácido propanóico pela fermentação da glicerina por <i>P. acidipropionici</i> . (Adaptado Zhang e Yang, 2009).	13
Figura 2.3 - Destilador molecular de filme descendente (a- destilador, b-fluxo de materiais). ...	25
Figura 2.4 - Destilador molecular centrífugo (a- destilador, b-fluxo de materiais).	26
Figura 3.1 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para o rendimento como variável dependente para $p = 0,10$	108
Figura 3.2 – Gráfico normal: rendimento como variável dependente.	109
Figura 3.3 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para o rendimento como variável dependente para $p = 0,15$	37
Figura 3.4 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a eficiência como variável dependente para $p = 0,10$	111
Figura 3.5 – Gráfico normal: eficiência como variável dependente.	112
Figura 3.6 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a eficiência como variável dependente para $p = 0,15$	39
Figura 3.7 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a conversão como variável dependente para $p = 0,10$	114
Figura 3.8 – Gráfico normal: conversão como variável dependente.	115
Figura 3.8 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a conversão como variável dependente para $p = 0,15$	41
Figura 4.1 - Fermentação propiônica anaeróbica parcial da glicerina para a concentração inicial de substrato de 21,69g/L.	49
Figura 4.2 – Fermentação propiônica anaeróbica parcial da glicerina para a concentração inicial de substrato de 19,91 g/L.	49

Figura 4.3 – Fermentação propiônica anaeróbica da glicerina para a concentração inicial de substrato de 23,57 g/L.....	50
Figura 4.4 - Fermentação propiônica anaeróbica da glicerina para a concentração inicial de substrato de 23,08 g/L.....	51
Figura 4.5 - Fermentação em anaerobiose parcial: quantificação de carbono, hidrogênio e nitrogênio.....	52
Figura 4.6 - Fermentação em anaerobiose total: quantificação de carbono, hidrogênio e nitrogênio.....	52
Figura 4.7 - Consumo de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas fermentações em anaerobiose parcial e anaerobiose total.	53
Figura 4.8 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 30 °C.....	69
Figura 4.9 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 32 °C.....	69
Figura 4.10 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 33 °C.....	70
Figura 4.11 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 34 °C.....	70
Figura 4.12 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 36 °C.....	71
Figura 5.1 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (⊕) células e (○) glicerina na temperatura de 30 °C e concentração inicial de 37,82g/L.....	77
Figura 5.2 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (⊕) células e (○) glicerina na temperatura de 32°C e concentração inicial de 48,64g/L.....	78
Figura 5.3 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (⊕) células e (○) glicerina na temperatura de 33°C e concentração inicial de 70,70g/L.....	78
Figura 5.4 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (⊕) células e (○) glicerina na temperatura de 34°C e concentração inicial de 25,34 g/L.....	79

Figura 5.5 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (•) células e (○) glicerina na temperatura de 36°C e concentração inicial de 46,19g/L.....	79
Figura 6.1 - Esquema do tratamento do caldo fermentado.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 6.2 - Destilador Molecular de filme agitado (1- Alimentação; 2 - Evaporador e Condensador; 3 – Sistema de resfriamento/aquecimento; 4 - Coletor de Resíduos; 5 - Coletor de Destilado; 6 - Sistema de Vácuo; 7 – Controle da vazão de alimentação; 8 – Condensador externo, trape; 9 – Rotor do evaporador.	84
Figura 6.3 - Recuperação do ácido propanóico no destilador molecular.	87
Figura 6.4 - Recuperação dos componentes obtidos na destilação molecular para o meio fermentado com controle de pH (RAP- ácido propanóico no resíduo, RG- glicerol no resíduo, CEAP-ácido propanóico no condensador externo, CEG – glicerol no condensador externo, DAP – ácido propanóico no destilado, DG – glicerol no destilado).	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Micro-organismos e substratos utilizados na fermentação propiônica.	14
Tabela 2.1 - Modelos cinéticos de crescimento em função do substrato.....	18
Tabela 2.2 - Modelos cinéticos considerando inibição pelo substrato.	18
Tabela 3.1 - Valores utilizados no delineamento 2^4	33
Tabela 3.4 - Matriz do delineamento 2^4	Erro! Indicador não definido.
Tabela 3.5 - Efeito do planejamento de experimentos para a eficiência da fermentação propiônica (p = 0,10)	110
Tabela 3.7 - Matriz do delineamento 2^4	Erro! Indicador não definido.
Tabela 3.7 - Efeito do planejamento de experimentos para a conversão.....	113
Tabela 4.3 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 30 °C e $S_0 = 60,54$	58
Tabela 4.4 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 32 °C e $S_0 = 23,60$	59
Tabela 5.1 - Parâmetros independentes da temperatura que foram estimados.	76
Tabela 5.2 - Parâmetros da equação de Ahrenius.....	77
Tabela 6.1 - Porcentagem de ácido propanóico na destilação molecular.	87
Tabela 6.2 - Porcentagem de ácido propanóico na destilação molecular.	88

NOMENCLATURAS

A	Constante da equação de Ahrenius
B	Constante da equação de Ahrenius
C	Constante da equação de Ahrenius
CCT	Coleção de Culturas Tropical (Fundação André Tosello)
D	Constante da equação de Ahrenius
F	Valor do erro para o cálculo do mínimo quadrado
$F_{R, r}$	Fischer da regressão em relação ao resíduo
$F_{faj, ep}$	Fischer da falta de ajuste em relação ao erro puro
k	Bits
K_s	Constante de saturação (kg/m ³)
K_{IS}	Constante de inibição pelo substrato (m ³ h ⁻¹)
K_p	Constante de inibição pelo ácido propanóico (m ³ h ⁻¹)
m	Número de níveis distintos
MQep	Média quadrática do erro puro
MQfaj	Média quadrática da falta de ajuste
m_p	Coeficiente específico de manutenção na formação do ácido propanóico (kg _{substrato} kg ⁻¹ h ⁻¹)
MQ _r	Média quadrática residual
MQ _R	Média quadrática devido a regressão
m_x	Coeficiente específico de manutenção ao crescimento (kg _{substrato} kg ⁻¹ h ⁻¹)
n	Número de ensaios
n	Parâmetro para inibição por produto
\hat{n}	Efeito
η	Eficiência (%)

p	Número de parâmetros
P	Concentração de ácido propanóico (kgm^{-3})
P_{max}	Concentração de produto quando o crescimento cessa (kg/m^3)
P_0	Concentração inicial de ácido propanóico (kgm^{-3})
P_t	Produto teórico (kgm^{-3})
Real	Valor binário
R_i	Valor inteiro
R^2	Coefficiente de determinação do modelo
R_N	Recuperação de um determinado componente
S	Concentração de substrato (kgm^{-3})
S_{efeito}	Erro padrão
S_0	Concentração inicial de substrato (kgm^{-3})
SQ_{ep}	Soma quadrática do erro puro
SQ_{faj}	Soma quadrática da falta de ajuste do modelo
SQ_r	Soma quadrática residual
SQ_R	Soma quadrática devido à regressão
SQ_T	Soma quadrática em torno da média
T	Temperatura do meio de fermentação ($^{\circ}\text{C}$)
$t(v)$	Valor de t de student
u_x	Velocidade específica do crescimento celular (h^{-1})
μ_m	Velocidade máxima específica de consumo de substrato (h^{-1})
v	Graus de liberdade
v_r	Graus de liberdade devido ao resíduo
v_R	Graus de liberdade devido à regressão

v_T	Graus de liberdade em torno da média
X	Concentração microbiana (kgm^{-3})
X_i	Valor da variável
X_R	Conversão (%)
$Y_{i\text{exp}}$	Valores dos dados experimentais
$Y_{i\text{model}}$	Valores do modelo
$Y_{P/X}$	Coefficiente de rendimento do produto em relação ao crescimento microbiano (kgkg^{-1})
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimento microbiano em relação ao consumo de substrato
$Y_{P/S}$	Coefficiente de rendimento do produto em relação ao consumo de substrato
\hat{y}_i	Valor experimental
y_i	Valor previsto
\bar{y}_i	Valor da média



CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO



Em anos recentes, pesquisas na busca de processos que sejam inovadores, viáveis e que não causem danos sensíveis ao meio ambiente são, a priori, uma exigência para que de fato seja possível se manter na concorrência do mercado.

Dentro deste ensejo que uma gama de processos surge como alternativas na obtenção de produtos anteriormente derivados de processos petroquímicos. Os biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, estão entre a maioria das fontes promissoras para a substituição de combustíveis fósseis (Posada *et al.*, 2012). No entanto, o excesso de glicerol gerado desta produção, na qual compreende cerca de 10% em massa, pode tornar-se um problema ambiental, uma vez que não é processado pelo meio ambiente.

Apesar do fato de que várias alternativas emergentes têm sido propostas para valorizar o glicerol proveniente da produção de biodiesel, o grande pilar é encontrar alternativas que forneçam uma solução rápida em curto prazo, para evitar o descarte ou venda de glicerol em bruto (Leoneti *et al.*, 2012). A maioria das aplicações comuns de glicerol faz uso em sua forma purificada/destilada ou bruta do produto. No entanto, devido ao baixo custo do glicerol bruto, a sua utilização como glicerol purificado deve ser justificado devido ao custo de purificação ou destilação ser elevado (Leoneti *et al.*, 2012).

Nesta gama limitada de aplicações o glicerol está inserido em dois pilares segundo Leoneti *et al.*, (2012), um grupo que inclui a conversão química ou bioquímica do glicerol em produtos de valor agregado, seja ele bruto ou purificado, que nesse contexto está inserido os produtos químicos (1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, ácido succínico, ácido propanóico, ácido cítrico, pigmentos, biossurfactantes), aditivos de combustível, produção de hidrogênio, o desenvolvimento de células a combustível, e produção de etanol

ou metanol citados pelos autores Posada *et al.* (2012), Leoneti *et al.*, (2012), Chatzifragkou *et al.*, 2011; e a outra alternativa que compõe um cenário de transição a curto prazo, tais como a alimentação animal, co-digestão e co-gaseificação e tratamento de resíduos, que possui uma aplicação prática, sem qualquer outro tratamento de glicerol como o elemento chave.

Em virtude de muitos estudos apontarem a rota por conversão química ou bioquímica ser inviável conforme citado por Leoneti *et al.*, (2012), estudos realizados por Posada *et al.* (2012) mostrou, com base em critérios técnico-econômico da produção de nove produtos de valor agregado a partir de glicerol e a purificação da glicerina, que não só os requisitos de qualidade foram alcançados com êxito, mas que todos os processos eram rentáveis.

Dentro deste ensejo, sendo a utilização da glicerina purificada uma rota rentável na obtenção de produtos de valor agregado vários são os produtos químicos que podem ser obtidos, a depender do tipo de micro-organismo, conforme apresentado por Papoutsakis e Meyer (1985), Barbirato *et al.* (1997), Himmi *et al.* (2000) e Yazdani e Gonzalez (2007). A escolha do ácido propanóico como objeto de estudo circunda no fato de ser um produto químico também proveniente atualmente da rota petroquímica Paik e Glatzer (1994) e Playne (1985) e por apresentar uma gama de aplicações seja em sua estrutura como ácido ou em forma de sal tendo uma gama de aplicações, tais como conservantes em alimentos, rações para animais, química fina, produtos farmacêuticos dentre outros, conforme citados por Playne (1985).

No entanto, para a fermentação propiônica, a rota mais conhecida e estudada é a que utiliza a propionibacteria como micro-organismo a qual foi estudado por Wood e Werkman (1935); Barbirato *et al.* (1997); Himmi *et al.* (2000) e Zhang e Yang (2009) utilizando o glicerol como substrato, seja em bruto ou purificado.

Não obstante a dificuldade de processos biotecnológicos para a fermentação da glicerina circunda na dificuldade de obtenção de altos rendimentos, conforme estudado por Posada *et al.*, (2012), no qual através de estudos, notou que as despesas de consumo se

elevam com o aumento do rendimento global da fermentação e com a diminuição da concentração de glicerol nos meios de fermentação. Este comportamento pode ser explicado pelo ineficiente uso de glicerol, durante o processo de fermentação e de maior exigência dos serviços. Por isso a necessidade de se estudar um processo que aumente o rendimento, e como a propionibactéria é uma bactéria anaeróbica facultativa, exploração maior da rota torna-se uma opção.

Uma alternativa é o estudo de uma rota do micro-organismo através da não restrição do oxigênio que é a produção de ácido propanóico por processo de anaerobiose parcial, ou seja, o processo biotecnológico ocorre sem adição de nitrogênio no meio fermentativo o que diminuiria o gasto com nitrogênio e poderia ser capturado mais facilmente pelas indústrias, pois viabilizaria a produção do ácido propanóico em dornas de fermentação aeróbicas. É importante ressaltar que uma recente publicação estudou o metabolismo aeróbico da *Propionibacteria acidipropionici* no xarope de cana de açúcar e em virtude da presença de um composto presente no xarope seria responsável por simular o metabolismo anaeróbico (Bassalo, 2013).

Porém, para o desenvolvimento de um produto se faz necessário avaliar todas as etapas inerentes ao processo, não somente a etapa de produção. Portanto, estudos realizados por Goswani e Srisvastava (2000a), Feng *et al.* (2000), Coral (2008) avaliaram os perfis cinéticos dos micro-organismos, porém utilizando a rota convencional, com restrição de oxigênio, e foi possível representar o processo de forma eficaz. Desta forma a avaliação e modelagem deste processo pela rota não convencional também se faz necessário para uma boa reprodutibilidade do processo.

Por outro vértice, o processo de separação e purificação em processos biotecnológicos no espectro global corresponde ao custo de uma parcela de 10% do custo total de um processo (Dechow, 1989). Portanto, será apresentada uma alternativa de separação, a destilação molecular, com o objetivo de obter o produto mais concentrado avaliando a resposta do processo.

OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Levando em conta as tendências comentadas objetivou-se neste trabalho um estudo da aplicação do glicerol purificado, glicerina, na obtenção de um produto de alto valor agregado o ácido propanóico, indicando rotas alternativas e inovadoras para obtenção de seu produto final.

Portanto, o objetivo principal abarca o estudo da produção do ácido propanóico utilizando um processo de anaerobiose parcial e a purificação do ácido propanóico do meio fermentado utilizando o evaporador de passo curto como opções inovadoras, com a modelagem e simulação deste processo. Para tanto, na produção do ácido propanóico foram investigados os efeitos dos componentes do meio de cultura em escala de bancada (shaker), executada a fermentação em escala de bancada (biorreator) comparando com a fermentação convencional, e realizada fermentações com variações na concentração de glicerol e temperatura do processo; na modelagem foram determinados os parâmetros do modelo matemático do processo através dos dados experimentais; e para a purificação do ácido propanóico foram avaliadas a influência das variáveis de operação, temperatura e pressão, do evaporador de passo curto utilizando o meio sintético e o meio fermentado.

1.1.2 Objetivos específicos

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

- i. **Estudo do efeito dos componentes do meio de cultura na fermentação propiônica.** Foram estudadas a influência das variáveis que compõem o meio de cultura (glicerina, extrato de levedura, KH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), quanto ao rendimento, eficiência e conversão em produzir ácido propanóico no processo de fermentação propiônica utilizando a *Propionibacteria*. As análises foram realizadas através do software STATISTICA 7.0.

ii. **Propor um processo fermentativo alternativo e comparar com o método existente via estudo do perfil cinético da fermentação e nas análises de consumo de CHN** Nesta etapa, foram avaliadas as fermentações em condições de anaerobiose parcial, proposto, e anaerobiose total utilizando as condições do meio de cultura avaliadas anteriormente.

iii. **Levantamento dos dados cinéticos da fermentação propiônica.** Para a execução, e avaliação dos perfis cinéticos foram realizadas 13 bateladas, na qual foram avaliadas para cada ensaio a produção de ácido propanóico, consumo de substrato e crescimento microbiano de uma linhagem de bactéria *P. acidipropionici*.

iv. **Estudo das variáveis na fermentação propiônica.** Através dos ensaios realizados na etapa anterior avaliar o consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação propiônica para as variações na temperatura no intervalo de 30 à 36 °C e concentrações de glicerina de aproximadamente 20, 40 e 60 g/L.

v. **Modelagem da cinética de fermentação.** Utilizando um modelo matemático existente, os parâmetros cinéticos foram estimados utilizando os dados experimentais da etapa anterior. Para o ajuste dos parâmetros do modelo utilizou-se uma sub-rotina de otimização, algoritmo genético, desenvolvida no MATLAB 7.0.

vi. **Estudo da separação do ácido propanóico do meio fermentado e do meio cinético.** Apresentar um método que promovesse a separação de ácidos orgânicos do meio fermentado, para este estudo foi utilizado o evaporador de passo curto.

vii.

1.2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Esta tese de doutorado foi dividida em capítulos, nos quais são abordados os seguintes temas:

O capítulo 2 apresenta a “Revisão Bibliográfica” onde são abordados os processos fermentativos dando ênfase a fermentação propiônica quanto às matérias-primas e as variáveis de processo. Apresentam-se também neste capítulo os modelos cinéticos dos processos fermentativos e as técnicas de separação mais utilizadas em bioprocessos.

No capítulo 3, “Estudo da influência do meio de cultura na fermentação propiônica”, foi apresentada uma análise da influência do meio de cultura, a saber: glicerina, extrato de levedura, KH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ com o intuito de avaliar o rendimento, a eficiência e a conversão da fermentação propiônica por *Propionibacterium acidipropionici* utilizando a glicerina como substrato. Visando traçar as concentrações do meio de cultura a ser utilizado no processo fermentativo.

No capítulo 4, “Fermentação da glicerina para a produção de ácido propanóico”, foi apresentada a metodologia e os perfis cinéticos das fermentações em condições de anaerobiose parcial e anaerobiose total para a identificação do processo com maior consumo de CHN e, portanto mais vantajoso para um processo industrial. Apresentam-se também neste capítulo o levantamento dos dados cinéticos e o estudo da influência da temperatura e da concentração de glicerina na fermentação propiônica para o processo escolhido.

No capítulo 5, “Modelagem matemática”, foram otimizados os parâmetros cinéticos de um modelo matemático não segregado e não estruturado existente, utilizando o algoritmo genético com dados de fermentação anaeróbica parcial em função da temperatura. Para tanto, utilizou-se como ferramenta o software MATLAB 7.0 e o método de Runge-Kutta para a simulação do modelo.

No capítulo 6, “Avaliação da purificação do ácido propanóico utilizando um sistema evaporativo” foi apresentada toda a metodologia empregada no procedimento de preparação para a separação do sistema líquido-líquido na qual abrangeu a separação sólido-líquido do meio fermentado e a neutralização do caldo fermentado. Com base nas etapas preliminares, promoveu a separação de alguns componentes do meio fermentado do ácido propanóico através da investigação da separação na purificação do ácido propanóico proveniente do meio fermentado e do meio sintético.

O capítulo 7, “Conclusões” apresenta as conclusões obtidos durante o desenvolvimento de todo o trabalho.

No capítulo 8, “Sugestões para trabalhos futuros” apresentam as sugestões para os futuros trabalhos tendo como base o trabalho e resultados discutidos.

No capítulo 9, “Referências” estão apresentadas as referências utilizadas no decorrer do trabalho.

A Figura 1.1 apresenta uma visão ampla do objetivo da tese de doutorado circundando desde os processos quanto às matérias-primas e produtos.

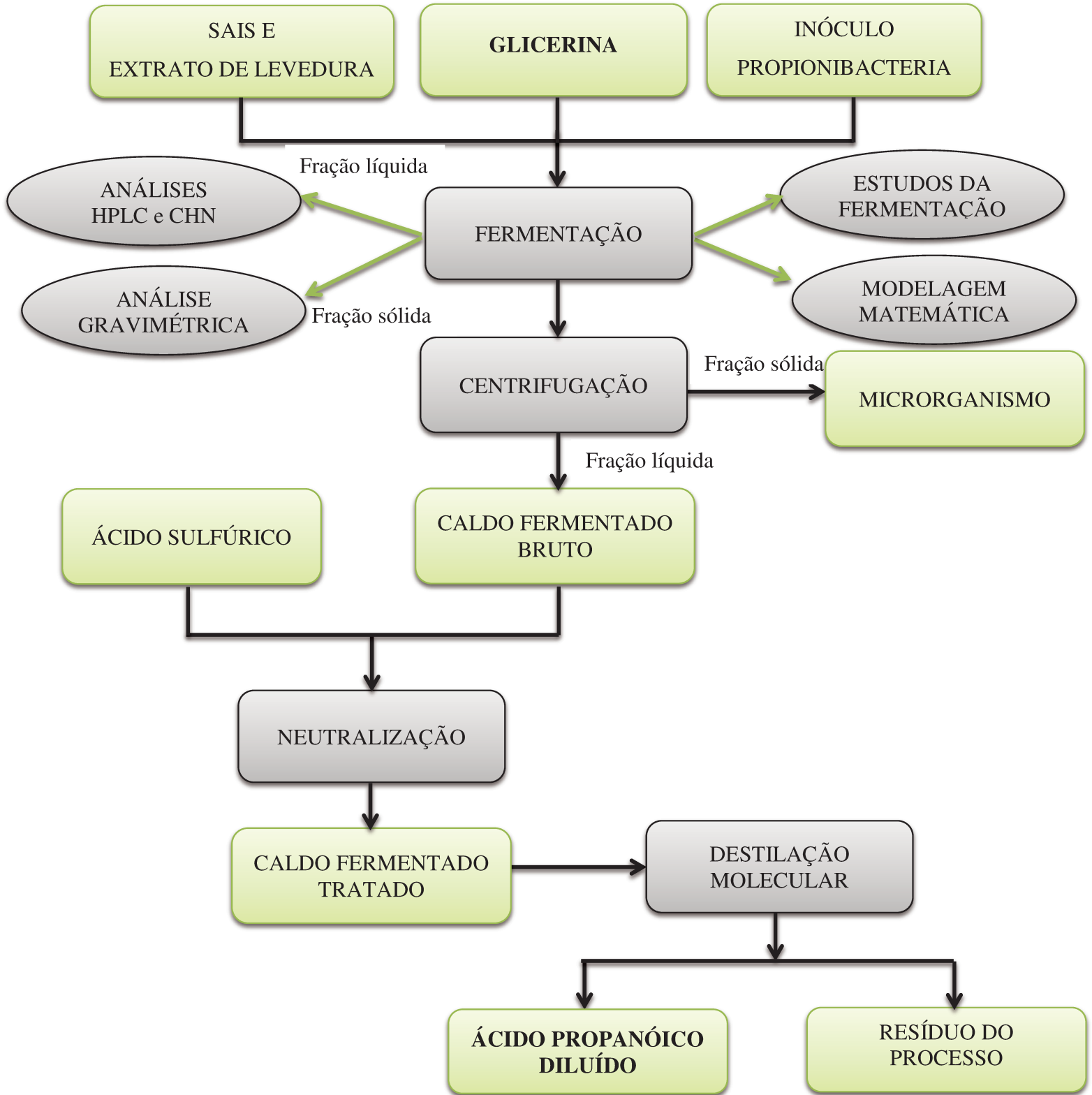


Figura 1.1 - Fluxograma do projeto destacando cada uma de suas etapas e seus produtos

Tese de Doutorado - Dayana de Gasmão Coelho

1.3 DESAFIOS CIENTÍFICOS E TECNOLÓGICOS

O grande desafio para tornar o processo do ácido propanóico competitivo em potencial consiste em propor soluções que tratem da limitação da conversão provocada pela considerável inibição da reação pelo produto principal, resultando em uma baixa concentração final de ácido propanóico, bem como apresentar processos alternativos que maximizem o consumo de substrato, e que diminua o tempo de fermentação reduzindo portanto, os custos a ele relacionados.

O fato da concentração do produto desejado ser baixa eleva os custos na etapa de purificação. Desta forma, a necessidade de busca de processo fermentativo alternativo bem como determinar as condições ótimas de operação que possam contribuir para um aumento da conversão é imprescindível para o desenvolvimento de um processo eficiente e competitivo, bem como a purificação do produto desejado do meio fermentado.

A motivação desse trabalho se baseia na ideia de desenvolver um processo alternativo utilizando como substrato uma fonte verde e renovável, a glicerina, na obtenção do ácido propanóico via processo fermentativo e executar a separação do ácido propanóico. Portanto, serão apresentadas as técnicas no desenvolvimento da síntese do ácido propanóico por uma rota inovadora de processo por ser um processo biotecnológico, na qual atualmente é obtido da via petroquímica, bem como por utilizar um processo não convencional pela propionibacteria a anaerobiose parcial.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERMENTAÇÃO

A fermentação por definição do dicionário Aurélio consiste “na transformação química provocada por fermento vivo ou por princípio extraído de fermento”. Ou seja, de uma forma mais abrangente, fermentação é o termo designado ao processo que ocorre quando um micro-organismo degrada e se reproduz a partir de uma fonte de nutrientes orgânicos, visando à obtenção de energia produzindo diversos bioprodutos. Os bioprodutos são definidos a partir do tipo de micro-organismo, do substrato, e das condições de processos.

Vários são os processos fermentativos e destes podemos citar a fermentação alcoólica, fermentação láctica, fermentação acética, fermentação cítrica, fermentação propiônica, das quais são nomeados de acordo com o produto majoritário da reação.

O trabalho em questão fará menção ao processo de fermentação propiônica, pois é o caso de estudo.

2.1.1 Fermentação propiônica

A fermentação propiônica é o processo de fermentação que tem como produto majoritário o ácido propanóico, e tem grande potencial industrial devido a gama de ácidos carboxílicos que pode formar; podendo produzir como produtos secundários ou intermediários o ácido acético, ácido succínico, ácido acrílico, ácido fumárico e propanol (Papoutsakis e Meyer, 1985). Ao mesmo tempo, a competitividade da produção do ácido propanóico por rota microbiana frente a rota petroquímica pode ser limitada devido ao baixo rendimento devido ao nível elevado de co-produtos (Himmi *et al.*, 2000).

Para um processo que utiliza como micro-organismo a propionibacteria, os principais substratos (glicose, glicerina e ácido láctico), bioprodutos e enzimas envolvidas estão apresentados na rota propionato-succinato na Figura 2.1 segundo Zidwick *et al.*(2013).

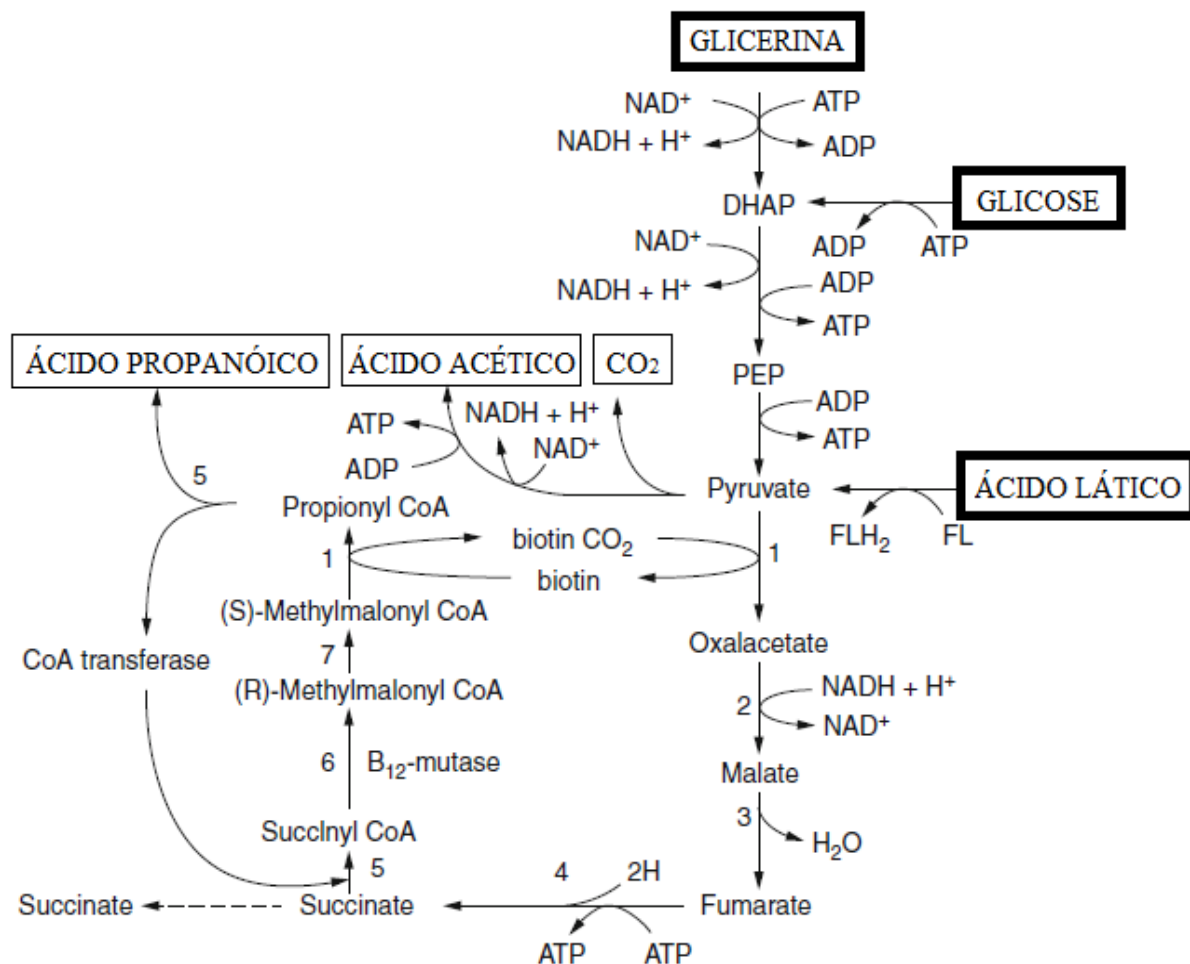
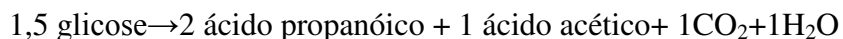


Figura 2.1 - Fermentação da glicose, ácido láctico e glicerina (enzimas envolvidas 1 (S)-methylmalonyl- CoA-pyruvatetranscarboxylase, 2 malatedehydrogenase; 3 fumarase, 4 fumaratereductase, 5 CoAtransferase, 6 (R)-methylmalonyl-CoA mutase, and 7 methylmalonyl-CoA racemase) (Adaptado de Zidwick *et al.* 2013).

Através da rota propionato-succinato, temos o processo de glicólise, onde os nutrientes são degradados para a formação de piruvato e posteriormente seus bioprodutos (Zidwick *et al.*, 2013; Papoutsakis e Meyer, 1985; Playne, 1985).

Desta forma as equações estequiométricas para os substratos na produção do ácido propanóico segundo Zidwick *et al.*(2013); Papoutsakis e Meyer (1985); Zhang e Yang (2009); Sherman e Shaw (1923), seguem abaixo.

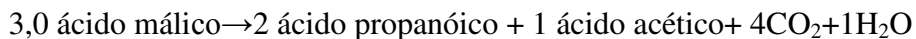
- Fermentação propiônica tendo como substrato a glicose:



- Fermentação propiônica tendo como substrato o ácido láctico:



- Fermentação propiônica tendo como substrato o ácido málico:



- Fermentação propiônica tendo como substrato a glicerina:



Apesar da variedade de substratos, uma maior eficiência da fermentação propiônica pode ser esperada em virtude de possuir um maior nível de redução (Himmi *et al.*, 1999).

De uma forma mais detalhada da rota da fermentação propiônica utilizando como substrato a glicerina, temos a Figura 2.2.

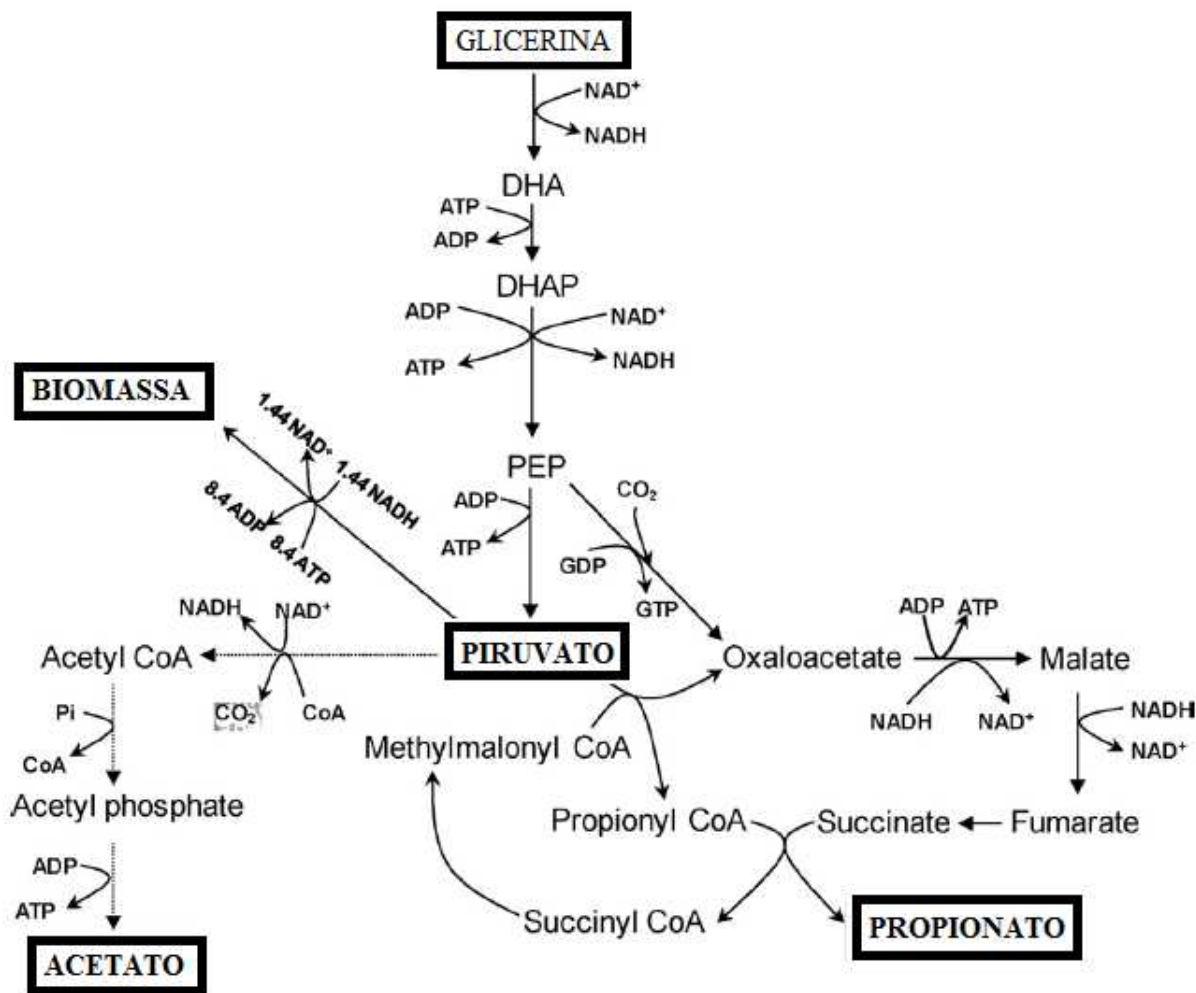


Figura 2.2 - Produção de ácido propanóico pela fermentação da glicerina por *P. acidipropionici*. (Adaptado Zhang e Yang, 2009).

2.1.2 Matéria-prima para produção de ácido propanóico por rota fermentativa

Existe uma vasta gama de matérias-primas disponíveis para a produção de ácido propanóico tanto em relação ao substrato, quanto ao micro-organismo.

A fermentação propiônica ocorre por bactérias de diversos gêneros. Entretanto, as mais estudadas estão apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Micro-organismos e substratos utilizados na fermentação propiônica.

Micro-organismo	Substrato	Referências
<i>Clostridium propionicum</i>	Lactato	Leaver, <i>et al.</i> , 1955; Barbirato <i>et al.</i> , 1997
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Lactose	Sherman e Shaw, 1923; Lewis e Yang, 1992a; Lewis e Yang, 1992a; Goswani e Srisvastava, 2000a; Goswani e Srisvastava, 2000b; Hsu e Yang, 1991
	Glicerina	Wood e Werkman, 1935; Barbirato <i>et al.</i> , 1997; Himmi <i>et al.</i> , 2000
	Glicose	Papoutsakis e Meyer, 1985; Woskow e Glatz, 1991; Lewis e Yang, 1992a; Himmi <i>et al.</i> , 2000
	Lactato	Lewis e Yang, 1992a
	Sacarose	Quesada-Chanto <i>et al.</i> , 1994
	Hemicelulose	Ramsay <i>et al.</i> , 1998
	Melaço da cana-de-açúcar	Coral, 2008
	Glicerol bruto	Zhang e Yang, 2009
<i>Propionibacterium arabinosum</i>	Lactato	Leaver, <i>et al.</i> 1955
	Glicose	Wood <i>et al.</i> , 1936
<i>Propionibacterium jensenii</i>	Sacarose	Quesada-Chanto <i>et al.</i> , 1994
<i>Propionibacterium thoenii</i>	Glicose	Guét al., 1988
<i>Propionibacterium acnes</i>	Glicerol	Barbirato <i>et al.</i> , 1997
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Glicerina	Himmi <i>et al.</i> , 1999; Feng <i>et al.</i> , 2011 Himmi <i>et al.</i> , 2000
	Glicose	Quesada-Chanto <i>et al.</i> , 1994
	Sacarose	
<i>Propionibacterium pentosaceum</i>	Glicose	Wood <i>et al.</i> , 1936;
	Glicerina	Wood e Werkman, 1938
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Sacarose	Quesada-Chanto <i>et al.</i> , 1994

Pode ser observado pela Tabela 2.1 que a *Propionibacterium acidipropionici* é a mais estudada e isso se justifica pela grande escala de fontes de carbono que ela pode sintetizar bem como pelo alto rendimento quando comparado com as demais cepas. Em estudos realizados por Barbirato *et al.* (1997) na qual estudou as cepas *P. acidipropionici*, *P. acnes* e *P. propionicum* foi obtido um maior consumo de glicerol, em torno de 100% e, um menor tempo de fermentação de fermentação, aproximadamente 6,57 vezes menor quando comparado com a cepa *P. acnes* e de 1,09 vezes menor em relação a *A. propionicum*; e um rendimento de 84,4 % para a *P. acidipropionici* em relação a 77,0 % e 79,6 % quando comparada as demais cepas, respectivamente.

Barbirato *et al.* (1997) comparando os três substratos, glicerina, glicose e ácido láctico utilizando esta bactéria obteve um rendimento 1,71 vezes menor que a glicose porém, a quantidade de carbono consumido para a geração dos produtos foi de 7,5 % maior. Em estudos posteriores Himmi *et al.* (2000) utilizando a glicose e o glicerol como substrato obteve 79 % de rendimento quando comparado com 53 % utilizando a glicose como substrato.

O elevado rendimento apresentados pelos autores quando comparados com os demais substratos, pode ser explicado pelo alto grau de redução do glicerol bem como a via metabólica anaeróbia envolvida na síntese do ácido propanóico, pois possui um potencial redox equilibrado e pela síntese de ATP, obtendo um potencial energético. Sendo seu nível elevado de conversão de glicerol em ácido propanóico ser também explicado pelo baixo rendimentos de biomassa conforme apresentado por Barbirato *et al.* (1997).

No entanto, uma fonte de matéria-prima bastante inovadora é a utilização do glicerol bruto presente em águas residuárias estudadas por Zhang e Yang (2009) no qual utilizou uma espécie mutante de *P. acidipropionici* ATCC 4875, fornecendo uma matéria-prima de baixo custo, porém foi obtida uma baixa produtividade e concentração final de ácido propanóico.

2.1.3 Influência das variáveis de processo

2.1.3.1 Concentração de substrato

Segundo os autores, Himmi (2000) e Lewis e Yang (1992a) tanto a fonte de carbono quanto sua concentração é capaz de afetar a produtividade, o rendimento e o metabolismo celular.

Desta forma, a concentração de ácido propanóico na fermentação é limitada, devido à inibição quando em altas concentrações, conforme estudos realizados por Solichien *et al.* (1995). Uma alternativa, segundo Zhang e Yang (2009), é a utilização de células imobilizadas.

2.1.3.2 Meio de cultura

A composição do meio de cultura é um fator primordial na definição de um processo biotecnológico. No entanto, este irá depender do mecanismo do micro-organismo, de seu metabolismo e os produtos envolvidos no processo.

Quesada-Chanto *et al.* (1998) demonstrou a importância das diferentes fontes de vitaminas em nitrogênio no crescimento celular e na produção do ácido propanóico na fermentação da sacarose utilizando a *P. acidipropionici*. Neste foi observado uma inibição no crescimento celular para todas as fontes estudadas, e em menor escala para o extrato de levedura.

2.1.3.3 Temperatura

A escala ótima de temperatura para a propionibacteria, por ser mesofílica, encontra-se na faixa de 30 a 45 ° C segundo Blanch e Clark (1997), porém a faixa que tem sido estudada pelos pesquisadores e considerada a faixa ótima de operação encontra-se no intervalo de 30 a 37°C em virtude das altas temperaturas propiciar uma redução na assimilação do substrato pelo micro-organismo (Sherman e Shaw, 1923; Blanchard e MacDonald, 1935; Johns, 1952; Woskow e Glatz, 1991; Lewis e Yang, 1992b; Barbirato *et*

al., 1997; Guet *al.*, 1998 Ramsay et al., 1998; Molina e Giannuzzi, 2002; Goswani e Srivastava, 2000a; Himmiet *al.*, 2000; Suwannakham, 2005; Feng *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012; Sabra *et al.*, 2013).

Na qual, o valor máximo de temperatura utilizado foram o de Sherman e Shaw (1923), e Blanchard e MacDonald (1935) de 37 °C e a de Liu *et al.* (2011) de 35 °C.

2.2 MODELAGEM MATEMÁTICA PARA BIOPROCESSOS

Os modelos matemáticos são expressões matemáticas que descrevem um dado processo. Estes modelos podem ser fenomenológicos (baseada nas relações matemáticas), empíricos (baseada em dados experimentais) ou híbridos (combinação dos modelos fenomenológicos e empíricos) (Bonomi e Schmidell, 2001).

Segundo Hiss (2001), é importante analisar o perfil cinético da concentração de substrato, concentração de células e produtos para que, com base em dados experimentais de concentração em função de tempo, possa ajustar os parâmetros as curvas a eles relacionados. Estes parâmetros por sua vez podem ser divididos em velocidades instantâneas (r_x , r_s e r_p), velocidades específicas (μ_x , μ_s e μ_p) e fatores de conversão ($Y_{x/s}$, $Y_{x/p}$ e $Y_{p/s}$).

2.2.1 Modelos cinéticos para um sistema em batelada

Os modelos cinéticos das células, substrato e produto para um modelo não segregado e não estruturado em um processo em batelada estão apresentados nas equações 2.1, 2.2 e 2.3.

Concentração de células

$$\frac{d(X)}{dt} = \mu_x \cdot X \quad (\text{equação 2.1})$$

Concentração de substrato

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{\mu_x}{Y_{X/S}} + m_x \right) \cdot X \quad (\text{equação 2.2})$$

Concentração de produto

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

(equação 2.3)

Algumas expressões encontradas na literatura a respeito da taxa de crescimento microbiano são apresentadas nas Tabelas 2.2 e 2.3.

Tabela 2.2 - Modelos cinéticos de crescimento em função do substrato

Teissier (Citado por Hiss (2001))	$\mu_X = \mu_m \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{-S}{K_S}\right)\right)$
Contois e Fugimoto (Citado por Bonomi <i>et al.</i> (2001))	$\mu_X = \mu_m \cdot \left(\frac{S}{K_S \cdot X + S}\right)$
Powell (Citado por Bonomi <i>et al.</i> (2001))	$\mu_X = \mu_m \cdot \left(\frac{S}{(K_S + K_D) + S}\right)$
Hiss (2001)	$\mu_X = \mu_m \cdot \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \cdot \left(\frac{K_{IS}}{K_{IS} + S}\right)$
Dunn <i>et al.</i> (1992)	$\mu_X = \mu_{m1} \cdot \left(\frac{S_1}{K_{S1} + S_1}\right) + \mu_{m2} \cdot \left(\frac{S_2}{K_{S2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}}\right)$
Megee <i>et al.</i> (1972)	$\mu_X = \mu_m \cdot \left(\frac{S_1 \cdot S_2}{(K_{S1} + S_1) + (K_{S2} + S_2)}\right)$

Tabela 2.3 - Modelos cinéticos considerando inibição pelo substrato.

Aiba e Shoda (1969)	$\mu_X = \mu_m \cdot \frac{S}{(K_S + S)} \cdot \frac{K_P}{(K_P + P)}$
Aiba <i>et al.</i> (1968)	$\mu_X = \mu_m \cdot \frac{S}{(K_S + S)} \cdot \exp(-K_P \cdot P)$
Ghose e Tyagi (1979)	$\mu_X = \mu_m \cdot \frac{S}{(K_S + S)} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)$
Blanch e Clark (1997)	$\mu_X = \mu_m \cdot \frac{S}{(K_S + S)} \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{max}}\right)^y\right)$

A modelagem matemática de um processo deve ser a mais simples e robusta, bem como deve ter boa reprodutibilidade. No entanto vários são os modelos cinéticos utilizados em bioprocessos conforme apresentados pela Tabela 2.2, porém cada modelo tem suas restrições e representa um dado processo.

Dentre as expressões apresentadas a de Aiba e Shoda (1969) é a mais utilizada na fermentação propiônica por se tratar de substrato limitante no crescimento e o produto como inibidor.

Dentre os trabalhos estudados, tem o apresentado pelo pesquisador Goswani e Srivastava (2000a) na qual utilizou o modelo para descrever a fermentação propiônica, através da obtenção dos parâmetros cinéticos, utilizando a lactose como substrato para um processo em batelada alimentada; Goswani e Srivastava (2000b) na qual determinou os parâmetros cinéticos de um processo em batelada para a fermentação propiônica utilizando lactose como substrato; e Coêlho (2011) na qual descreveu o modelo da fermentação batelada através da determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação propiônica em 5 temperaturas do processo. No entanto, pouco se tem encontrado na literatura sobre a modelagem cinética da fermentação propiônica.

2.3 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Separação é a técnica que visa particionar um ou mais componentes de uma mistura (Noble e Terry, 2004). Em processos biotecnológicos, em comparação com os fluxos de alimentação para os processos de recuperação no processamento químico convencional, é um sistema muito mais diluído e resulta da combinação de insolúveis, o fluido nutriente, os metabólitos solúveis, e da biomassa gelatinosa (Dechow, 1989).

A maioria dos caldos de fermentação é instável uma vez que quando o caldo deixa o ambiente controlado e asséptico do fermentador, o crescimento de biomassa a partir de uma cultura será repentinamente privado de oxigênio e vai experimentar uma rápida queda concentração de nutrientes, sendo exposto, portanto, a uma drástica mudança de condições. Isto frequentemente produz uma rápida mudança nas propriedades físicas, levando à destruição de produto desejado (Dechow, 1989).

Tese de Doutorado - Dayana de Gasmão Coêlho

Os vários métodos para o tratamento do caldo de fermentação podem ser divididos em operações mecânicas ou químicas. Como processos físicos de separação têm-se a filtração, centrifugação, cristalização, evaporação, secagem, osmose reversa e a ultrafiltração; e como processos físicos podem ser citados a adsorção, troca iônica, coluna cromatográfica, cromatografia por afinidade, extração com solventes e a eletrodiálise (Dechow, 1989; Noble e Terry, 2004).

3.7.1 Operações mecânicas

3.7.1.1 Filtração

A filtração é normalmente o primeiro passo no isolamento de qualquer produto a partir do caldo de fermentação. Este processo separa as células de biomassa, os detritos celulares e qualquer precipitado a partir do fluido de caldo (Dechow, 1989).

3.7.1.2 Centrifugação

Células em suspensão em meio líquido sedimentam pela ação da gravidade, porém por a partícula sólida se tratar de bactérias, o tempo de decantação deste processo tornaria demasiadamente grande. No entanto, a centrifugação possui vantagens, frente aos demais processos, esta permite efetuar separações que seriam impossíveis em condições gravitacionais; alcança uma sedimentação mais rápida; obtém suspensões de células mais concentradas em relação a original (Geankoplis, 2003; Noble & Terry, 2004).

Centrifugação, embora amplamente utilizados para recuperação celular, não é tão onipresente quanto à filtração. Este processo tem como objetivo aumentar a concentração dos sólidos em suspensão no caldo de fermentação através da força gravitacional por sedimentação (Dechow, 1989).

3.7.1.3 Evaporação

A evaporação é uma operação unitária que tem como finalidade concentrar o fluxo da alimentação pela remoção do solvente através de vaporização do solvente. Os

fluidos fermentativos são fluxos com grandes quantidades de água o que pode colocar em risco a qualidade do produto, podendo ser destruídas ou danificadas, ao serem expostas a altas temperaturas durante um tempo prolongado.

Um exemplo de processos, o qual utiliza a filtração e evaporação do licor fermentado é na purificação de ácido láctico, representando 50% dos custos de produção e produzindo uma grande quantidade de resíduos sólidos (Kumar e Babu, 2006).

3.7.1.4 Cristalização

A supersaturação da solução, que precede a cristalização, é normalmente realizado através da remoção de solvente ou baixando a temperatura da solução. A condução vigor para a formação e crescimento dos cristais está relacionada como grau de supersaturação. Dados de equilíbrio de fase são essenciais na determinação do método mais eficiente de criar o supersaturação da solução e do grau ótimo de supersaturação (Dechow, 1989).

3.7.1.5 Secagem

A secagem tem como objetivo remover a umidade ou solvente das partículas sólidas, enquanto a evaporação é a remoção de umidade ou solvente de uma solução (Noble e Terry, 2004).

A secagem é geralmente a última etapa da recuperação de uma célula de fermentação da biomassa ou outros produtos. A secagem é uma parte difícil do processo de recuperação uma vez que temperaturas elevadas podem causar inativação de calor de materiais. (Dechow, 1989).

3.7.1.6 Processos por membranas

Microfiltração, ultrafiltração e osmose reversa são processos de membrana de separação em que se baseia em diferenças na capacidade de fluir através de uma barreira fina que separa dois fluidos (Dechow, 1989).

3.7.2 Operações químicas

3.7.2.1 Adsorção, troca iônica, cromatografia de coluna, e cromatografia de afinidade

Adsorção, troca iônica, cromatografia de coluna, e cromatografia de afinidade podem ser agrupados como a técnica de recuperação na qual, o composto removido, ou soluto, estabelece um equilíbrio entre os sítios do material sólido e da solução (Dechow, 1989).

Na adsorção, as espécies removidas são ligadas ao material em fase sólida pela polaridade ou ligações químicas fracas. Já a troca iônica recupera o material pela troca de íons entre as fases líquida e sólida. Na cromatografia em coluna pode usar a troca, adsorção de íons ou peneira molecular para separar os solutos que são os primeiros ao sair em uma coluna de separação do material e, em seguida eluída de tal maneira que os solutos individuais são coletados em frações separadas. E na cromatografia de afinidade, as espécies removidas estão vinculadas com um alto nível de seletividade dos ligantes covalentemente ligado a uma matriz sólida (Kumar e Babu, 2006).

3.7.2.2 Eletroforese e eletrodialise

Eletroforese e eletrodialise é a técnica que separam moléculas carregadas ou íons usando um campo elétrico. Eletroforese separa componentes com pequenas diferenças na mobilidade iônica em um campo elétrico usando um fluido transportador em movimento. (Dechow, 1989; Kumar e Babu, 2006).

3.7.2.3 Extração com agente líquido e com agente sólido

Na extração com solvente, o composto removido estabelece uma distribuição de equilíbrio entre solventes imiscíveis, geralmente água e um líquido orgânico.

Desta forma, o soluto que é solúvel em ambas as fases irá distribuir entre as duas fases em uma proporção definida. A separação desejada é conseguida através do ajuste dos parâmetros químicos do sistema: seleção de pH, solvente ou formação de pares de íons (Dechow, 1989; Noble e Terry, 2004).

Vários sistemas de fermentação extrativa, com base na extração com solventes também têm sido estudados para a produção de ácidos orgânicos, pois neste tipo de fermentação a remoção do produto inibitório, ácido do reator, proporciona um melhor controle de pH no reator e resulta em maior taxas de reação. Além disso, os produtos estão presentes em formas relativamente puro e concentrado. Assim, a economia dos custos a jusante de recuperação e purificação pode ser realizado (Kumar e Babu, 2006).

A extração líquido-líquido do ácido propanóico a partir de soluções aquosas foi estudada por diversos pesquisadores (Çehreli, 2005; Kırbaslaret *al.*, 2006; Kırbaslaret *al.*, 2007, Özman, 2006, Hsiehet *al.*, 2008, Bilgin&Arisoy, 2006; Keshavet *al.*, 2008, Keshavet *al.*, 2009, Sólimo *et al.*, 1997; Uslu&Inci, 2007; Wang *et al.*, 2009; Özmen, 2007, Mohsen-Niaet *al.*, 2009). Mas, para ser possível fazer a escolha do agente mais adequado para a extração do ácido propanóico a partir de soluções aquosas, dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido são necessários.

Além de trabalhos com agente de separação líquido também são estudados agente de separador sólido. Segundo Banat (2003), para um número relativamente limitado de sistemas, que existe um sal solúvel e efetivo, maiores vantagens são obtidas no uso do sal, apesar de que as restrições nos limites de solubilidade para a escolha do sal é mais provável que um agente líquido efetivo e solúvel exista para um dado sistema. Sendo sua maior vantagem, no caso de destilação extrativa (Banat, 2003).

3.7.3 Destilação molecular e evaporação de passo curto

O processo de Destilação Molecular foi desenvolvido em meados da década de 30 nos Estados Unidos e na Europa, e somente teve seu desenvolvimento na América Latina, no Brasil, com o trabalho de Batistella(1996) com execução no Laboratório de Desenvolvimento de Processos de Separação (LDPS), da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP (Martins, 2006; Pinto, 2010).

A destilação molecular é a evaporação e condensação a curta distância e como o processo ocorre a alto vácuo, em temperaturas reduzidas e tempo de residência curto

(minimiza as perdas por decomposição térmica) não ocorre o retorno das moléculas da fase vapor para a fase líquida impedindo que se estabeleça o equilíbrio de fases como nos processos convencionais (Martins, 2006; Pinto, 2010; Moraes, 1999).

Estas condições de operacionalidade promove a este processo, uma gama aplicabilidade no fracionamento, recuperação e purificação; direcionando os pesquisadores para estudos através deste processo.

3.7.3.1 Condições de processo

Segundo Martins (2006) quanto maior o peso molecular, maior a temperatura de ebulição, desta forma, como a degradação dos compostos é exponencial com a temperatura e linear com o tempo, o destilador molecular deve ser projetado com o intuito de atender essas condições.

A temperatura de operação do equipamento de destilação molecular é selecionada em função da mistura e das propriedades dos componentes que se deseja separar. Pois, ao se diminuir a pressão do sistema, com alto vácuo (10^{-3} - 10^{-4} mmHg) menor é a temperatura de ebulição da substância (Martins, 2006).

No caso de processos fermentativos, que possuem sais no caldo fermentado, o sal ajuda na separação, pois ele se dissocia em íons na mistura e tendem a atrair as moléculas do solvente mais polar, deixando assim as moléculas do solvente menos polar escapar para a fase vapor alterando as volatilidades relativas (Banat *et al.*, 2003).

O sal dissolvido na mistura líquida se dissocia, e tendem a atrair as moléculas do solvente mais polar, deixando assim as moléculas do solvente menos polar escapar para a fase vapor. Por conseguinte, quanto mais sal é dissolvido no líquido, mais moléculas de água da mistura são atraídas pelos íons de sal formando complexos água/cátions e, portanto, enfraquecendo a interação ácido/água (Banat *et al.*, 2003).

3.7.3.2 Projetos

Existem na atualidade dois tipos de equipamentos que são utilizados no processo, o destilador molecular centrífugo e o de filme descendente (Pinto, 2010).

Destilador molecular de filme descendente

O destilador molecular de filme descendente utiliza a força gravitacional e o sistema de agitação para que o líquido flua através do evaporador (Pinto, 2010).

O líquido a ser destilado é primeiramente submetido a um pré-aquecimento, até a temperatura de alimentação necessária, e alimentada pela parte superior do evaporador. No entanto através da força gravitacional, o líquido escoar pela parede externa do evaporador, onde é parcialmente vaporizado, e o vapor gerado é condensado pelo condensador. Na parte inferior do destilador são recolhidos, através de chicanas, o resíduo e o destilado (Pinto, 2010). A Figura 2.3 mostra os cortes das vistas superior e lateral do equipamento.

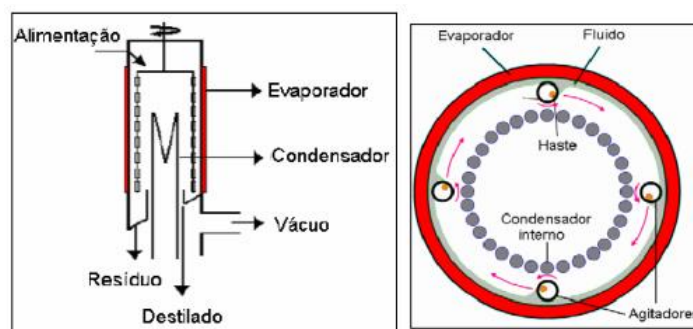


Figura 2.3 - Destilador molecular de filme descendente (a- destilador, b-fluxo de materiais).

A taxa de evaporação provoca um gradiente de concentração de todos os componentes na superfície do líquido, e a taxa de evaporação provoca um gradiente de temperatura na superfície de evaporação no balanço de massa e energia respectivamente. E a partir destes dados pode-se determinar a quantidade de destilado e resíduo resultantes da destilação (Moraes, 1999).

Destilador molecular centrífugo

No destilador molecular centrífugo, o líquido a ser destilado é aquecido até a temperatura de alimentação, desgaseificado em um recipiente anterior ao destilador e entra

num funil cônico, o evaporador. O corpo do equipamento é mostrado na Figura 2.4 (Pinto, 2010; Martins, 2006).

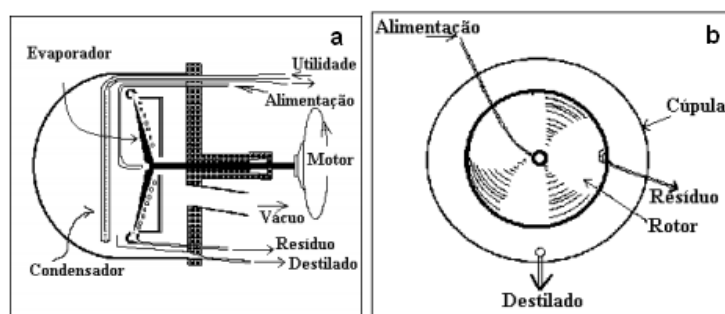


Figura 2.4 - Destilador molecular centrífugo (a- destilador, b-fluxo de materiais).

Ao entrar no sistema o líquido é conduzido até o centro do rotor aquecido que gira a alta velocidade, onde pela força centrífuga gerada pela rotação do disco, o líquido destilante é espalhado na forma de uma película muito fina. Com o fornecimento de calor, as moléculas mais voláteis que se encontram sobre o disco aquecido evaporam, e ao encontram o condensador se condensam na parte inferior do equipamento. Aonde são retirados do sistema; e o líquido restante sobre o evaporador é conduzido até as bordas do rotor, no qual é coletado por uma calha e retirado do sistema (Pinto, 2010; Martins, 2006).

2.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento de experimentos é uma poderosa ferramenta para melhoria de processo onde o resultado depende de diversas variáveis ou da combinação destas. O sucesso de um planejamento de experimentos dependerá em grande parte da forma com que este é estruturado e como será realizado, entender claramente quais são os objetivos de realizar um experimento é necessário antes de qualquer ação para executá-lo (Neto *et al.*, 1996)

2.4.1 Planejamento experimental em bioprocessos

O planejamento de experimentos é uma técnica que através de um número determinado de variáveis e suas variações máximas e mínimas determina a influência quantitativa ou qualitativa destas na variável independente (Bruns *et al.*, 2003).

Existem uma gama de planejamentos que podem ser executados e o que irá definir o planejamento a ser realizado será o número de variáveis e o objetivo de estudo. Os planejamentos, em geral, podem ser divididos segundo Rodrigues e Iemma (2009) em:

1. Planejamento de Plackett e Burman - quando se tem um número extenso de variáveis independentes no processo a ser estudado. Neste caso se calcula os efeitos principais e é obtida uma indicação das variáveis que devem ser incluídas nos delineamentos seguintes, bem como definição da nova faixa que deve ser estudada para cada variável.
2. Planejamento fatorial fracionário e completo – quando o número de variáveis independentes não é muito extenso. É realizado o cálculo dos efeitos principais e indicações das variáveis que devem ser incluídas nos delineamentos seguintes faixas das variáveis.
3. Delineamento composto central rotacional (DCCR) – quando se deseja otimizar o processo. Neste caso se conhece as variáveis significativas do processo e sabe-se o intervalo que possui o seu ponto ótimo do processo e então é realizado o cálculo dos efeitos e análise das superfícies de resposta.

O planejamento de experimentos é, portanto uma técnica que tem sido disseminada em diversos campos de estudo principalmente em bioprocessos por diminuir custos ao se comparar um estudo que utiliza uma variável por vez tais como os trabalhos de Kolichieski e Soccol (1995), Quesada-Chanto *et al.*, (1998), Nascimento *et al.* (2007), Himmi *et al.* (1999), Cofré *et al.* (2012).

Porém, na fermentação propiônica muito se tem estudado sobre o substrato mais adequado para obtenção de um maior rendimento do processo conforme trabalhos realizados por Sherman e Shaw (1923), Leaver, *et al.* 1955, Meyer (1985), Quesada-Chanto *et al.*, (1994), Papoutsakis e Meyer (1985), Zhang e Yang (2009), Zidwick *et al.*(2013), bem como em técnicas para diminuir a inibição pelo produto segundo trabalhos publicados

por Woskow e Glatz (1991), Lewis e Yang (1992b), Solichen *et al.* (1995), porém pouco se tem utilizado a técnica de planejamento de experimentos.

No entanto, sabe-se que a composição do meio de cultura, bem como hormônios de crescimento e os íons são os que conduzem os resultados na formação da maioria dos produtos por organismos. Desta forma, os requisitos qualitativos e quantitativos nutricionais de células precisam ser determinadas para otimizar o crescimento e formação do produto (Shuler e Kargi, 1992). Portanto, dá-se a necessidade de compreender e identificar as variáveis significativas do processo, bem como seus efeitos na resposta do processo, onde o planejamento de experimentos torna-se uma ferramenta bastante útil.

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Foram apresentados neste capítulo a revisão bibliográfica e os principais conceitos a ele pertinentes. Embora a literatura apresente vários relatos de pesquisas realizadas envolvendo a glicerina como fonte de substrato em processos fermentativos, não há trabalho divulgado sobre o processo de fermentação propiônica em processo de anaerobiose parcial bem como o desenvolvimento deste tipo de pesquisa, desde a produção, modelagem e purificação do ácido propanóico utilizando o sistema evaporativo de passo curto. É desta forma que este trabalho se apresenta com uma opção inovadora de processo.

CAPÍTULO III – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA

Neste capítulo é apresentado um estudo das concentrações dos componentes majoritários do meio de cultura visando maximizar a produção do ácido propanóico, através da análise estatística da influência da concentração dos sais $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e KH_2PO_4 , glicerina e extrato de levedura no rendimento, eficiência e conversão na produção do ácido propanóico.

No entanto, foram utilizados intervalos das variáveis com base nos trabalhos apresentados na literatura a cerca da fermentação propiônica e foi realizado o estudo dos efeitos das variáveis que se apresentam estatisticamente significativas, sendo possível definir a condição a ser utilizada na fermentação visando a máxima produção de ácido propanóico.

3.1 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DO ÁCIDO PROPANÓICO ATRAVÉS DO GLICEROL POR *Propionibacterium acidipropionici*

Em virtude do seu alto valor agregado surge o interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos que sejam competitivos ao processo já existente. No entanto, em virtude de parte do alto custo de processos fermentativos estar inserido no custo do meio de cultura é necessária à realização de uma investigação sistemática para a definição do meio mais adequado, neste sentido a utilização de técnicas de planejamento experimentais torna-se uma ferramenta importante.

Levando isso em consideração, empregou-se o planejamento fatorial completo 2^4 , em escala laboratorial, com o intuito de avaliar a influência da concentração dos sais ((NH_4) H_2PO_4 e KH_2PO_4), de glicerina e do extrato de levedura, no rendimento, eficiência e conversão de ácido propanóico na fermentação com base nas faixas das variáveis apresentadas na literatura.

Podemos citar, dentre alguns trabalhos publicados: Barbirato *et al.* (1997) no qual utilizou 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicerina e 1.5 g/l KH_2PO_4 , e obteve uma concentração de 13,6 g/L de ácido propanóico; Goswani e Srivastava (2000a) que utilizou 10 g de extrato de levedura, numa faixa de estudo de 37 g/L a 57 g/L de lactose obtendo uma concentração de 16 g/L a 25.35 g/L respectivamente; Himmi *et al.* (2000) que utilizou o meio de cultura modificado de Lewis e Yang (1992), na qual foi realizado com 20 g/L de glicerina, 10 g/l extrato de levedura e 1.5 g/l de KH_2PO_4 produzindo 12 g/L de ácido propanóico; e Coral (2008) o qual realizou os ensaios com 15 g/L de glicerina, 5 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de (NH_4) H_2PO_4 , obtendo 8.98 g/L de ácido propanóico.

Os trabalhos apresentados acima foram todos em anaerobiose, em temperaturas diferentes, e utilizando substratos diferentes não podendo, portanto ser comparados. Porém, se tratando do meio de cultura pode-se notar a amplitude nas concentrações e a necessidade de um estudo que mantenha essas variáveis constantes para que se possa avaliar a sua

influência na concentração, rendimento, eficiência e conversão da glicerina em ácido propanóico na fermentação propiônica.

3.1.1 Introdução

A utilização de processos biotecnológicos surgiu como fonte alternativa para obtenção de produtos de alto valor agregado e na substituição de matérias-primas não renováveis e desta forma, tem despertado o interesse dos pesquisadores. No entanto, em virtude da baixa eficiência dos processos fermentativos este processo ainda não se tornou um pilar científico. Deste ensejo, surgiu a necessidade do estudo da glicerina como fonte de carbono na produção de ácidos orgânicos através de processos fermentativos.

No entanto, a dependência das condições da fermentação, tais como temperatura, pH, condições de meio de cultivo; bem como a utilização de processos alternativos, processos contínuos, extrativos e a utilização de células imobilizadas são de suma importância para que seja possível maximizar o processo.

Estudos realizados com o intuito de diminuir a inibição do ácido propanóico, tem-se realizado, porém o estudo dos componentes do meio de cultura que possibilite um maior rendimento de ácido propanóico com base nas necessidades do micro-organismo pouco se tem estudado (Feng *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2011, Zhu *et al.*, 2012).

Portanto, o principal desafio para aplicação em larga escala está o custo do processo. Neste âmbito, este estudo visa à simplificação e identificação da significância dos componentes do meio de cultura.

Neste trabalho, foi utilizada a bactéria *Propionibacterium acidipropionici* na fermentação da glicerina para produção do ácido propanóico, tendo como objetivo um estudo preliminar da influência para seleção dos constituintes do meio de cultura na utilização nas demais etapas do processo. Para tanto, foi utilizado, o planejamento fatorial 2^k que se faz útil, quando se deseja conhecer e identificar a influência de determinados fatores sobre o processo (Rodrigues e Iemma, 2009).

O objetivo do estudo é selecionar as variáveis significativas, analisar a influência e determinar os níveis dos fatores ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e KH_2PO_4 , glicerina e extrato de levedura) avaliando o rendimento, a eficiência e conversão do processo através do estudo gráfico e dos resultados impressos no *Software* STATISTICA.

Nos ensaios foi aplicado o planejamento fatorial completo e foram estudados dois níveis de confiança. O estudo foi baseado na interpretação dos valores dos efeitos apresentados no gráfico de Pareto para a seleção das variáveis de estudo do processo.

3.1.2 Materiais e métodos

3.1.2.1 *Micro-organismos e materiais de cultivo*

O micro-organismo utilizado foi a *Propionibacterium acidipropionici* NRRL B-3569 obtido pela Coleção de Culturas da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia. A ativação da cepa foi realizada no meio de cultura, previamente esterilizado em 121 °C e 15 psi por 15 minutos, que tinha como composição: 1 g/L K_2HPO_4 (Ecibra); 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Ecibra); 0,01 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Ecibra); 0,0025 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Ecibra); 0,005 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Ecibra); 0,01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ecibra); 0,01 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ecibra); 10 g/L extrato de levedura (Difco); e 20 g/L glicerina (Chemco). Ao meio foi adicionado o inóculo transferido em tubos de ensaio em 10% (v/v) e posteriormente incubado por 30 h à 30 °C.

3.1.2.2 *Fermentação*

A fermentação em batelada foi realizada na câmara incubadora refrigerada com agitação orbital, “shaker”, (Marconi), no qual o meio de cultura foi distribuído em “Erlenmeyers” de 250 ml na proporção de 150 ml por frasco. Após a esterilização, o meio foi resfriado a aproximadamente 30 °C e inoculado com 10 ml da suspensão ao atingir $A_{660} \approx 0,8$ de absorvância. Sendo, que o tempo final da fermentação para cada ensaio foi definido através da medida de concentração da glicerina e/ou ácido propanóico, quando os mesmos se mantinham constantes no tempo.

Quanto às condições operacionais, estas foram realizadas a 30 °C de temperatura, 150 rpm de velocidade de agitação, e o pH inicial foi ajustado para 6,0, pela adição de NaOH 5 M, conforme estudo realizado por Coêlho (2011).

3.1.2.3 Planejamento experimental

Com o objetivo de aumentar a produção de ácido propanóico, foi realizada uma análise preliminar da influência dos constituintes do meio de cultura utilizando a técnica de planejamento experimental. Contudo, foram analisados os fatores (KH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{HPO}_4$, extrato de levedura e glicerina), através da realização do planejamento fatorial 2^k ($k = 4$).

As variáveis foram avaliadas nos níveis, inferior (-1) e superior (+1), correspondendo a uma variação de $\pm 50\%$ nos valores de cada variável, conforme apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Valores utilizados no delineamento 2^4

Variáveis	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Glicerina (g/L)	x_1	20	40	60
Extrato de levedura (g/L)	x_2	5	10	15
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (g/L)	x_3	1	2	3
KH_2PO_4 (g/L)	x_4	1	2	3

Em virtude da inconstância dos processos biotecnológicos, para a análise estatística, foi avaliado o nível de significância em 10 % inicialmente, e verificada sua validade para tomada de decisão de aumentar para 5 % ou redução da significância para 15 % conforme resultados apresentados no Apêndice II

3.1.2.4 Métodos analíticos

Durante o tempo de fermentação, alíquotas foram retiradas para mensurar a massa celular e as concentrações do ácido propanóico e de glicerina. Para tanto, as amostras foram centrifugadas em 1500 rpm por 10 minutos na qual a massa seca, o centrifugado, foi

determinado por análise gravimétrica; e os ácidos orgânicos e glicerina, presentes no sobrenadante, através da análise de Cromatografia de Alta Performance (HPLC).

Análise gravimétrica

A concentração de células totais foi determinada pela análise gravimétrica. As amostras centrifugadas foram lavadas 3 vezes com água destilada e centrifugadas em 1500 rpm por 10 minutos e o sólido foi transferido para tubos “ependorff” previamente tarados. Logo após, as células foram transferidas para a estufa com circulação de ar e temperatura de 60° C. A aferição da massa foi realizada através de balança analítica de precisão de 5 casas decimais.

Determinação da concentração de ácidos orgânicos e glicerina

O sobrenadante foi utilizado para quantificar as concentrações de glicerina e ácido propanóico, no qual foi filtrado com Membrana GS em éster de celulose com poro de 0,22 µm e 13 mm de diâmetro da marca Millipore, e direcionado para análise em HPLC.

Para as análises das concentrações foram realizadas a diluição necessária das amostras e analisadas pela Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC-“high performance liquid chromatography”) modelo Varian 9010, coluna HPX-87H, mantida em um forno com circulação de ar e temperatura controlada a 35°C, comprimento de onda de 105 nm, com um volume de injeção de 50 µL, e numa taxa de fluxo de 0,6 ml/min. As áreas dos picos foram detectadas através dos detectores UV (ultravioleta) e RI (Índice de refração) montados em série e determinados quantitativamente através do ajuste de curvas dos padrões dos componentes. A fase móvel utilizada foi uma solução de H₂SO₄5mM, preparada com água ultra-pura (Milli-Q) e filtrada com membrana em éster de celulose com 0,45 um de porosidade (Coelho, 2011)

3.1.3 Resultados e discussões

No anexo A encontram-se as equações do estudo estatístico e na Tabela 3.2 apresenta a matriz do planejamento. Para gerar a matriz codificada, foi utilizado como suporte o *Software* STATISTICA.

Tabela 3.2 - Matriz do delineamento 2⁴

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Conversão (%)
1	20(-1)	5(-1)	1(-1)	1(-1)	50,00	62,14	29,00
2	60(+1)	5(-1)	1(-1)	1(-1)	29,68	36,89	35,93
3	20(-1)	15(+1)	1(-1)	1(-1)	59,03	73,37	41,50
4	60(+1)	15(+1)	1(-1)	1(-1)	34,92	43,40	52,50
5	20(-1)	5(-1)	3(+1)	1(-1)	68,29	84,88	41,00
6	60(+1)	5(-1)	3(+1)	1(-1)	16,81	20,90	37,67
7	20(-1)	15(+1)	3(+1)	1(-1)	80,30	99,80	66,00
8	60(+1)	15(+1)	3(+1)	1(-1)	50,67	62,98	37,17
9	20(-1)	5(-1)	1(-1)	3(+1)	57,31	71,24	41,00
10	60(+1)	5(-1)	1(-1)	3(+1)	56,21	69,87	30,83
11	20(-1)	15(+1)	1(-1)	3(+1)	68,66	85,33	67,00
12	60(+1)	15(+1)	1(-1)	3(+1)	62,56	77,75	35,17
13	20(-1)	5(-1)	3(+1)	3(+1)	36,58	45,47	41,00
14	60(+1)	5(-1)	3(+1)	3(+1)	7,93	9,86	48,33
15	20(-1)	15(+1)	3(+1)	3(+1)	78,03	96,98	66,00
16	60(+1)	15(+1)	3(+1)	3(+1)	39,55	49,16	44,67
17	40(0)	10(0)	2(0)	2(0)	26,72	33,21	77,75
18	40(0)	10(0)	2(0)	2(0)	28,9	37,14	66,25
19	40(0)	10(0)	2(0)	2(0)	30,05	37,33	64,50

Nota: *Fatores codificados entre parênteses.

3.1.3.1 Estudo da influência do meio de cultura no rendimento do ácido propanóico

O cálculo do rendimento foi baseado na concentração de reagente consumido (diferença da concentração de substrato final e inicial) e da concentração de produto gerado (diferença da concentração de produto final e inicial), e foi determinado pela equação 3.1.

$$Y_{PS}(\text{rendimento } \%) = \frac{(P - P_0) 100}{S - S_0}$$

(equação 3.1)

A Tabela 3.3 apresenta os efeitos padronizados dos fatores sobre o rendimento do ácido propanóico para um nível de significância de 15 %.

Tabela 3.3 - Efeito do planejamento de experimentos para o rendimento da fermentação propiônica (p = 0,15).

Fatores	Estimativa do Efeito (%)	Erro Padrão (%)	t(2)	p -valor	Estimativa por Intervalo (85%)	
					Limite inferior (%)	Limite superior (%)
Média	46,43	0,39	119,66	0,00007	45,5	47,3
*X ₁	-24,98	0,85	-29,54	0,00114	-13,4	-11,5
*X ₂	18,86	0,85	22,30	0,00200	8,4	20,4
*X ₃	-5,02	0,85	-5,94	0,02716	-3,4	-1,5
*X ₄	2,14	0,85	2,53	0,12695	0,1	2,0

Nota: *Fatores significativos.

Conforme dados apresentados o gráfico de Pareto para p =0,15 está apresentado na Figura 3.1.

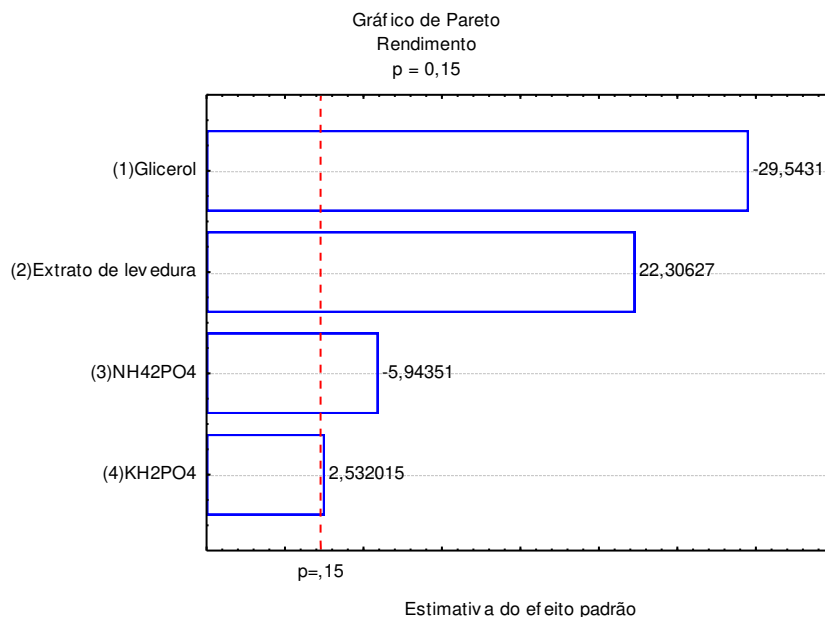


Figura 3.1 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para o rendimento como variável dependente para $p = 0,15$.

Foi obtida uma variação de aproximadamente 8 a 80 % de rendimento do ácido propanóico para um rendimento teórico máximo (rendimento estequiométrico) de 80,4 %, no qual foi observado significância em todos os fatores avaliados.

Através dos resultados obtidos, avaliando a concentração de glicerina e mantendo os demais fatores constantes foi observado nos experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14; 15 e 16 que com o aumento da concentração de glicerina há uma redução no rendimento da fermentação propiônica, conforme o valor do efeito ser negativo, -24,98. Já nos ensaios 9 e 10; 11 e 12 é observado a redução no rendimento é menos expressiva com o aumento da concentração de glicerina, nestes a concentração de NH₄H₂PO₄ é mínima e a concentração de KH₂PO₄ é máxima, concentrações estas que favorecem um maior rendimento no processo, obtidos pelos efeitos de -5,02 e 2,14 respectivamente, propiciando desta forma uma queda menos significativa no rendimento.

Avaliando os pares de ensaios: 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 9 e 11; 10 e 12; 13 e 15; 14 e 16 é observado um aumento no rendimento com o aumento na concentração de

extrato de levedura, mantendo os demais fatores constantes conforme confirmado pela estimativa do efeito ser de +18,86.

3.1.3.1 Estudo da influência do meio de cultura na eficiência do ácido propanóico

A eficiência foi determinada pela razão entre o número de mols do produto formado pelo produto teórico, conforme equação 3.2.

$$\eta \text{ (eficiência \%)} = \frac{(P - P_0) 100}{P_t} \quad \text{(equação 3.2)}$$

A Tabela 3.4 apresenta os efeitos dos fatores padronizados sobre a eficiência do ácido propanóico para um nível de significância de 15 %.

Tabela 3.4 - Efeito do planejamento de experimentos para a eficiência da fermentação propiônica (p = 0,15).

Fatores	Estimativa do Efeito (%)	Erro Padrão (%)	t(2)	p -valor	Estimativa por Intervalo (85%)	
					Limite inferior (%)	Limite superior (%)
Média	57,77	0,53	108,28	0,00008	56,5	58,9
*x ₁	-31,05	1,16	-26,70	0,00140	-33,7	-28,4
*x ₂	23,44	1,16	20,16	0,00245	20,8	26,1
*x ₃	-6,24	1,16	-5,37	0,03297	-8,9	-3,5
*x ₄	2,66	1,16	2,28	0,14921	0,009	5,3

Nota: *Fatores significativos.

O gráfico de Pareto para p = 0,15 está apresentado na Figura 3.2.

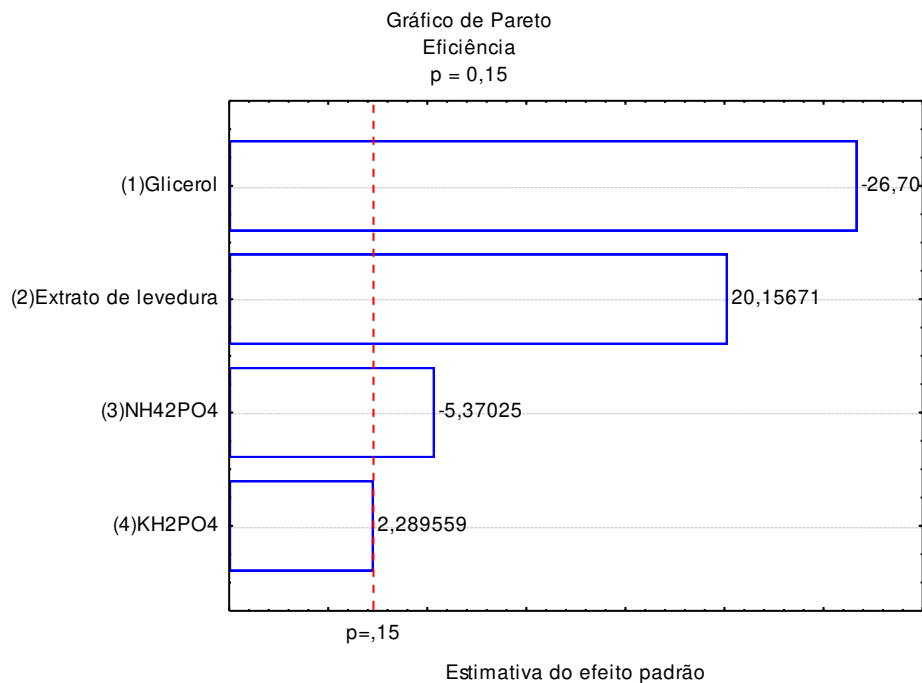


Figura 3.2 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a eficiência como variável dependente para $p = 0,15$.

Conforme os ensaios realizados, foi obtida uma variação de aproximadamente 10 a 99 % na eficiência da fermentação propiônica, na qual os 4 fatores apresentaram significância.

Através dos resultados obtidos, avaliando a concentração de glicerina e mantendo os demais fatores constantes foi observado nos experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 9 e 10; 11 e 12; 13 e 14; 15 e 16 que a diminuição na concentração de glicerina favorece um aumento na eficiência conforme o efeito calculado de -31,05.

Ao se avaliar os pares de ensaios: 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 9 e 11; 10 e 12; 13 e 15; 14 e 16 é observado um aumento na eficiência com o aumento na concentração de extrato de levedura, mantendo os demais fatores constantes conforme a estimativa do efeito ser de +23,44.

Para os sais foi observado um aumento na eficiência com a diminuição da concentração de NH₄H₂PO₄ e com o aumento da concentração de KH₂PO₄ (g/L).

3.1.3.1 Estudo da influência do meio de cultura na conversão do ácido propanóico

Conforme os ensaios realizados, foi obtida uma variação de aproximadamente 29 a 78 % na conversão propiônica, a qual foi determinada pela razão entre a concentração de substrato consumido pela concentração de substrato inicial conforme apresentado pela equação 3.3.

$$X_R \text{ (conversão \%)} = \frac{(S_0 - S) 100}{S_0}$$

(equação 3.3)

A Tabela 3.5 apresenta os efeitos dos fatores sobre a conversão do ácido propanóico para um nível de significância de 15 %.

Tabela 3.5 - Efeito do planejamento de experimentos para a conversão da fermentação propiônica (p = 0,15).

Fatores	Estimativa do Efeito (%)	Erro Padrão (%)	t(2)	p -valor	Estimativa por Intervalo (85%)	
					Limite inferior (%)	Limite superior (%)
Média	48,6	1,6	29,4	0,00115	44,8	52,4
*X ₁	-8,8	3,6	-2,4	0,13489	-16,9	-0,6
*X ₂	13,15	3,6	3,6	0,06736	4,9	21,4
X ₃	6,1	3,6	1,7	0,23147	-2,1	14,3
X ₄	4,1	3,6	1,1	0,36773	-4,0	12,4

Nota: *Fatores significativos.

Conforme dados apresentados o gráfico de Pareto para p =0,15 está apresentado na Figura 3.3.

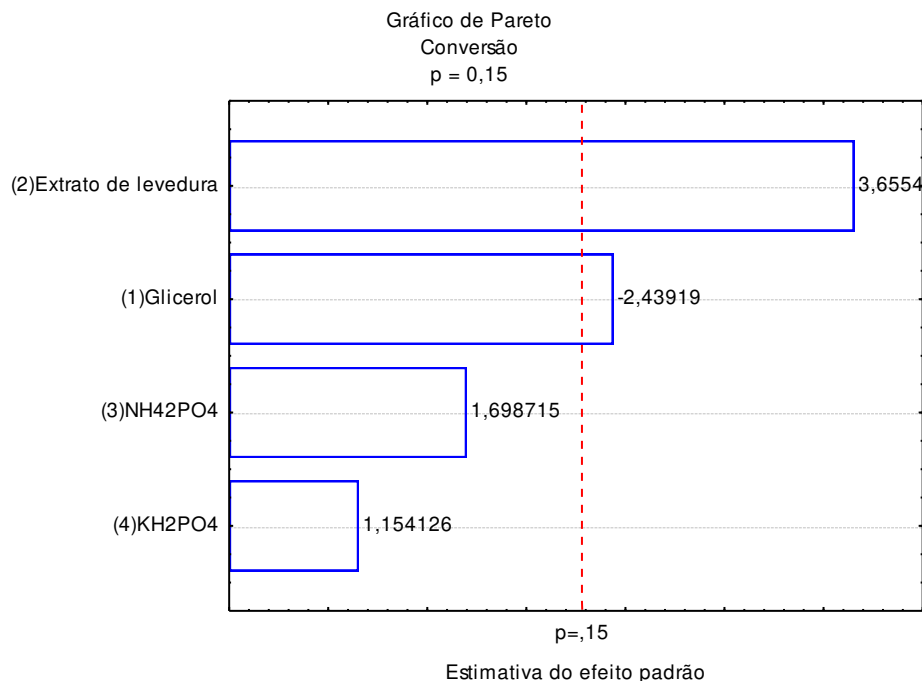


Figura 3.3 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a conversão como variável dependente para $p = 0,15$.

Porém, pode-se avaliar que as variáveis, concentração de glicerina e concentração de extrato de levedura, influenciam na conversão da fermentação propiônica, fato que se afirmam por serem os substratos da fermentação propiônica. Este resultado pode ser avaliado observando o valor da estimativa do efeito de -8,8 para a glicerina e +13,15 para o extrato de levedura, na qual indica que para o aumento da conversão da fermentação propiônica menor deve ser a concentração de glicerina e maior a concentração do extrato de levedura. Já os sais não foram significativos nesta resposta do processo.

3.1.4 Conclusões parciais

Sendo um estudo preliminar, realizado em “shaker” e sem controle de pH, este estudo foi de extrema importância para conhecer o comportamento dos componentes do meio de cultura na fermentação propiônica. Porém, como é inviável a utilização de fermentadores para a otimização do meio de cultura, planejamento DCCR, tendo em vista o número significativo de ensaios e o tempo demasiado para cada fermentação, este não foi

realizado. Porém, apesar de ser um estudo preliminar, foi possível ter uma noção do comportamento dos fatores frente as principais respostas do processo.

Nota-se que para o melhor resultado, em termos de processo, foi possível obter um rendimento de 80,3% na produção do ácido propanóico, uma eficiência de 99,8 %, e uma conversão de 67 % onde a concentração de substrato, glicerina, apresentou-se no nível inferior de 20 g/L, o extrato de levedura em seu nível superior de 15 g/L.

Se tratando dos sais, apesar dos resultados apresentarem que para o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ o seu nível inferior e para o KH_2PO_4 em seu nível superior o processo teria um maior rendimento e uma maior eficiência foi observada nos ensaios que não acontece para todos os pares de resultados em relação aos sais. Devendo, portanto haver interação entre esses fatores. Dessa forma, foram selecionados os valores observando os resultados apresentados em conjunto com o estudo da literatura.

A próxima etapa utilizará a concentração mínima de glicerina (devido a inibição em altas concentrações), concentração máxima de extrato de levedura (para aumentar a concentração de nutrientes). E os sais serão mantidos nas condições de máximo e mínimo para o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e o KH_2PO_4 , respectivamente. Pois, referindo-se ao fosfato de potássio, reportado por Nascimento *et al.* (2007) quando este utilizado em altas concentrações pode ocasionar a redução de metais disponíveis no meio de cultura por precipitação, durante o processo de esterilização, desta forma para uma análise posterior, deve-se utilizar concentrações menores deste sal para aumentar o coeficiente de rendimento do ácido propanóico; ao passo que deve-se conduzir com um aumento na concentração de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, já que o íon amônio, em caso de esgotamento, inibe a absorção de aminoácidos e a assimilação de nitratos.

CAPÍTULO IV – FERMENTAÇÃO DA GLICERINA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPANÓICO

Neste capítulo é apresentado um estudo detalhado a respeito do processo de produção do ácido propanóico com base nos resultados obtidos do estudo do meio de cultura. Portanto, definido as concentrações do meio de cultura, foram realizados dois estudos do processo de fermentação propiônica.

Primeiramente foi realizado um estudo da influência da presença do O₂ na cinética da fermentação propiônica, para tanto foram realizadas bateladas com e sem presença de oxigênio, ambos em duplicata, na temperatura de 30 °C e na concentração de 20 g/L de substrato. Através deste estudo, foi definido o procedimento para a realização do estudo da cinética da fermentação. Neste foram realizados ensaios em 5 níveis de temperatura entre 30 e 36 °C nas concentrações de aproximadamente 20, 40 e 60 g/L totalizando 13 cinéticas do processo fermentativo.

4.1 ESTUDO DA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA PERANTE CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE PARCIAL E ANAEROBIOSE TOTAL

A produção de ácido propanóico utilizando a rota biotecnológica ocorre em processos anaeróbicos, podendo estes ser facultativa ou restritiva, a depender do tipo de micro-organismo utilizado no processo. O objetivo desse estudo é avaliar a influência da restrição do oxigênio na cinética da fermentação propiônica.

Para tanto, foram realizadas dois tipos de fermentação, diferenciadas na utilização do fermentador durante a reação. Uma com restrição total de oxigênio, ou seja, foi adicionado nitrogênio antes e durante a fermentação propiônica para garantir a ausência

de oxigênio; e a outra foi realizada sem adição de oxigênio e nitrogênio, ou seja, foi realizada a fermentação apenas com o oxigênio do ar presente dentro do reator.

4.1.1 Introdução

A fermentação propiônica é o processo de fermentação realizada para a produção de ácido propanóico como produto prioritário. No entanto, vários são os substratos e micro-organismos utilizados com esta finalidade.

O substrato escolhido para o processo de fermentação propiônica foi a glicerina, em virtude de ser uma substância de alto potencial de estudo, principalmente por se um produto de larga produção ao se tratar de um subproduto advindo da rota da produção de biodiesel.

Porém, existe uma gama de micro-organismos que sintetizam a glicerina para a produção do ácido propanóico, tais como: *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermani*, *Clostridium*, dentre outros. O micro-organismo selecionado para este processo foi a *Propionibacterium acidipropionici* que é uma bactéria anaeróbica facultativa, e por ser restrita, surgiu o interesse de avaliar o perfil fermentativo da bactéria expondo a condições diferentes de sistema, condições de anaerobiose e aerobiose.

4.1.2 Materiais e métodos

4.1.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a *Propionibacterium acidipropionici* CTC 4843 (NRRL B-3569), obtida pela Coleção de Culturas da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia e cultivada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

4.1.2.2 Meio de manutenção do micro-organismo

Para a conservação do micro-organismo foi utilizado o meio de RCM (Reinforced Clostridial Medium), OXOID – CM 149 modificado, que tinha como

Tese de Doutorado - Dayana de Gasmão Coelho

composição: 10g/L extrato de carne (Lab-Lenco); 10 g/L peptona(Oxoid); 1 g/L amido solúvel (Synth); 0,5 g/L cloreto de cisteína (Synth); 5 g/L cloreto de sódio (Synth); 3 g/L acetato de sódio (Synth); 0,5 g/L ágar (Merck); 3 g/L extrato de levedura (Oxoid); e 5 g/L glicerol (Chemco). Este foi previamente esterilizado na autoclave em 121 °C e 15 psi por 15 minutos e após atingir a temperatura ambiente foi inoculado na câmara de fluxo laminar e incubado por 30 horas a 30 °C.

4.1.2.3 Ativação do micro-organismo

A ativação do micro-organismo foi realizada no meio de cultura que tinha como composição: 1 g/L K_2HPO_4 (Ecibra); 3 g/L $(NH_4)H_2PO_4$ (Ecibra); 0.01 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Ecibra); 0,0025 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Ecibra); 0,005 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Ecibra); 0,01 g/L $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (Ecibra); 0,01 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Ecibra); 10 g/L extrato de levedura (Oxoid); e 20 g/L glicerina (Chemco). Ao meio previamente esterilizado em 121 °C e 15 psi por 15 minutos, foi adicionado o inóculo proveniente do meio inclinado, o qual foi coletado com alça de platina no interior da câmara de fluxo laminar e transferido para tubos de ensaio em 10% (v/v) de inóculo e posteriormente incubado por 30 horas a 30 °C.

4.1.2.4 Crescimento do micro-organismo

Após a ativação foi realizado o crescimento microbiano através de nova propagação do inóculo para um “Erlenmeyer”. O meio de crescimento foi o mesmo utilizado para a ativação. O “Erlenmeyer” foi mantido em agitação por 30 horas a 30 °C em incubadores do tipo “shaker”.

4.1.2.5 Fermentação

A fermentação em batelada foi realizada utilizando como inóculo, as células obtidas do crescimento microbiano. Para tanto, a solução contida no “Erlenmeyer” foi centrifugada por 15 minutos numa rotação de 4000 rpm, e as células precipitadas eram suspensas em água destilada estéril e centrifugadas por 3 vezes, e completado o volume das células com água para 100 mL. Assim, as células diluídas em água eram adicionadas ao fermentador perfazendo um total de 10 % v/v.

O meio de fermentação foi o mesmo utilizado para a ativação para um volume de 900 ml e esterilizado na autoclave em 121 °C e 15 psi por 30 minutos. Deste meio foram coletadas amostras para análise em HPLC e identificar os picos, garantindo as condições e concentrações a serem realizadas no processo.

Fermentação anaeróbica parcial

A fermentação por anaerobiose parcial ocorreu na presença do ar, portanto esse processo teve como objetivo submeter o micro-organismo em condições de aerobiose, porém sem adição de oxigênio para simular as condições em processos em dornas industriais.

O inóculo foi adicionado no meio de cultura que se encontrava presente no fermentador sob agitação constante de 100 rpm até o término da reação.

Fermentação anaeróbica total

A fermentação anaeróbica ocorreu na ausência de oxigênio. Portanto, o meio de cultura foi esterilizado no fermentador e posteriormente foi adicionado nitrogênio gasoso (ONU 1066) durante 15 minutos em 0,5 L/min. Em seguida foi adicionado o inóculo e, no entanto, foi mantida uma taxa de fluxo de nitrogênio de 0,1 L/min. O fluxo foi reduzido, pois em testes realizados anteriormente foi observado a formação de espuma e também para reduzir os custos com o gás já que o objetivo era o de apenas garantir o fermentador em condições de anaerobiose.

4.1.2.6 Fermentador

As fermentações foram realizadas em duplicatas nos reatores, biorreator Bioflo III - New Brunswick Scientific Co., Inc., e o Bioflo 3000 - New Brunswick Scientific Co., Inc., ambos com volume de trabalho de 1 L. O fermentador possuía um sistema de controle de agitação, temperatura do tipo PID. A agitação foi por turbina de 6 pás planas, numa rotação de 100 rpm; a temperatura foi controlada por recirculação de água na cuba em 30

°C; e o pH foi controlado por sensor previamente calibrado, para um pH de 6,0 utilizando como controlador de base o hidróxido de sódio 10 N.

4.1.2.7 Métodos analíticos

Análise gravimétrica e determinação da concentração de ácidos orgânicos e glicerina

Durante o tempo de fermentação, alíquotas foram retiradas para mensurar a massa celular e as concentrações do ácido propanóico e de glicerina. Para tanto, as amostras foram centrifugadas em 1500 rpm por 10 minutos. No qual a massa seca, o centrifugado, foi determinado por análise gravimétrica; e os ácidos orgânicos e glicerina, presentes no sobrenadante, através da análise de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A concentração de células totais foi determinada pela análise gravimétrica. As amostras centrifugadas foram lavadas 3 vezes com água destilada e centrifugadas em 1500 rpm por 10 minutos e o sólido foi transferido para tubos “ependorff” previamente tarados. Logo após as células foram transferidas para a estufa com circulação de ar e temperatura de 60° C. A aferição da massa foi realizada através de balança analítica de precisão de 5 casas decimais.

O sobrenadante foi utilizado para quantificar as concentrações de glicerina, ácido propanóico e ácido succínico, no qual foi filtrado com Membrana GS em éster de celulose com poro de 0,22 µm e 13 mm de diâmetro da marca Millipore, e direcionado para análise em HPLC.

Para as análises das concentrações foram realizadas a diluição necessária das amostras e analisadas pela Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC-“high performance liquid chromatography”) modelo Varian 9010, coluna HPX-87H, mantida em um forno com circulação de ar e temperatura controlada a 35°C, comprimento de onda de 105 nm, com um volume de injeção de 50 µL, e numa taxa de fluxo de 0,6 ml/min. As áreas dos picos foram detectadas através dos detectores UV (ultravioleta) e RI (Índice de refração) montados em série e determinados quantitativamente através do ajuste de curvas

dos padrões dos componentes. A fase móvel utilizada foi uma solução de H₂SO₄ 5mM, preparada com água ultra-pura (Milli-Q) e filtrada com membrana em éster de celulose com 0,45 um de porosidade (Coelho, 2011)

Analizador elementar CHN

Durante a fermentação alíquotas foram retiradas para a quantificação do carbono, nitrogênio e hidrogênio presentes na amostra.

Esta análise foi realizada na central analítica, na qual foi utilizado o analisador elementar CHN pelo equipamento Perkin Elmer – Serir 2400.

No preparo das amostras, estas foram submetidas a centrifuga em 1500 rpm por 10 minutos. No qual a massa seca, o centrifugado, foi removido e o sobrenadante foi filtrado com Membrana GS em éster de celulose com poro de 0,22 µm e 13 mm de diâmetro da marca Millipore e congelado. Logo após as amostras foram liofilizadas e encaminhadas para a análise.

4.1.3 Resultados e discussões

No estudo das cinéticas microbianas da fermentação propiônica foram realizados experimentos com e sem adição de nitrogênio no processo.

As cinéticas obtidas para o processo, onde não houve adição de nitrogênio, foi denominada de fermentação anaeróbica parcial e a que houve adição de nitrogênio foi denominada de fermentação anaeróbica total e suas duplicatas de 1 e 2. As duplicatas foram realizadas para garantir o comportamento da cinética do processo estudado. As variações das concentrações de substrato na duplicata encontram-se dentro do erro do método da análise quantitativa do HPLC.

Para o processo fermentativo anaeróbico parcial, temos as seguintes cinéticas, apresentadas pelas Figuras 4.1 e 4.2 para os produtos e para a glicerina.

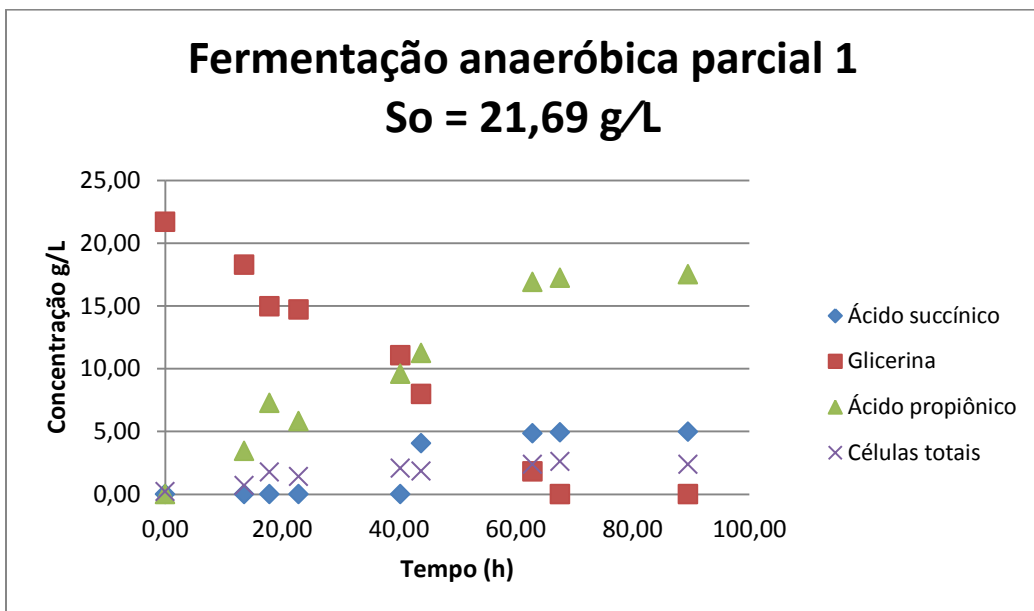


Figura 4.1 - Fermentação propiônica anaeróbica parcial da glicerina para a concentração inicial de substrato de 21,69g/L.

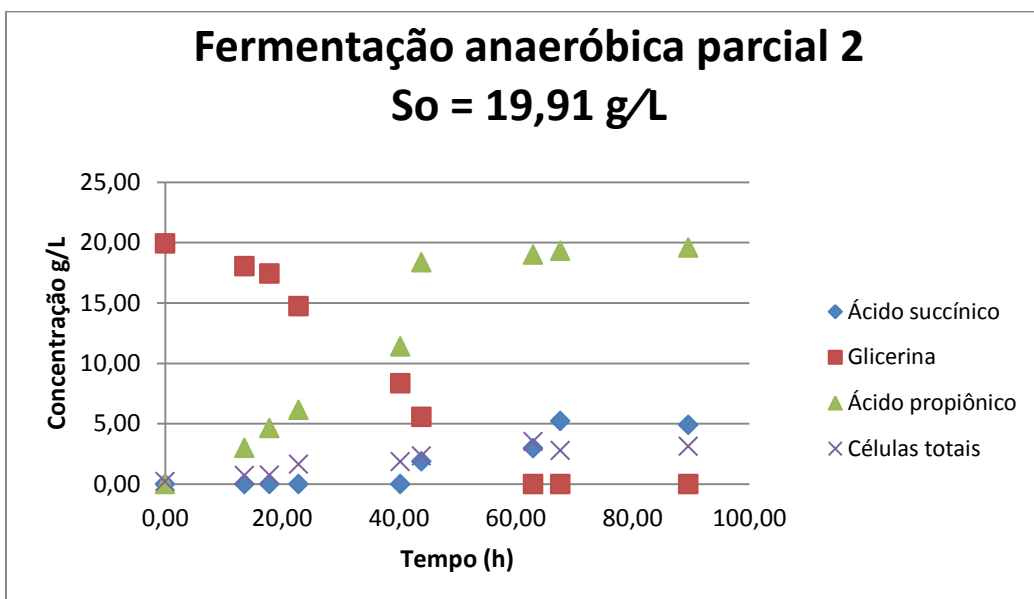


Figura 4.2 – Fermentação propiônica anaeróbica parcial da glicerina para a concentração inicial de substrato de 19,91 g/L.

Conforme Papoutsakis e Meyer (1985) e Barbirato *et al.* (1997) vários são os produtos que a bactéria pode produzir, dentre elas, utilizando como substrato a glicerina os produtos observados na fermentação foram apenas o ácido propanóico e o ácido succínico.

Entretanto, neste processo houve um consumo total do reagente alimentado, a glicerina, ou seja, toda a glicerina foi consumida; e o rendimento do ácido propanóico também é de 100 %, ou seja, a glicerina disponível foi convertida totalmente em ácido propanóico. E uma seletividade de 5,6.

Sabe-se que a agitação propicia a difusão do oxigênio no meio fermentado. Porém, como não houve oxigênio adicional esta transferência de oxigênio no meio foi decrescente, pois a medida que a fermentação ocorria o micro-organismo assimilava o oxigênio dissolvido e não havia entrada dele no mesmo. Direcionando o micro-organismo a uma rota paralela de absorção do CO₂ presente no meio para formação do ácido succínico.

Para um processo fermentativo em condições de anaerobiose total temos as seguintes cinéticas, apresentadas pelas Figuras 4.3 e 4.4 tanto para os produtos quanto para a glicerina.

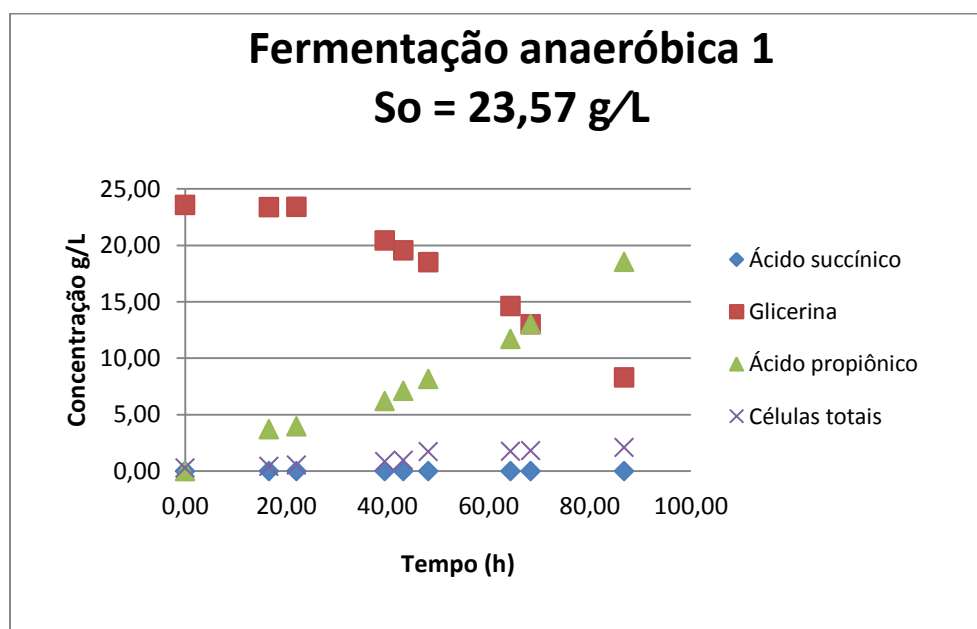


Figura 4.3 – Fermentação propiônica anaeróbica da glicerina para a concentração inicial de substrato de 23,57 g/L.

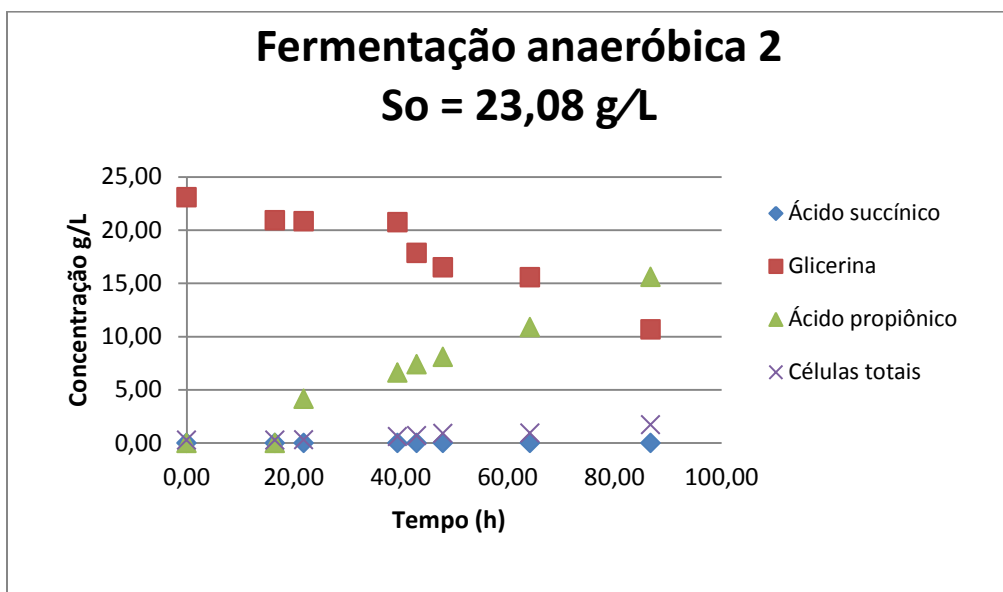


Figura 4.4 - Fermentação propiônica anaeróbica da glicerina para a concentração inicial de substrato de 23,08 g/L.

Na fermentação realizada em condições de anaerobiose foi observada a não formação do ácido succínico. No entanto, a produção de ácido propanóico diminuiu. O que indica que a via de produção do ácido succínico está relacionada com a da produção do ácido propanóico, onde se obtêm um maior consumo da glicerina direcionado tanto para a manutenção do micro-organismo quanto para a formação do ácido propanóico. Para este processo, foi obtida uma conversão de 64,86 % e um rendimento de 98 %.

No entanto, vale ressaltar que apesar deste processo ter obtido um rendimento menor que a do processo anterior, produziu apenas o ácido de interesse. Neste caso, sugere-se que quase ou nenhum CO_2 estiveram presentes na fermentação em condições de anaerobiose, pois segundo Wood e Wekman (1938) o ácido succínico está relacionado com a presença de CO_2 .

Para compreender sobre o consumo de carbono, nitrogênio e hidrogênio do processo foram realizadas as análises de CHN, obtendo como resultados as Figuras 4.5 para o processo de anaerobiose parcial e 4.6 para anaerobiose total.

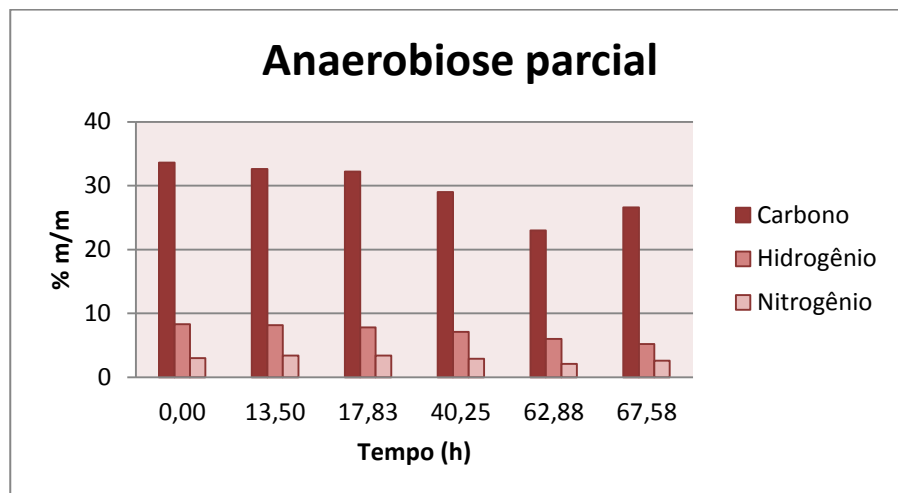


Figura 4.5 - Fermentação em anaerobiose parcial: quantificação de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

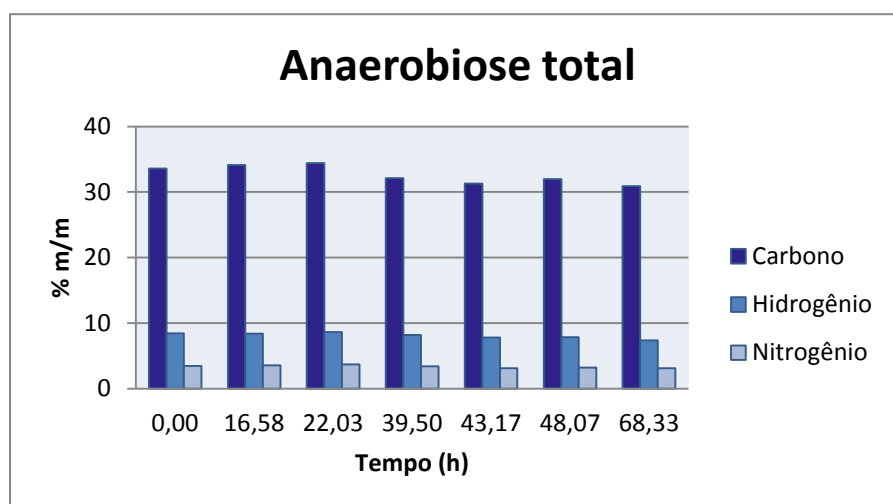


Figura 4.6 - Fermentação em anaerobiose total: quantificação de carbono, hidrogênio e nitrogênio

Este procedimento analítico tem sido bastante utilizado para determinação do C, pois este determina as duas formas: orgânica e a inorgânica.

Através desta análise foi possível observar o consumo de carbono, hidrogênio e nitrogênio, presentes no meio. Desta forma, foi obtido um maior consumo de carbono na fermentação anaeróbica parcial, confirmando os resultados de rendimento do ácido propanóico para este processo, também relatado no trabalho de Bassalo (2013) na qual

Tese de Doutorado - Dayana de Gasmão Coelho

houve uma mudança no fluxo metabólico quando disposto esta bactéria em condições de aerobiose na fermentação a depender da necessidade da bactéria para garantir o balanço redox.

O consumo de carbono, nitrogênio e hidrogênio, quando as concentrações finais de glicerol e ácido propanóico manteve-se constante, para os processos de anaerobiose parcial foram maiores em relação da fermentação que ocorreu em anaerobiose total. Onde foram obtidas as percentagens de consumo da fermentação em anaerobiose parcial em relação a fermentação em anaerobiose total de 159 % para o carbono, 202,03 % para o hidrogênio e 42,44 %, conforme o gráfico apresentado na Figura 4.7.

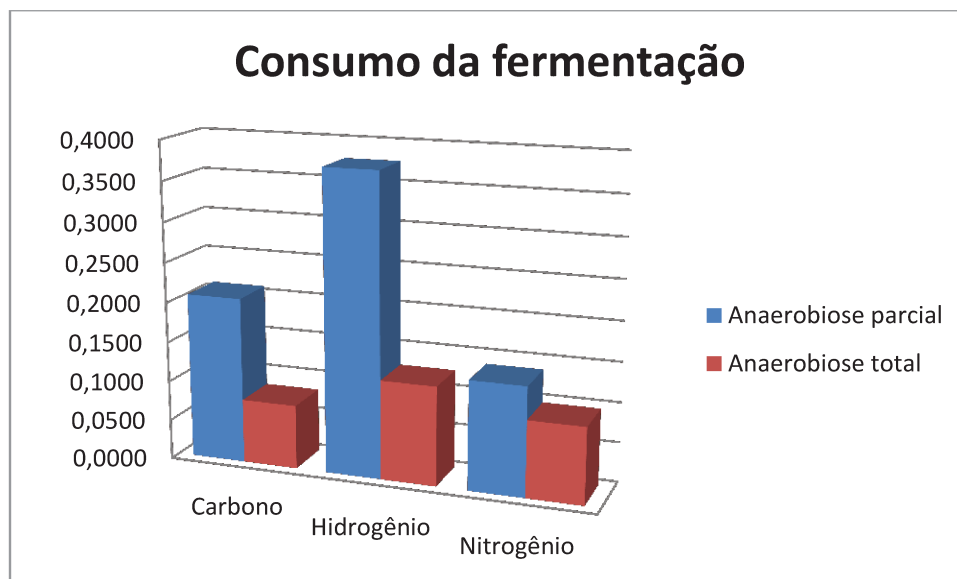


Figura 4.7 - Consumo de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas fermentações em anaerobiose parcial e anaerobiose total.

Ou seja, para um processo em anaerobiose parcial foram obtidos maiores consumos de CHN. Portanto, em virtude do estudo da glicerina pura como substrato ser um degrau para o conhecimento e futura utilização do glicerol proveniente de rejeito industrial, como por exemplo, da indústria de biodiesel, o aumento do consumo dos elementos CHN propicia um processo de maiores rendimentos e, portanto de maiores vantagens e expectativas industriais.

4.1.4 Conclusões parciais

O trabalho avaliou o perfil fermentativo da *Propionibacteria acidipropionici* em condição de anaerobiose parcial e anaerobiose total e foi possível observar a enorme flexibilidade metabólica capaz de redirecionar o fluxo de carbono para outro produto, no caso em questão para produção de ácido succínico, a depender da necessidade de manter o balanço redox. A fermentação anaeróbica parcial utilizando a glicerina como substrato foi capaz de obter um rendimento superior ao observado em condições de anaerobiose total. Além de viabilizar a produção de ácido propanóico em dornas de fermentação aeróbica, o que traria enormes benefícios e viabilizaria a produção do ácido propanóico em sua implantação numa plataforma industrial.

Portanto, como a fermentação anaeróbica parcial apresentou maiores vantagens operacionais e de processo frente à fermentação anaeróbica total, a próxima etapa teve como objetivo, através dos resultados apresentados, avaliar as condições operacionais e os perfis cinéticos utilizando a fermentação aeróbica parcial frente às respostas do processo.

4.2 EFEITO COMBINADO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICERINA NA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA

Através do estudo da fermentação em anaerobiose parcial e anaerobiose total foi definido para os próximos estudos o processo em anaerobiose parcial. Neste trabalho foi estudada a influência da temperatura e da concentração na fermentação propiônica utilizando ensaios em 5 níveis de temperatura entre 30 e 36 °C e concentrações entre aproximadamente 20, 40 e 60 g/L totalizando 13 cinéticas do processo fermentativo.

4.2.1 Introdução

Em processos fermentativos vários são os fatores que influenciam no rendimento do processo e no crescimento do micro-organismo. Estes fatores são: pH, temperatura, meio de cultura, concentração de substrato. Em virtude de já ter sido definido o pH e o meio de cultura, o estudo será direcionado para a temperatura e a concentração de substrato.

Segundo Blanck e Clark (1997) os micro-organismos são classificados de acordo com sua faixa de temperatura de crescimento. A propionibactéria é uma bactéria de classificação mesófila e possui sua faixa ótima de temperatura de crescimento de 30 à 45 °C. Porém, os estudos relacionados a propionibactéria apresentam resultados na escala de 30 a 36 °C, conforme Suwannakham (2005), Molina e Giannuzzi (2002), Zhang e Yang (2009), Himmi *et al.* (2000) e esta foi a faixa de estudo escolhida.

No entanto, é observado também que a fermentação propiônica é inibida pelo ácido propanóico, quando em altas concentrações (Solichien *et al.*, 1995). Desta forma, foi inserida no estudo uma faixa de concentração de substrato de 20 g/L a 70 g/L nos intervalos das temperaturas para identificar o comportamento cinético perante o aumento de concentração de substrato no meio fermentativo.

Portanto, um dos objetivos do presente trabalho é avaliar o perfil cinético da fermentação propiônica nas diferentes faixas de temperaturas e concentrações de substrato.

4.2.2 Materiais e métodos

Os materiais e métodos utilizados seguem aos do item 4.1.2 deste trabalho. Os dados cinéticos que serão apresentados nesse item foram obtidos de fermentações em anaerobiose parcial conforme apresentado no item 4.1.2.6.

4.2.3 Resultados e discussões

São apresentados a seguir os perfis de concentrações de substrato fermentescível pela bactéria *Propionibacterium acidipropionici*, células, glicerina, ácido acético propanóico e ácido succínico para fermentações em batelada, cujas condições iniciais de substrato e temperatura são mostradas nos títulos das Tabelas 4.1 a 4.13.

Tabela 4.1 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 30 °C e S0 =21,11 g/L

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	1,07	21,11	4,73	nd
12,00	2,47	13,55	10,23	nd
18,00	2,83	7,83	11,08	3,89
24,00	3,71	6,30	15,04	5,14
30,00	3,83	2,96	18,91	5,67
36,00	4,37	0,11	19,90	5,88
42,00	4,67	nd	22,56	6,50
54,00	4,97	nd	22,36	5,16
60,00	5,43	nd	22,34	3,89

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.2 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 30 °C e $S_0 = 37,82\text{g/L}$

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,11	37,82	nd	nd
12,00	0,82	35,36	9,12	2,60
18,00	1,71	23,34	11,31	3,53
36,00	4,46	18,25	18,06	4,14
40,00	4,94	12,46	19,39	5,17
60,00	5,53	12,50	25,71	5,57
66,00	6,11	10,46	28,82	6,21
72,00	6,23	8,42	36,70	4,81
90,00	7,39	nd	36,80	4,99

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.3 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 30 °C e S0 = 60,54g/L

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,10	60,54	nd	nd
6,00	0,38	58,82	nd	nd
12,00	0,80	56,56	7,55	nd
18,00	0,90	50,26	7,67	nd
24,00	1,58	48,76	12,42	2,06
30,00	2,50	45,67	14,62	4,43
36,00	2,89	40,32	19,38	4,89
42,00	3,15	35,48	19,16	5,64
48,00	2,94	35,21	24,25	5,30
54,00	3,32	30,87	24,86	6,05
67,00	4,01	28,31	32,15	6,44
72,00	3,94	24,20	29,86	6,43
78,00	3,69	22,40	33,20	6,66
84,00	4,11	22,55	45,15	7,39
90,00	4,16	nd	37,78	8,57
114,50	4,18	nd	43,42	8,24
120,00	4,74	nd	43,76	9,28
138,00	4,93	nd	56,19	10,83

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.4 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 32 °C e S0 = 23,60g/L

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,17	23,60	4,73	nd
6,00	0,37	20,60	10,23	nd
24,25	1,64	15,90	11,08	2,10
30,00	2,35	13,50	15,04	5,14
47,15	3,33	4,34	18,91	5,67
50,30	3,59	2,57	19,90	5,88
53,45	3,67	1,57	22,56	6,50
71,45	3,27	nd	22,34	3,89

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.5 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 32 °C e $S_0 = 48,64$ g/L

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Massa seca	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,76	48,64	nd	nd
16,67	2,11	46,62	nd	nd
19,50	2,61	39,10	10,16	3,54
22,00	2,84	36,34	12,93	5,32
26,50	3,46	33,18	18,96	6,29
40,50	4,58	29,32	21,31	6,92
45,00	4,85	25,93	22,13	7,43
48,00	5,04	18,88	26,60	7,38
64,50	5,41	18,30	29,95	7,48

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.6 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 32 °C e $S_0 = 70,70\text{g/L}$

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	1,27	70,70	nd	nd
6,00	1,75	66,42	nd	nd
14,00	1,80	61,85	nd	nd
18,00	2,75	64,15	9,11	nd
24,00	3,48	59,96	11,86	nd
30,00	4,08	58,99	19,40	nd
36,00	4,10	49,41	18,56	nd
48,00	4,18	41,15	26,40	nd
54,00	5,11	34,23	32,31	nd
67,00	5,21	32,10	35,23	nd
72,00	5,34	31,03	41,08	nd
78,00	5,36	30,22	40,47	nd
84,00	5,53	25,18	41,47	nd
90,00	5,76	17,60	50,93	11,30
114,50	6,64	15,37	54,17	11,86
120,00	6,68	10,43	58,22	12,43
138,00	7,01	8,28	67,31	12,68

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.7 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 33 °C e $S_0 = 43,14$ g/L

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,40	43,14	nd	nd
18,00	1,06	36,82	6,90	nd
22,50	2,08	34,26	9,62	nd
39,92	2,25	27,56	13,53	nd
46,30	2,61	22,76	16,90	nd
64,00	2,84	17,58	21,41	nd
69,50	2,98	14,35	22,55	1,82
88,50	3,04	9,22	27,29	6,50
94,33	3,12	7,91	28,64	7,86
111,58	3,25	4,51	33,48	8,22
118,33	3,56	2,76	33,59	8,70
142,33	4,29	nd	37,86	9,94

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.8 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 33 °C e S0 = 61,37 g/L

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	1,91	61,37	nd	nd
18,00	2,03	58,87	7,16	nd
22,42	2,37	51,19	14,34	nd
39,75	2,40	48,49	15,66	nd
46,25	2,26	42,37	20,24	nd
63,92	2,44	39,32	21,52	nd
69,45	2,46	35,93	25,52	nd
88,45	3,84	33,43	26,09	nd
94,28	4,31	30,15	30,75	nd
111,42	4,60	28,79	31,60	nd
118,25	4,69	23,48	32,59	nd

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.9 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 34 °C e $S_0 = 25,34\text{g/L}$

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,28	25,34	nd	nd
6,00	0,55	20,80	1,47	nd
24,17	1,52	16,31	1,92	1,64
30,00	2,23	11,86	8,54	2,98
47,17	3,53	5,39	13,50	4,15
50,42	3,75	3,31	15,03	5,87
53,67	3,49	1,86	16,85	6,00
71,67	3,35	nd	18,74	9,68

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.10 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 34 °C e $S_0 = 38,46\text{g/L}$

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,47	39,44	4,23	nd
16,50	1,73	37,66	6,63	nd
37,50	1,49	30,14	16,50	nd
40,50	2,18	25,73	19,82	nd
46,50	2,56	22,28	29,22	nd
61,50	2,51	20,64	26,22	3,54
64,50	3,16	16,80	30,43	7,07
70,50	3,53	12,95	35,85	8,06
88,50	4,07	10,72	36,71	8,75
95,50	3,18	9,16	34,03	9,07

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.11 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 34 °C e $S_0 = 66,32$ g/L

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,60	66,32	nd	nd
8,00	0,23	67,66	nd	nd
18,00	1,23	57,68	7,92	nd
22,00	1,04	59,77	9,61	nd
36,00	1,37	50,64	18,25	3,70
40,00	2,51	42,48	28,48	6,35
44,00	2,99	39,74	29,30	6,41
65,50	3,03	36,27	37,27	7,72
70,00	3,95	33,17	37,42	8,11
85,00	4,05	27,33	40,45	8,75
93,00	4,15	26,77	41,93	9,56
110,00	4,93	25,13	40,95	9,53
114,50	5,47	25,66	40,48	9,61

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.12 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 36 °C e $S_0 = 46,19\text{g/L}$

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,90	46,19	nd	nd
22,50	1,58	40,32	10,06	nd
37,50	1,34	31,88	16,12	4,43
40,58	1,55	29,06	20,14	5,35
46,58	1,59	22,55	23,16	6,02
61,67	1,70	21,52	25,56	6,81
64,58	1,90	20,57	26,78	7,28
70,58	2,08	18,72	28,93	7,83
88,67	2,13	17,99	29,04	8,14
94,58	2,27	17,40	28,72	8,30

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Tabela 4.13 - Dados experimentais da fermentação em batelada a 36 °C e $S_0 = 71,83\text{g/L}$

Tempo (h)	Concentração (g/L)			
	Células totais	Glicerina	Ácido propanóico	Ácido succínico
0,00	0,50	71,83	nd	nd
8,00	1,04	66,33	nd	nd
18,00	1,61	63,62	7,65	nd
22,00	1,68	62,63	9,64	nd
44,00	2,10	56,89	17,96	nd
65,50	2,07	47,77	27,39	6,35
70,00	2,18	45,71	29,63	7,16
85,00	2,45	44,21	30,09	7,37
93,00	2,60	41,27	31,29	8,60
110,00	2,99	40,99	30,39	9,34
114,50	3,35	39,08	29,98	8,69
120,00	3,54	40,47	30,65	8,87
128,50	3,63	40,77	30,98	10,26

*nd = não detectável pela análise de HPLC.

Com os dados das cinéticas apresentadas foram calculados o consumo de glicerina, a concentração de ácido propanóico produzido, a conversão e o rendimento da fermentação propiônica e estes estão apresentados nos gráficos apresentados nas Figuras 4.8 a 4.12.

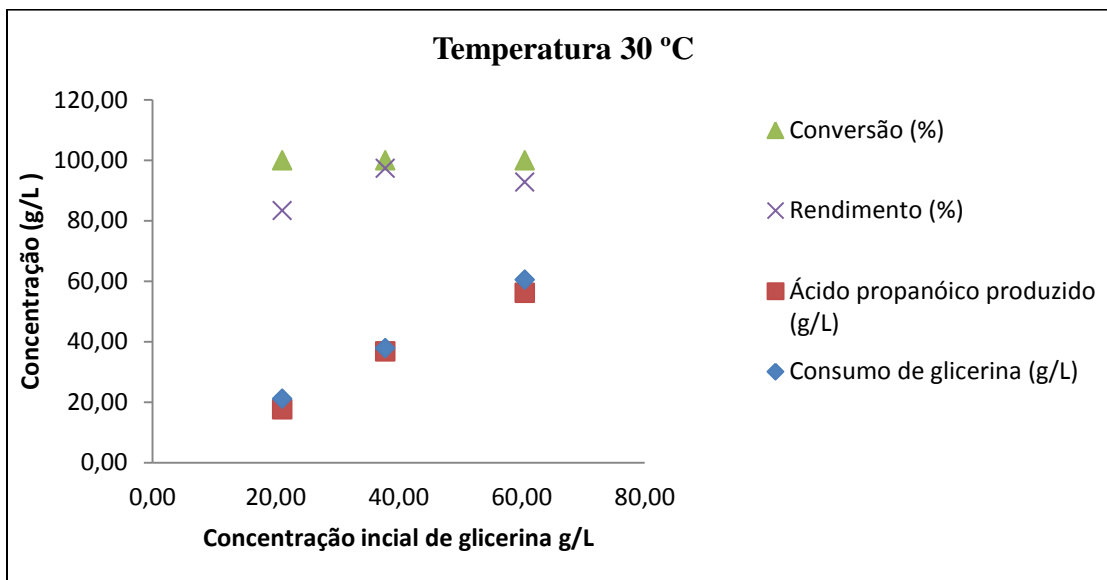


Figura 4.8 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 30 °C.

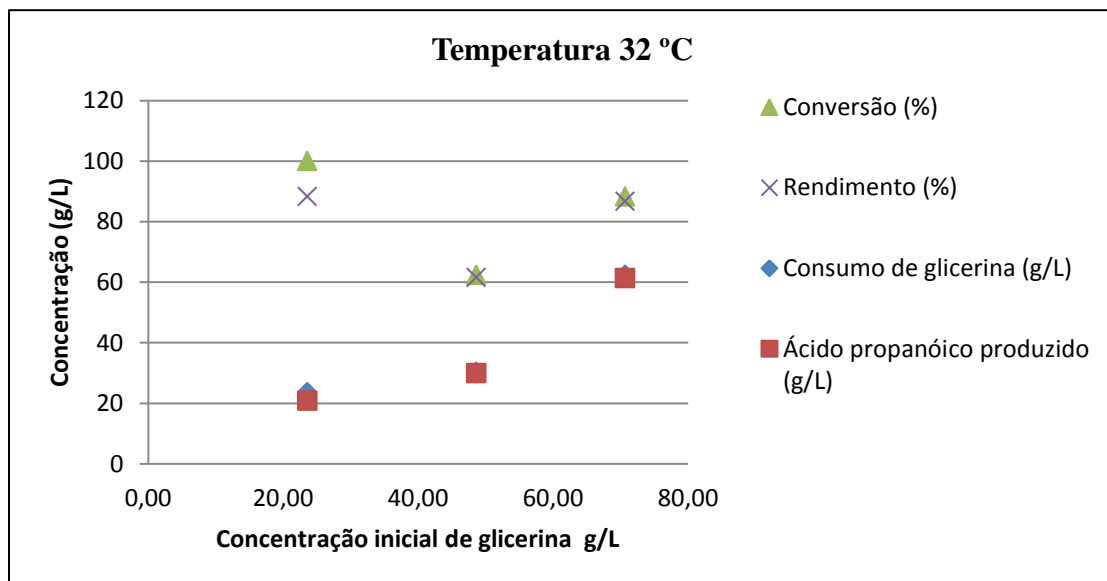


Figura 4.9 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 32 °C.

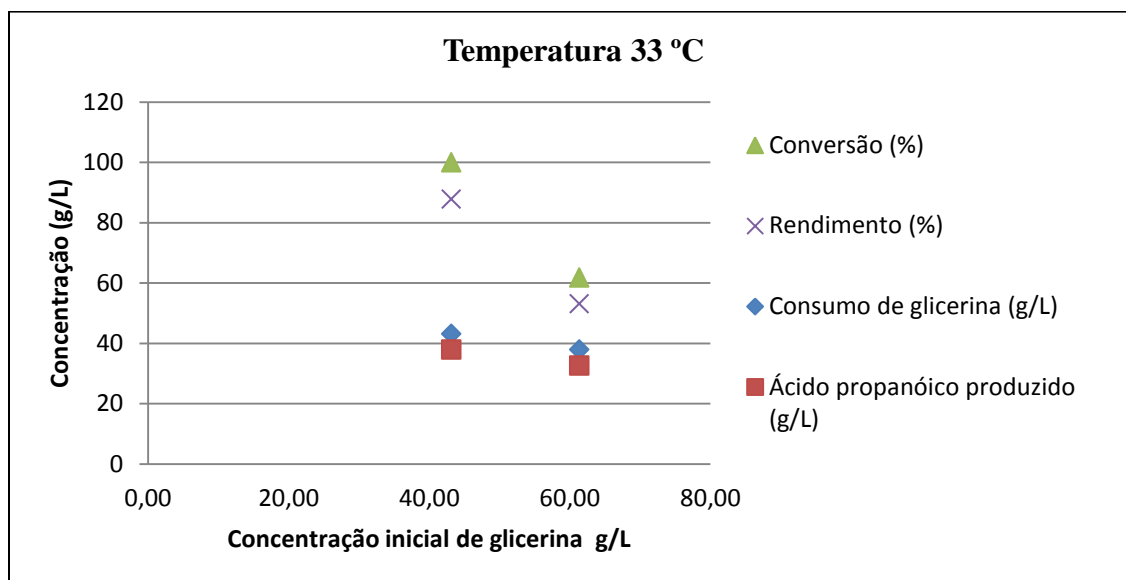


Figura 4.10 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 33 °C.

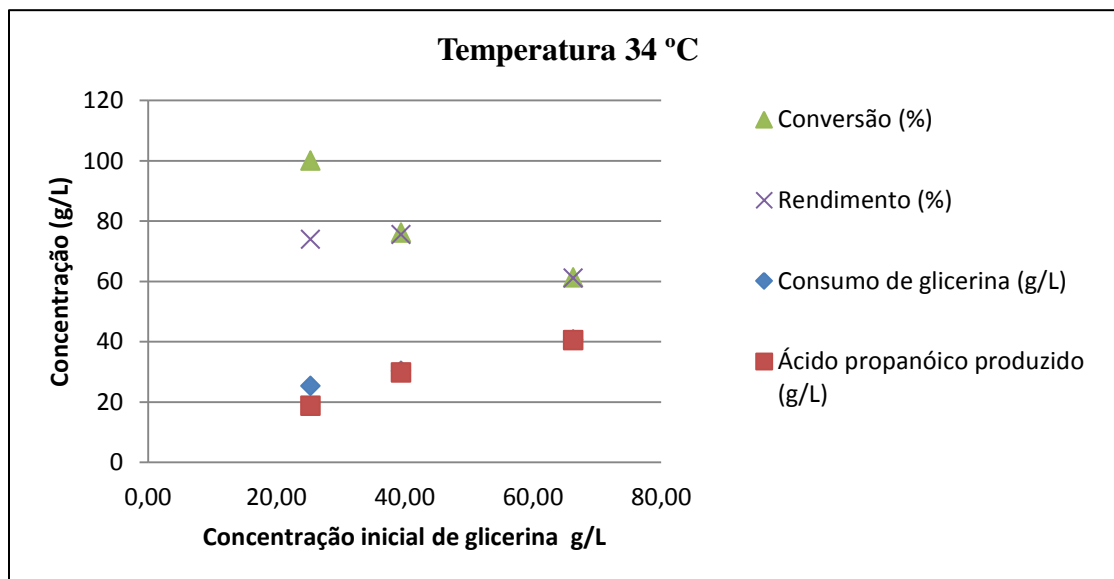
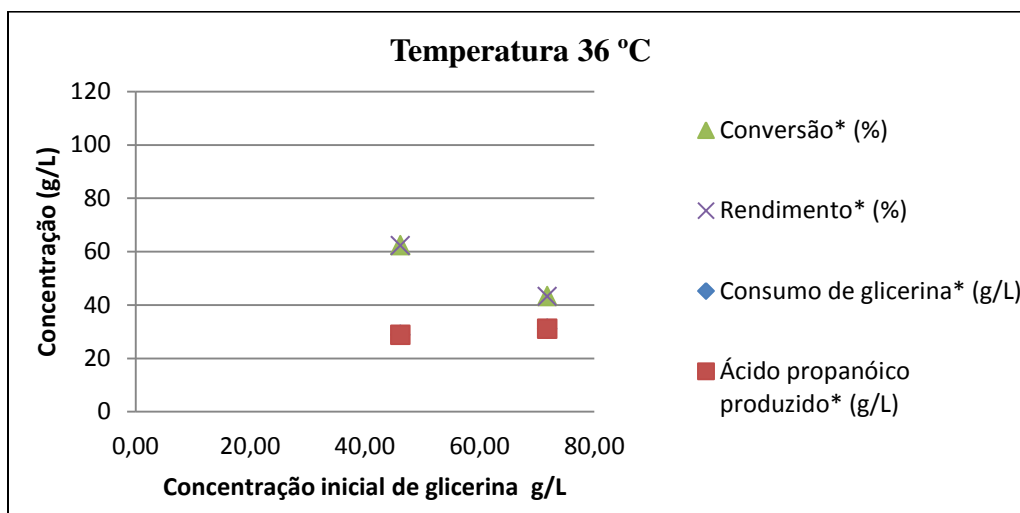


Figura 4.11 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 34 °C.



* Os dados da concentração de glicerina e da concentração de ácido propanóico, bem como da conversão e rendimento se encontram alinhados na Figura, devido à proximidade dos valores.

Figura 4.12 - Consumo de glicerina, concentração de ácido propanóico produzido, conversão e rendimento da fermentação na temperatura de 36 °C.

Houve um aumento no consumo de glicerina e um aumento na produção de ácido propanóico quando a fermentação saltou da concentração de 20 g/L a 40 g/L e logo após foi obtido uma pequena redução ao se aumentar para a concentração de 60 g/L.

Tem-se que a produção do ácido propanóico está associada ao consumo de substrato, ou seja, o micro-organismo utiliza o substrato para a produção de ácido propanóico, e para sua manutenção de formas simultâneas e por esse motivo houve um aumento na concentração de ácido propanóico. Porém, ao se aumentar a concentração de substrato inicial, o consumo deste substrato pela bactéria começa a se reduzir devido a incapacidade da bactéria em metabolizar grandes quantidades deste substrato sofrendo uma limitação por altas concentrações de glicerina.

Pode também ser observado que o aumento da temperatura leva a um menor consumo de glicerina e da produção de ácido propanóico quando se aumenta a concentração de substrato. Ou seja, o consumo da glicerina torna-se mais lento e, portanto a produção de ácido propanóico torna-se mais lenta em virtude de temperaturas superiores diminuírem o fluxo metabólico do substrato na célula.

Avaliando o rendimento do ácido propanóico nas temperaturas estudadas, observa-se que há um aumento deste ao se aumentar a concentração do substrato, porém menor é a conversão da glicerina. Tem-se que, o micro-organismo é limitante em relação ao substrato, então ao aumentar a concentração de glicerina na fermentação propiônica há uma diminuição na conversão da reação, ou seja, nem toda a glicerina é consumida, porém o que é consumido grande parte é convertido em produto aumentando desta forma o rendimento.

4.2.4 Conclusões parciais

O estudo do comportamento cinético é importante para conhecer o processo e obter informações no que diz a respeito ao direcionamento a ser seguido. Para obter um processo com maior conversão e rendimento foram estudadas a temperatura e a concentração inicial de glicerina na fermentação propiônica.

Foi realizado um estudo da temperatura e da concentração inicial de glicerina na fermentação propiônica em um processo em anaerobiose parcial. Deste foram avaliados 5 níveis de temperatura entre 30 e 36 °C, na qual para as temperaturas de 30, 32 e 34 °C foram realizadas bateladas em 3 níveis de concentração entre aproximadamente 20, 40 e 60 g/L e para as temperaturas de 33 e 36 °C foram realizadas bateladas em 2 níveis de concentração entre aproximadamente 40 e 60 g/L totalizando 13 cinéticas do processo fermentativo.

Os resultados obtidos deste estudo foram o aumento na produção de ácido propanóico ao aumentar a concentração inicial do substrato, porém menor é a conversão.

Com a diminuição na conversão implica um meio fermentado mais difícil de separar, pois mais componentes têm no sistema, no caso a glicerina que não reagiu. Dessa forma dentre as temperaturas estudadas a temperatura de 30 °C é a temperatura que mais se adequa ao processo de anaerobiose parcial estudada. A qual apresentou uma conversão de 100% independente da concentração utilizada, sendo o substrato mais facilmente metabolizado pela bactéria devido a baixa temperatura e alcançados os maiores rendimentos, na faixa de 83 a 97 %.

CAPÍTULO V – MODELAGEM MATEMÁTICA

Em processos, uma das etapas mais importantes é o desenvolvimento de modelos matemáticos para que se possa avaliar e atuar no processo quando necessário, bem como compreender o comportamento do mesmo. Porém estes devem ser representativos e ao mesmo tempo simples. Para tanto, tendo as equações matemáticas que representem o modelo se faz necessário otimizar os parâmetros cinéticos.

Portanto, este capítulo tem como objetivo, através do modelo de Aiba e Shoda (1969) e da equação de Arrhenius, determinar um modelo global através da otimização dos parâmetros cinéticos do modelo dependentes da temperatura utilizando algoritmo genético.

5.1 MODELO MATEMÁTICO NÃO ESTRUTURADO PARA A FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA COM CÉLULAS LIVRES NA ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

5.1.1 Introdução

Hoje em dia, a instabilidade do mercado global quando se questiona os riscos sócio - econômicos de uma possível escassez de petróleo, elevou as perspectivas para as alternativas que têm caráter ambiental. Por isso, com base nestes pontos a produção de ácido propanóico por processos biotecnológicos foi discutido por pesquisadores em oposição a síntese química. Levando isso em consideração o uso de glicerol como matéria-prima, tem sido bastante estudados, pois é uma fonte verde e atualmente acompanhada por uma grande oferta no mercado, devido à sua produção em larga escala como subproduto da indústria do biodiesel. A fim de tomar decisões sobre o desenvolvimento de um processo eficiente, é muito útil ter um modelo matemático representativo. Com isto em mente, foi utilizado o algoritmo genético para a estimativa dos parâmetros cinéticos do modelo em função da temperatura.

5.1.2 Materiais e métodos

Neste trabalho é proposto um modelo matemático determinístico não-estruturado e não segregado da fermentação propiônica utilizando a glicerina como substrato com células livres de *Propionibacterium acidipropionici* para a estimativa dos parâmetros cinéticos em função da temperatura.

Para a realização da modelagem considerou-se que apenas a glicerina foi convertida em produto, formando exclusivamente o ácido propanóico.

Foi realizada a modelagem seguida da otimização dos parâmetros cinéticos. Para a resolução das equações diferenciais ordinárias foi utilizado o método de Runge-Kutta de 4º ordem e para a otimização dos parâmetros foi utilizado o algoritmo genético.

O modelo é representado por três equações diferenciais ordinárias que representam a concentração de biomassa, o ácido propanóico, a glicerina como mostra as equações (5.1, 5.2 e 5.3).

Concentração de biomassa:

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad (\text{equação 5.1})$$

Concentração de glicerina:

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (\text{equação 5.2})$$

Na qual, $\mu_s = Y_{s/x}\mu_x + m_x$

Concentração de ácido propanóico (Pirt, 1996):

$$\frac{dP}{dt} = r_p$$

Na qual,

$$\mu_P = \mu_x \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} + m_p$$

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

(equação 5.3)

O modelo de Aiba e Shoba (1969) modificado inclui os termos de inibição do produto, e substrato limitante e por isso foi escolhido esse modelo para representar o processo conforme análises dos capítulos anteriores.

A taxa cinética pode também ser escrita conforme equação 5.4 :

$$\mu_x = \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P}$$

(equação 5.4)

5.1.2.1 Avaliação dos parâmetros do modelo

Para a otimização do parâmetro cinético otimização aplicados foi aplicado o algoritmo genético com precisão de 10^{-4} , e usou o método de Runge-Kutta de 4 ° ordem para as equações de 5.1 a 5.4. Ambos os algoritmos, estimativa de parâmetros e simulação, foram implementados em MATLAB versão 7.0 linguagem de programação. A expressão dos parâmetros cinéticos em função da temperatura foi obtido por dupla exponencial de Arrhenius, representada pela equação 5.5 (Andrade, 2000)

$$\text{Parâmetros } (Y_{P/S}, Y_{X/S}, \mu_m) = A \exp\left(\frac{B}{T}\right) + C \exp\left(\frac{D}{T}\right) \quad (\text{equação 5.5})$$

Para isto, como a representação destes sistemas deve ser em números binários deve conhecer o intervalo das variáveis. Assim, eles vão ser definidos pelo número de bits que serão utilizados. Se for usado para k bits a variável x_i , na qual trabalha numa faixa $[inf_i, sup_i]$, na qual é definida como precisão máxima que esta variável pode ter pela equação 5.6, e a conversão do correspondente inteiro r_i pelo número binário pela equação 5.7.

$$\frac{\sup_i - \inf_i}{2^k - 1} \quad (\text{equação 5.6})$$

$$\text{real} = \inf_i + \frac{\sup_i - \inf_i}{2^k - 1} * r_i \quad (\text{equação 5.7})$$

O modelo foi ajustado com base nos dados cinéticos experimentais: a concentração de substrato, concentração de células, e a concentração de ácido propanóico, tudo em função da temperatura. No entanto, as equações foram resolvidas simultaneamente e como critério de concordância entre os valores obtidos pelo modelo e os dados experimentais, que minimizam a soma dos quadrados pelo método dos mínimos quadrados representado pela equação 5.8.

$$F = \sum_{i=1}^N |Y_{i\text{model}} - Y_{i\text{exp}}|^2 \quad (\text{equação 5.8})$$

Na qual, $Y_{i,\text{model}}$ é o valor da variável obtida pelo modelo, e $Y_{i,\text{exp}}$ é o valor da variável dos dados experimentais e o subíndice i é a variável dinâmica tempo.

5.1.3 Resultados e discussões

5.1.3.1 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros iniciais para a determinação dos parâmetros cinéticos estimados m_p, m_x, k_s, k_p são mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Parâmetros independentes da temperatura que foram estimados.

Variáveis	Valores das constantes
m_p	0,35376
m_x	0,37283
k_s	0,37243
k_p	0,045823

Com o objetivo de obter um modelo que se adequasse a maioria dos dados experimentais e apresentados no item 4.2 foi escolhido os valores intermediários de cada temperatura para a obtenção do modelo, em virtude de possuir muitas cinéticas e o tempo de processamento ser grande. Dessa forma buscou-se um modelo que englobasse as temperaturas estudadas. Os valores dos parâmetros cinéticos em função da temperatura utilizando algoritmo genético estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Parâmetros da equação de Ahrenius.

Parâmetros	A	B	C	D
$y_{x/s}$	0,05963	0,028	0,0206	0,0118
$y_{P/s}$	0,05819	0,0258	0,0820	0,0112
μ_{max}	11,4231	5,19148	8,02421	7,7903

Os perfis cinéticos para esses parâmetros nos níveis intermediários de concentrações estão apresentados nas Figuras 5.1 a 5.5

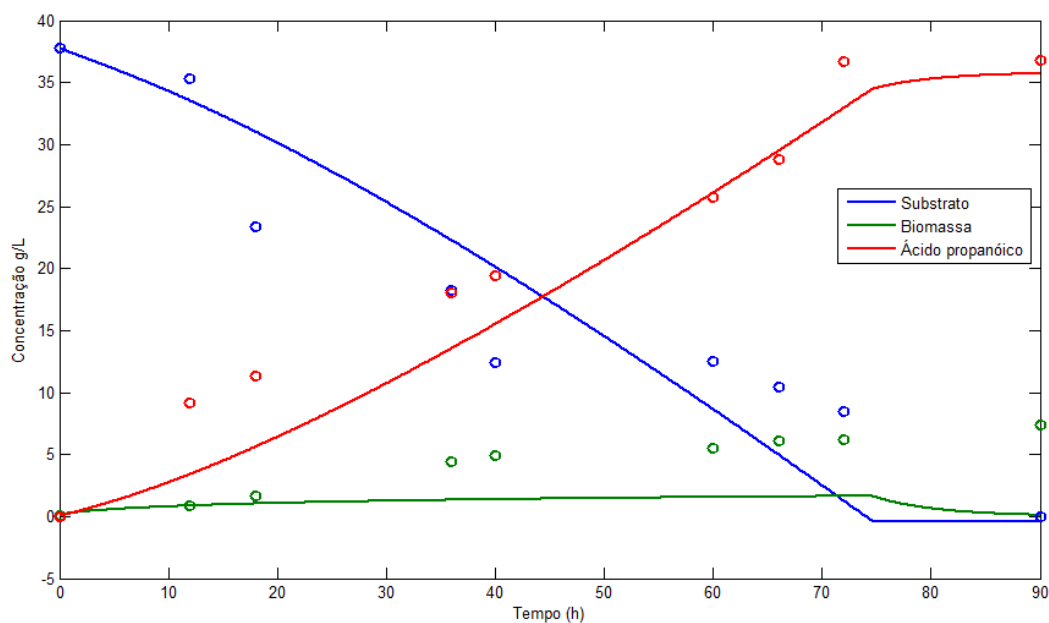


Figura 5.1 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (□) células e (○) glicerina na temperatura de 30 °C e concentração inicial de 37,82g/L

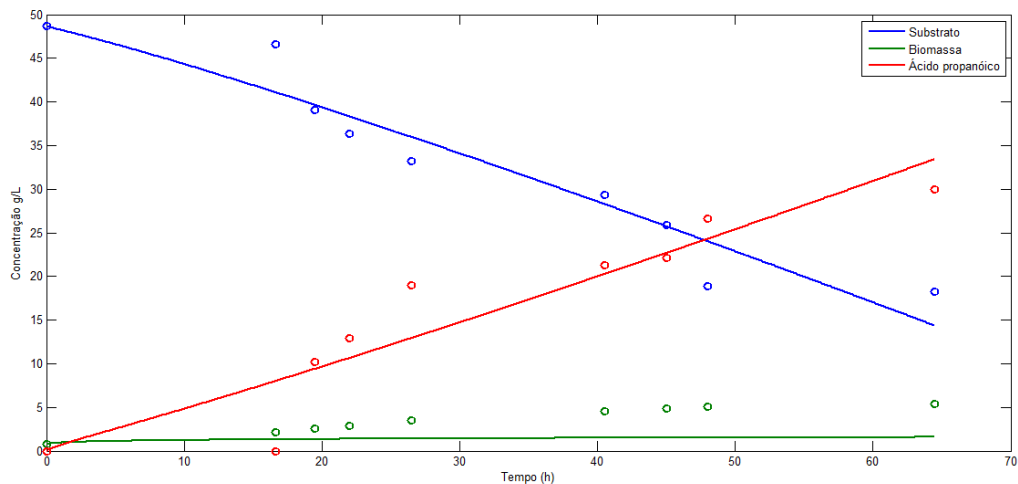


Figura 5.2 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (◻) células e (○) glicerina na temperatura de 32°C e concentração inicial de 48,64g/L

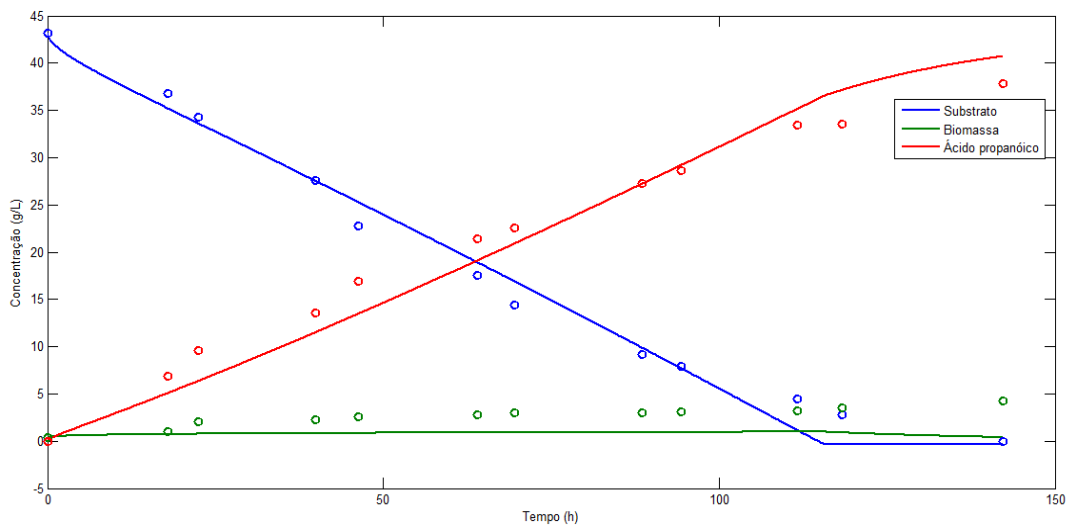


Figura 5.3 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (◻) células e (○) glicerina na temperatura de 33°C e concentração inicial de 70,70g/L

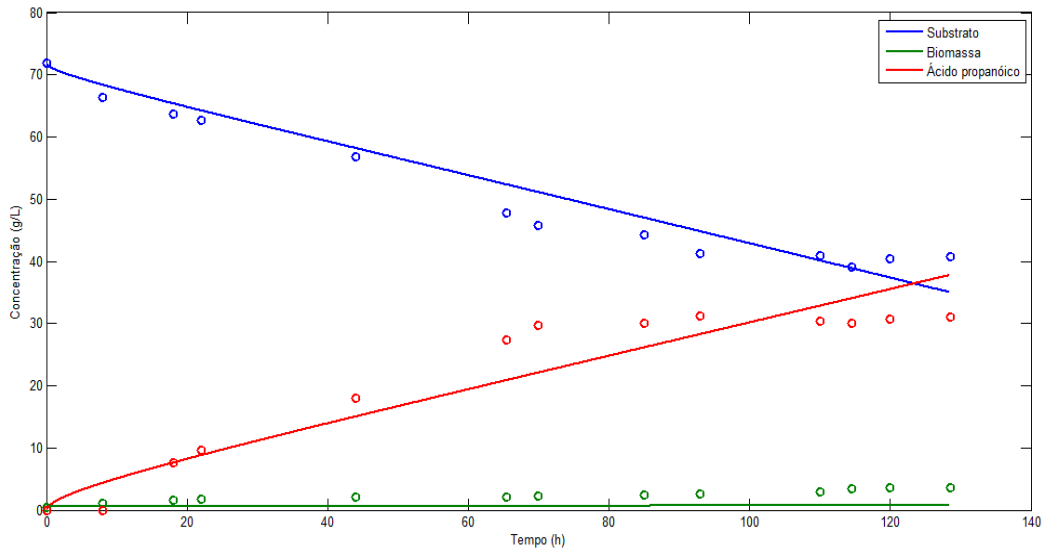


Figura 5.4 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (◻) células e (○) glicerina na temperatura de 34°C e concentração inicial de 25,34 g/L

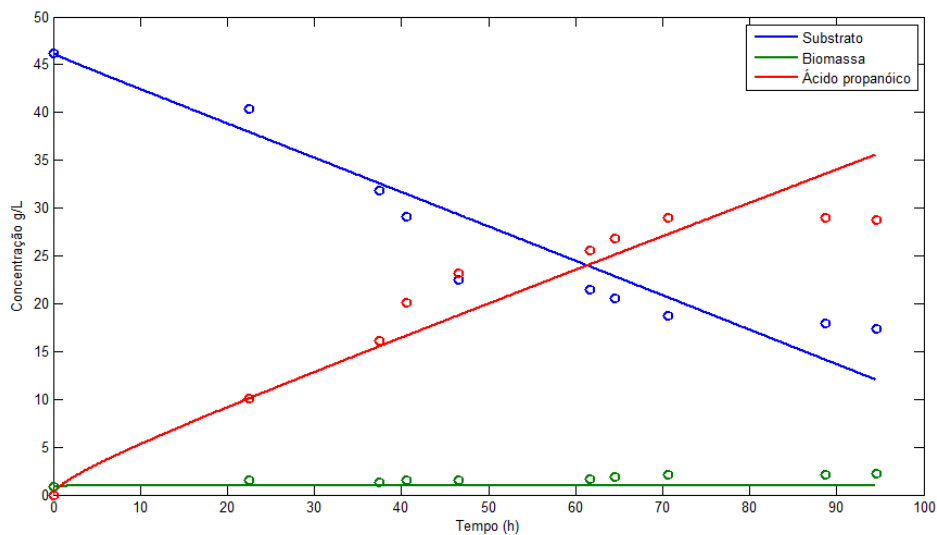


Figura 5.5 - Comparação do modelo experimental e do modelo predito para as concentrações de (+) ácido propanóico, (◻) células e (○) glicerina na temperatura de 36°C e concentração inicial de 46,19g/L

Para este estudo for possível obter os parâmetros em função da temperatura utilizando dados experimentais e pode-se obter um modelo que representasse o processo na faixa de temperatura estudada.

No entanto, para a obtenção de um modelo mais global e representativo é necessário um modelo mais robusto. Uma alternativa seria a utilização de redes neurais para o ajuste dos parâmetros do modelo.

5.1.4 Conclusões parciais

A avaliação cinética do processo foi estudada experimentalmente e os parâmetros cinéticos foram calculados para o modelo não estruturado e não segregado através do método de otimização por algoritmo genético.

No que diz respeito a este mecanismo de reação observou-se uma reação de inibição. No entanto, o ácido propanóico produzido por fermentação da glicerina, é um substrato viável quando comparado com outras fontes de carbono e pode-se mostrar que é possível obter altas concentrações de ácido propanóico através do estudo das variáveis do processo. E então, este estudo demonstrou a necessidade da representação do modelo para a avaliação do processo, bem como se mostrou eficaz o uso do algoritmo genético como um método de otimização dos parâmetros dos modelos, o qual foi possível obter modelos com boa reprodutibilidade do processo.

CAPÍTULO VI–SEPARAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

Neste capítulo são apresentadas as etapas para a separação do ácido propanóico do meio fermentado. O intuito desta etapa foi estudar um processo alternativo para a separação do ácido propanóico do meio fermentado aumentando sua concentração em uma das correntes do processo de evaporação

Os processos de separação abrangem, portanto os processos realizados com o meio fermentado após a fermentação propiônica. O presente estudo apresenta a avaliação da purificação do ácido propanóico utilizando um sistema evaporativo, apresentando as etapas do processo de separação que compreende a priori o tratamento do caldo bruto através do processo de separação sólido-líquido do meio fermentado e a posteriori o processo de separação líquido-líquido utilizando a evaporação de passo curto.

6.1 AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO PROPANÓICO UTILIZANDO UM SISTEMA EVAPORATIVO DE PASSO CURTO

A utilização de processos biotecnológicos como alternativa aos processos químicos já existentes tem se intensificado ao longo dos anos. Porém o maior obstáculo para garantir a viabilidade do processo encontra-se na obtenção de um processo de separação de baixo custo, principalmente por se tratar de uma solução diluída, dificultando o processo de separação e purificação do produto desejado.

Assim, foi apresentado um processo alternativo de separação do produto, ácido orgânico, do caldo de fermentação utilizando o evaporador de passo curto.

O procedimento abrangeu as seguintes etapas: procedimento inicial para tratamento do caldo e a separação líquido-líquido do caldo fermentado tratado (evaporador de passo curto de filme agitado) com um estudo prévio utilizando meio sintético.

6.2.1 Introdução

A escolha da técnica adequada para a separação e purificação do caldo da fermentação está relacionada com os seguintes itens: a localização do produto, intracelular ou extracelular; e o destino e aplicação do produto final. Desta forma a estabilidade química e a solubilidade do produto vai ditar a técnica mais adequada de recuperação, em virtude da maioria dos produtos microbiológicos induzir a severas restrições a temperatura, aos reagentes e aos níveis de pH (Dechow, 1989).

Vários são os métodos de separação estudados para a recuperação do ácido propanóico, neste âmbito tem-se a separação por solventes, separação com adição de sal, porém ambos têm gastos na recuperação do solvente seja ele líquido ou sólido.

Desta forma, o evaporador de passo curto surge como uma alternativa para o processo de separação, pois se realiza em temperaturas reduzidas e um período curto de exposição do material à temperatura de operação.

6.2.2 Metodologia experimental

Para o estudo do processo de separação o caldo de fermentação foi inicialmente tratado, para a separação dos sólidos e para a liberação do ácido propanóico e posteriormente foi direcionado para o evaporador de passo curto.

6.2.2.1 Preparação do meio fermentado

O objetivo desta etapa é preparar o meio fermentado para a separação. No entanto foi promovida a separação sólido-líquido para a separação do caldo fermentado da biomassa e a posterior liberação do ácido no caldo tratado pela reação de neutralização.

Nesta etapa o caldo fermentado bruto, logo após o fim do processo fermentativo, foi submetido a dois processos físicos para separação da biomassa do meio fermentado, conforme apresentado na Figura 6.1.

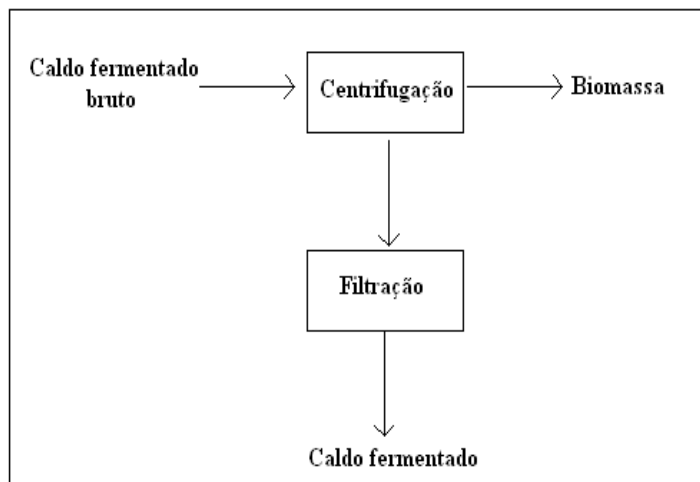
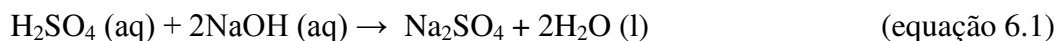


Figura 6.1 - Esquema do tratamento do caldo fermentado.

Desta forma, foi utilizado o processo de centrifugação para o tratamento do caldo fermentado bruto. Este foi destinado para a centrífuga para a remoção/separação da biomassa. Este, ficou por 15 min numa rotação de 8000 rpm. O sobrenadante, contendo o produto desejado, foi removido para as demais etapas.

Posteriormente foi realizado o processo de filtração, precedido da reação de neutralização para posterior remoção do sal.

A reação de neutralização surge da reação de um ácido com uma base originando como produto sal e água. Conforme apresentado pela equação 6.1



Para este processo foi realizada a acidificação do meio fermentado com o ácido sulfúrico até atingir pH 2,6 para garantir que toda a base (utilizada na fermentação para controle do pH) fosse removida do meio fermentado.

Após a neutralização do hidróxido com o ácido sulfúrico é necessária à remoção do sulfato de sódio. Para tanto, foi realizado o processo de filtração.

Portanto, o sobrenadante do meio fermentado bruto foi disposto no sistema de filtração a vácuo com membrana ptfé para solventes orgânicos de 0,45 µm de diâmetro de poro. No qual, o filtrado passou pelo sistema e o Na₂SO₄ foi removido do processo.

Após a filtração, o caldo fermentado foi resfriado a aproximadamente 5 °C, aproximadamente para evitar sua degradação, pronto para ser utilizado para o estudo por evaporação de passo curto.

6.2.2.1 Separação por evaporação de passo curto

Em virtude de se tratar de um processo a pressões inferiores a 100 mbar foi utilizado o evaporador de passo curto.

Foi utilizado o evaporador do tipo filme agitado com vazão de alimentação de 10 ml/min e velocidade de agitação de 750 rpm, conforme apresentado pela Figura 6.2.

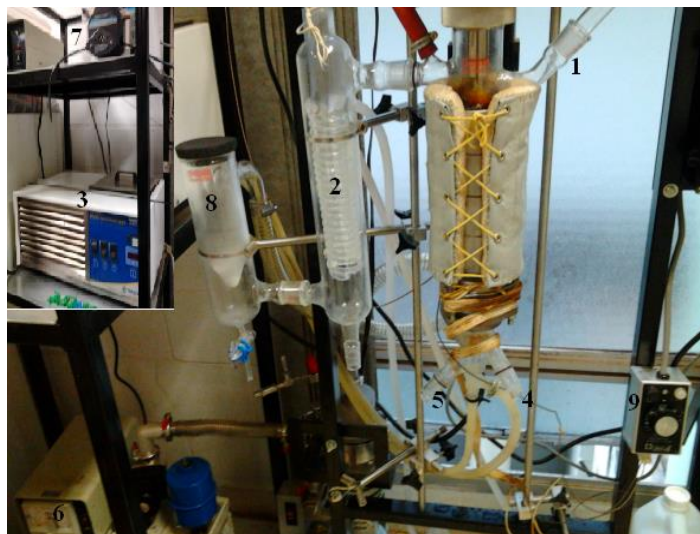


Figura 6.2 - Evaporador de filme agitado (1- Alimentação; 2 - Condensador externo; 3 – Sistema de resfriamento/aquecimento; 4 - Coletor de Resíduos; 5 - Coletor de Destilado; 6 - Sistema de Vácuo; 7 – Controle da vazão de alimentação; 8 – Condensador externo, trape; 9 – Rotor do evaporador.

6.2.2.2 *Estudo experimental*

Com o objetivo de estudar o comportamento da separação do composto, água/ácido propanóico frente à evaporação de passo curto, foram realizadas variações na temperatura do evaporador de 50 °C à 150 °C, com pressão de 100 mbar, utilizando o meio sintético. Além disso, foram realizados estudos da influência da temperatura, variando de 110 °C e 130 °C utilizando o caldo de fermentação.

Meio sintético

A produção de ácido propanóico por fermentação é um processo demorado, dependendo da concentração inicial do substrato pode-se levar em torno de 60 horas para 20 g/L de glicerina, e que gera baixas concentrações do produto além de apresentar diluído na solução. Desse modo, para simular o caldo fermentativo foi preparada uma solução de ácido propanóico e água, denominado de meio sintético.

Para o estudo da separação do ácido propanóico do meio sintético, foi utilizada uma solução de ácido propanóico (SIGMA, 99%) e água numa concentração de 17 g/L. A escolha da concentração foi escolhida de modo a simular a concentração obtida do caldo fermentado.

Meio fermentado

O meio fermentado consiste no meio fermentado bruto tratado pelo processo anterior, separação sólido-líquido. Neste a biomassa já foi removida do processo, bem como a base NaOH, restando o sobrenadante do processo.

6.2.2.3 *Método analítico*

As amostras a serem destiladas, são pesadas e quantificadas analiticamente através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para a realização do balanço de massa, bem como também destilado e o resíduo obtido da destilação, depois armazenados sob refrigeração para evitar degradação, até o momento da análise no HPLC.

Para as análises das concentrações foram realizadas a diluição necessária das amostras e analisadas pela Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC-“high performance liquid chromatography”) modelo Varian 9010, coluna HPX-87H, mantida em um forno com circulação de ar e temperatura controlada a 35°C, comprimento de onda de 105 nm, com um volume de injeção de 50 µL, e numa taxa de fluxo de 0,6 ml/min. As áreas dos picos foram detectadas através dos detectores UV (ultravioleta) e RI (Índice de refração) montados em série e determinados quantitativamente através do ajuste de curvas dos padrões dos componentes. A fase móvel utilizada foi uma solução de H₂SO₄5mM, preparada com água ultra-pura (Milli-Q) e filtrada com membrana em éster de celulose com 0,45 µm de porosidade (Coelho, 2011).

6.2.2.4 Cálculo da recuperação do componente

A recuperação de um determinado componente, segundo Fregolente *et al.* (2009) é determinado pela Equação 6.2, modificada, onde N é o componente avaliado.

$$\%R_N = \frac{(\text{Concentração de Ac. Propanóico}). (\text{Quantidade do destilado})}{(\text{Concentração de Ac. Propanóico}). (\text{Quantidade do resíduo})}$$

$$\%R_N = 100 \frac{\text{Corrente}_N}{\text{Alimentado}_N}$$

(equação 6.2)

6.2.3 Resultados e discussões

6.2.3.1 Purificação do ácido propanóico a partir do meio sintético por evaporação de passo curto

No estudo da separação utilizando o meio sintético foi utilizado o condensador externo, em virtude das perdas observadas durante o processo de purificação.

As frações mássicas do material destilado e do material recolhido estão apresentadas na Figura 6.3, para cada temperatura estudada. Pode ser verificado que à medida que a temperatura aumenta porcentagens maiores são obtidas no destilado, em

virtude do aumento da temperatura proporcionar um aumento da transferência de calor entre o evaporador e o fluido, permitindo que uma quantidade maior de massa seja evaporada.

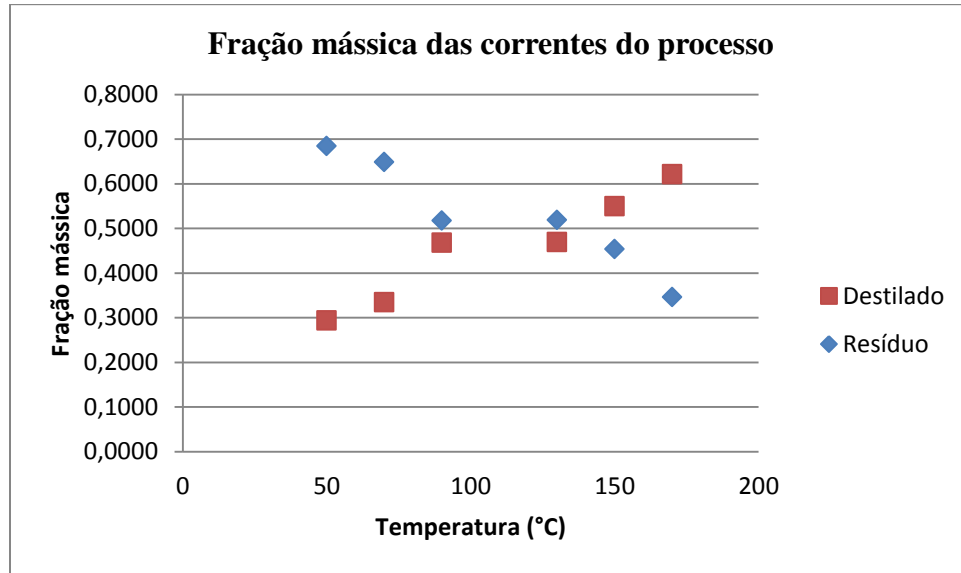


Figura 6.3 - Porcentagem de ácido propanóico no evaporador de passo curto.

Desta forma, a recuperação do ácido propanóico nas temperaturas estudadas está apresentada na Figura 6.4.

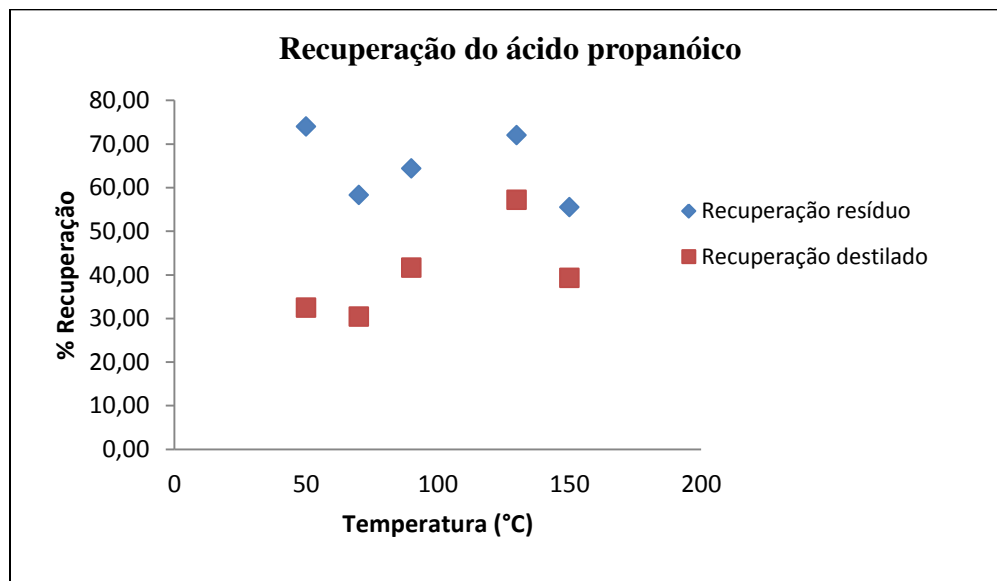


Figura 6.4 - Recuperação do ácido propanóico no evaporador.

Temos que a recuperação na corrente do resíduo é maior que a do destilado, pois a temperatura do evaporador é alta o suficiente para que haja uma boa troca de calor.

Em relação à concentração inicial de ácido propanóico e a massa inicial da alimentação, o que obteve maior recuperação de ácido propanóico em massa foi operar em altas temperaturas. Desta forma para reduzir o possível efeito de degradação do ácido foi realizado o estudo com variação na pressão no sistema.

6.2.3.2 Purificação do ácido propanóico a partir do caldo fermentado por evaporação de passo curto

Nesta etapa foram feitos testes do comportamento da separação do ácido propanóico do meio fermentado utilizando o condensador externo, para diminuir as perdas do processo. O caldo de fermentação utilizado foi o produzido da fermentação e utilizaram-se pressões no sistema de 10 e 100 mbar, conforme estudo anterior.

As frações mássicas do material destilado e do material recolhido estão apresentadas na Tabela 6.4, bem como a perda do processo para cada temperatura estudada.

Tabela 6.3 - Porcentagem de ácido propanóico na destilação molecular.

Temperaturas (°C)	Pressão (mbar)	Resíduo	Destilado	Condensador
110	10	21,80	12,59	39,06
130	100	23,02	42,23	4,82

A Figura 6.4 apresenta as frações de ácido propanóico no destilado, no resíduo e no condensador externo. No qual apresentou alta recuperação do ácido propanóico, tanto no destilado quanto no resíduo.

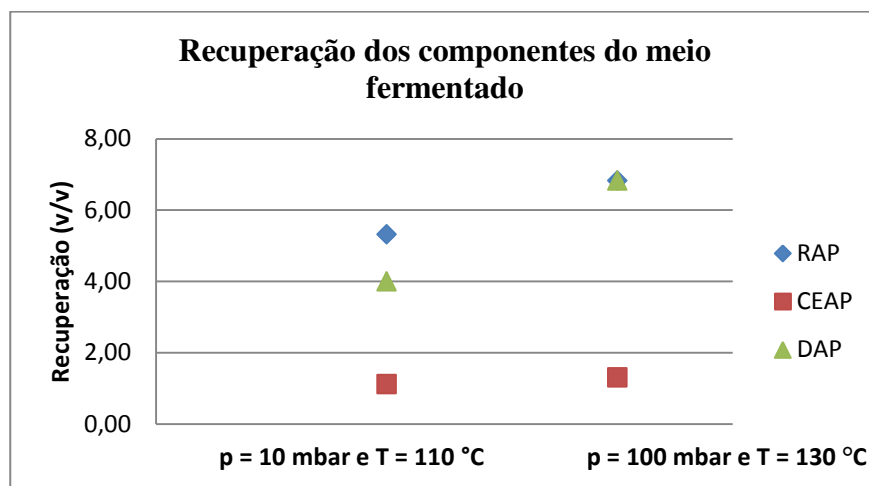


Figura 6.4 - Recuperação dos componentes obtidos na destilação molecular para o meio fermentado com controle de pH (RAP- ácido propanóico no resíduo, CEAP-ácido propanóico no condensador externo, DAP – ácido propanóico no destilado).

A Figura 6.5 apresenta a recuperação do glicerol nas correntes do processo. Foi observado que na corrente de resíduo não houve presença de glicerina, devido sua fração estar abaixo do limiar de detecção do equipamento, HPLC, sendo sua recuperação maior no destilado.

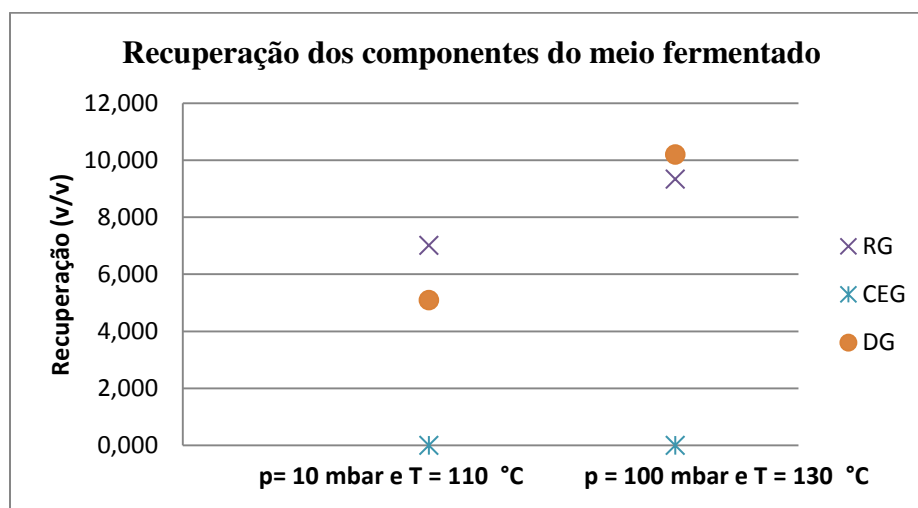


Figura 6.5 - Recuperação dos componentes obtidos na destilação molecular para o meio fermentado com controle de pH (RG- glicerol no resíduo, CEG – glicerol no condensador externo, DG – glicerol no destilado).

6.2.4 Conclusões parciais

O estudo da purificação do ácido propanóico foi realizado utilizando o evaporador de passo curto de filme agitado para separação dos componentes, na qual ocorreu em duas etapas. Primeiramente foi estudada a purificação utilizando o meio sintético para definição das variáveis de operação, bem como para o aprendizado do comportamento da solução no processo, e posteriormente foi realizado o estudo com o meio fermentado.

No meio sintético, não houve arraste de solução para o *trape*, obtendo baixas perdas, com altas recuperações de ácido propanóico na temperatura de 130 °C e pressão de 100 mbar no resíduo de aproximadamente 72%. Desta forma, operar em temperaturas mais altas torna o processo mais eficiente.

Do estudo da purificação pode-se observar a diferença no comportamento no evaporador de passo curto para a matéria-prima alimentada no processo, a sintética e o caldo fermentado.

Sabe-se, segundo Barbirato *et al.* (1997), que a purificação do ácido propanóico é fortemente limitada pelo ácido acético na solução. Assim, em virtude da ausência desse produto no meio fermentado a evaporação trouxe resultados satisfatórios.

A separação do caldo fermentativo mostrou-se efetiva em relação à separação ácido propanóico dos demais componentes do meio fermentado. Na corrente do condensador externo, o ácido se mostrou puro juntamente com a água, para pressão de 100 mbar e temperatura de 130 °C.

Levando-se este ponto em consideração, foi possível alcançar uma alternativa para a separação destes compostos utilizando o evaporador de passo curto na pressão de 100 mbar e temperatura de 130 °C.

CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES FINAIS

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

No capítulo 3 para o estudo do meio de cultura foi alcançada uma eficiência máxima de 99 % e um rendimento de aproximadamente 80%, quando foi utilizado a concentração de glicerina em 20 g/L e o extrato de levedura em 15 g/L. Estes resultados indicam o caminho a qual deve ser direcionado o processo, ou seja, com concentrações não muito altas para evitar a inibição pelo produto. Neste caso, como o estudo foi realizado em shaker uma das causas para a inibição do processo foi provocado pela diminuição do pH, em torno de 4,5, ocasionada pela formação dos produtos ácidos. Desta forma estudos do processo em fermentadores com controle do pH foram uma alternativa para acompanhar e avaliar o processo.

No entanto, no capítulo 4, sabendo que os processos convencionais biotecnológicos para a produção de ácido propanóico utilizam a propionibactéria em processos anaeróbicos, ou seja, com injeção de nitrogênio durante o processo; e sabendo que esta bactéria é anaeróbica facultativa foram estudados os perfis fermentativos para a fermentação anaeróbica parcial e anaeróbica total. Os resultados mostraram a enorme flexibilidade metabólica em redirecionar o fluxo de carbono e, portanto, apesar de obter produtos secundários foram obtidos um maior consumo de substrato e um maior

rendimento para o processo de anaerobiose parcial até então não estudado para a fermentação propiônica utilizando a glicerina como substrato.

Seguindo essa linha, no capítulo 5 foram avaliados os perfis da fermentação propiônica através do estudo da temperatura e da concentração inicial de glicerina em um processo em anaerobiose parcial. Deste foram avaliados 5 níveis de temperatura entre 30 e 36 °C, nos níveis de concentração entre aproximadamente 20, 40 e 60 g/L. Neste estudo foi possível verificar que o aumento da concentração inicial de substrato propiciou um aumento no consumo de glicerina e na produção de ácido propanóico. Foi também observado que com o aumento da temperatura menor é o degraú no consumo de glicerina e na produção de ácido propanóico, ao se aumentar a concentração de substrato.

Tendo estes parâmetros e perfis avaliados, ainda no capítulo 5 foram utilizados os ensaios experimentais para a estimativa dos parâmetros cinéticos através do modelo matemático de Aiba e Shoda, modelo representativo para um processo de inibição pelo produto, utilizando o algoritmo genético como método de otimização, onde o método de Runge-Kutta de 4º ordem foi utilizado para a resolução das equações diferenciais.

No entanto, definido a equação do processo com os parâmetros estimados foi realizado o estudo da purificação do ácido propanóico no capítulo 6, com o objetivo de aumentar a sua concentração no meio fermentado. Primeiramente foi realizado o tratamento do caldo fermentado bruto através do processo de separação sólido-líquido para remoção da biomassa e manter o pH do meio, e após foram executados os estudos no evaporador para aumentar a concentração do produto final.

Neste estudo utilizando o evaporador de passo curto, foi utilizado o meio sintético com o objetivo de definir as condições de processo, para condições “ideais” já que no meio fermentado vários outros fatores interferem no processo de separação em virtude de ter vários compostos, tais como glicerina que não reagiu, ácido propanóico e o meio de cultura.

Deste estudo pode-se concluir a diferença no comportamento do material alimentado na separação do ácido propanóico. No meio sintético foi obtido alta recuperação na temperatura de 130 °C e pressão de 100 mbar, da qual foi de 72%. A separação do caldo fermentativo proveniente da fermentação, mostrou sua efetividade em relação a separação do ácido propanóico dos demais componentes do meio fermentado. Levando-se este ponto em consideração, uma alternativa para a separação destes compostos é a utilização de altas temperaturas 130 °C e pressões, 100 mbar com o auxílio do condensador externo para diminuir perdas do processo bem como para a obtenção de um produto mais puro.

Portanto, este trabalho mostrou-se de grande valia para o conhecimento do processo da fermentação propanóica. Portanto, através da análise e estudo de um processo inovador através da utilização da fermentação anaeróbica parcial foi alcançado uma boa reprodutibilidade do processo; bem como através do estudo da purificação foi possível obter um produto mais concentrado e livre dos demais componentes do meio de cultura, mostrando-se uma rota alternativa para a produção de ácido propanóico.

CAPÍTULO VIII - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em face dos trabalhos realizados as seguintes sugestões para a continuidade deste trabalho de pesquisa são:

Executar a fermentação para um processo em batelada alimentada e avaliar a taxa de diluição e o tempo de fermentação;

Estudar o processo em batelada utilizando como substrato o subproduto do processo de produção de biodiesel, o glicerol, e comparar com o estudo realizado com a glicerina;

Executar modificações na rotina de otimização para obtenção de um modelo mais robusto, para que possa ajustar os dados experimentais em função da temperatura automaticamente;

Utilizar redes neurais para representar o modelo cinético do processo, ou utilização de um sistema híbrido e comparar com o modelo cinético obtido neste trabalho;

Execução, de um planejamento experimental utilizando a pressão, temperatura e a vazão como variáveis de otimização da purificação do ácido propanóico;

Uma alternativa para melhorar o processo de separação é a adição de solvente no sistema com pesos moleculares maiores que a do glicerol, para arrastar mais ácido propanóico para o destilado e obter uma maior recuperação.



CAPÍTULO IX - REFERÊNCIAS



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

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

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

AIBA, S. Y; SHODA, M. Reassessment of product inhibition in alcohol fermentation. *J. Ferment. Technol.*. v.47, 790-794, 1969.

AIBA, S., SHODA, M. and NAGATANI, M. Kinetics of product formation in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. v.10, p845-864, 1968.

ANDRADE, R. R. ET AL. Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. *Appl. Biochem Biotechnol.* 136- 140 (07), 753-764, 2000.

BANAT, F; AL-ASHEH, S; SIMANDL, J. Vapor/liquid equilibria of propionic acid/water system in the presence of different types of inorganic salts: effect of temperature and salt concentration. *Chemical Engineering and Processing* v. 42, p. 917-923, 2003.

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

BASSALO, M. C. *Estudo do metabolismo aeróbico da bactéria anaeróbica facultativa Propionibacterium acidipropionici*. 2013. Dissertação (mestrado).

Tese de Doutorado - Dayana de Gasmão Coelho

- BATISTELLA, C. B., MACIEL, M. R. W. Modeling, Simulation and Analysis of Molecular Distillators and Falling Film. *Computers Chemical Engineering*, v.20, p. S19-S24, 1996a.
- BILGIN, M.; ARISOY, Ç. Liquid phase equilibria of (water + propionic acid + oleyl alcohol) ternary system at several temperatures. *Fluid Phase Equilibria*.n.250. p. 59-63, 2006.
- BLANCH, H. W. & CLARK, D.S.; *Biochemical Engineering*, Ed. Marcel Dekker, Inc, 1997.
- BLANCHARD, K. C. & MACDONALD, J. The reduction of propionaldehyde and of propionic acid by clostridium acetobutylicum. *Bacterial Metabolism*, 1935.
- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia industrial* v. 2, 2001.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, v. 2, p. 93-122, 2001.
- ÇEHRELI, S.; OZMEN, D.; TATH, B. (Liquid + liquid) equilibria of (water + propionic acid + diethylphthalate) at several temperatures. *J. Chem. Thermodynamics* 37 p. 1144–1150, 2005.
- CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S.; Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* v. 36, p. 1097-1108, 2011.
- COELHO, D. G. *Modelagem e otimização do processo de síntese do ácido propanóico via fermentação do glicerol*, 2011. Dissertação (mestrado).
- COFRÉ, O.; RAMÍREZ, M.; GÓMEZ, J. M.; CANTERO, D. Optimization of culture media of ethanol production from glycerol by *Escherichia coli*. *Biomass and Bioenergy*. V. 37. p. 275-281, 2012.

- CORAL, J. Propionic acid production by *propionibacterium sp.* Using low-cost carbon sources in submerged fermentation. Tese de mestrado. *Biotechnologist and Bioprocess Engineering* Division Federal University of Parana.p.3-5, 2008.
- DECHOW, F. J. Separation and purification techniques in biotechnology. Reed & Carnrick Pharmaceuticals Piscataway, New Jersey, 1989.
- DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; INGHAN, J.; PRENOSIL, J. E. *Biological Reaction Engineering*. Wiley-VCH, 1992.
- FENG, X.; CHEN, F.; XU, H.; Wu, B.; Li, H.; Li, S.; OUYANG, P. Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor. *Bioresour.Technol.* v. 102, p. 6141-6146, 2011.
- FENG, X.; Xu, H.; YAO, J.; Li, S.; ZHU, H.; OUYANG, P. Kinetic analysis and pH-Shift Control Strategy for propionic acid production with *Propionibacterium acidipropionici* Freudenreichii CCTCC M207015. *Appl. Biochem Biotechnol.* v.160 p. 343-349, 2010.
- FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M.; WOLF MACIEL, M. R.; FILHO, R. M. F.; BATISTELLA, C. B. V. Production of monoglycerides through lipase-catalyzed glycerolysis and molecular distillation. *Quím.Nova.* N.6. v. 32., 2009.
- GEANKOPLIS, C. J. Transport Process and Separation Processes.*Prentice-Hall*, 2003.
- GHOSE, T.K. and TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate.II. roduct and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering.* v.21, p.1401-1420, 1979.
- GOSWANI, V.; SRIVASTAVA, A.K. Batch Kinetics and Modelling of Propionic Acid Fermentation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* v. 78, 2000b.
- GOSWANI, V.; SRIVASTAVA, A.K. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacteriumacidipropionici*. *Journal Biochemical Engineering.* v. 4, p.121-128, 2000a.

- GU, Z.; GLATZ, B.A.; GLATZ, C.E. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 22 p.13-18, 1998.
- HIMMI, E.H.; BORIES.A.; BARBIRATO, F. Nutrients requirements for glycerol conversion to 1-3 propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*. v. 67 p. 123-128, 1999.
- HIMMI, E.H.; BORIES.A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Effects of inoculants containing propionic bacteria on fermentation and aerobic and *Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v.53, p.435-440, 2000.
- HISS, H. Cinética de Processo Fermentativos. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.;
- HSIEH, C.; JI, W.; LIN, H.; LEE, M. Multiphase equilibria for mixtures containing water, acetic acid, propionic acid, methyl acetate and methyl propionate. *Fluid Phase Equilibria*.n.271. p.68-75, 2008.
- HSU, S-T.; YANG, S-T. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: Effects of pH. *Biotechnol. Bioeng.* 38:571-578, 1991
- JOHNS, A.T. The Mechanism of Propionic Acid Formation by *Clostridium propionicum*. *Journal gen. Microbiol.* p 123-127, 1952.
- KESHAV, A.; WASEWAR, K. L.; CHAND, S. Extraction of propionic acid with tri-n-octyl amine in different diluents. *Separation and Purification Technology*. n.63. p.179-183, 2008.
- KESHAV, A.; WASEWAR, K. L.; CHAND, S.; USLU, H. Effect of binary extractants and modifier–diluents systems on equilibria of propionic acid extraction. *Fluid Phase Equilibria*. n.275. p.21-26, 2009.
- KIRBASLAR, S. I.; SAHIN, S.; BILGIN, M. (Liquid + liquid) equilibria of (water + propionic acid + alcohol) ternary systems. *J. Chem. Thermodynamics*. n.38. p.1503-1509, 2006.

KIRBASLAR, S. I.; SAHIN, S.; BILGIN, M. (Liquid + liquid) equilibria of (water + propionic acid + diethyl succinate or diethyl glutarate or diethyl adipate) ternary systems. *J. Chem. Thermodynamics*. n.39. p.1463-1469, 2007.

KOLICHESKI, M. B. e SOCCOL, C. R. Otimização do meio e condições de cultura na produção de ácido cítrico por fermentação submersa. B. CEPPA, Curitiba, v. 13, n. 2, p. 109-118, 1995.

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

LEAVER, F. W.; WOOD, H. G.; STJERNHOLM, R. The fermentation of three carbon substrates by clostridium propionicum and propionibacterium. *Journal Bacteriol.* v. 70, p.521-530, 1955.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI V.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*. v. 45, p. 138 -145, 2012.

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

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

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

LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, R. ; ZHANG, F.; ZHU, J. Glycerol/Glucose Co-Fermentation: One More Proficient Process to Produce Propionic Acid by *Propionibacterium acidipropionici*. *Curr Microbiol.* v. 62, p; 152-158, 2011.

- MARTINS, P. F. Estudos e experimentos para a concentração de tocoferóis e fitoesteróis por meio da destilação molecular. 2006. (Tese de doutorado).
- MEGEE, R. D.; DRAKE, J. F.; FREDRICKSON, A. G.; TSUCHIYA, H. M. Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 18, n. 11, p. 1733-1742, 1972.
- MOHSEN-NIA, M; Jazi, B.; AMIRI, H. Binodal curve measurements for (water + propionic acid + dichloromethane) ternary system by cloud point method. *J. Chem. Thermodynamics Propionibacterium freudenreichii*. n.41. p.859–863, 2009
- MOLINA, M. e GIANNUZZI, L. Modelling of a aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid médium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International* 35: p.585-594, 2002.
- MORAES, E. B. *Avaliação do processo de destilação molecular para obtenção de produtos de alto valor agregado*, 1999. Dissertação (mestrado).
- NASCIMENTO, *et al.* Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* Termofílico. *Ciênc.Tecnol.Aliment.v.* 27(2), p. 417-421, 2007.
- NOBLE, R. D. & TERRY, P. A. Principles of chemical separations with environmental applications. *Cambridgi university Press*, 2004
- ÖZMEN, D. (Liquid + liquid) equilibria of (water + propionic acid + dipropyl ether or diisopropyl ether) at T = 298.2 K. *J. Chem. Thermodynamics*. n. 9. p.123–127, 2007.
- PAIK H-D.e GLATZ B. A. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 42. p.22-27, 1994.
- PAPOUTSAKIS, E. T. e MEYER, C. L. Fermentation equations for Propionic-acid bacteria and production of assorted Oxychemicals from various sugars. *Biotechnology and Bioengineering.* v. XXVII, pp 67 -80, 1985.

- PINTO, L. F. R. *Estudo do processo de destilação molecular para a obtenção de β -caroteno (pró-vitamina a) a partir do óleo de palma*, 2010. Dissertação (mestrado).
- PIRT, S.J. The maintenance requirement of bacteria in growing cultures. *Proc. Roy Soc. London*.163, 224-231., 1996.
- PLAYNE, M. J., Propionic and Butyric Acids. In: Moo-young, M. *Comprehensive Biotechnology*. Great Britain:Pergamon Press, p. 731-759, 1985.
- POSADA, J. A.; RINCÓN, L. E.; CARDONA, C. A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. *Bioresource Technology*. v. 111, p. 282–29, 2012.
- QUESADA-CHANTO, A.; AFSCHAR, A.S.; WAGNER, F. Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. *Appl. Microbiol* 42: p.16-21, 1994.
- QUESADA-CHANTO, A.; DA COSTA, J. C. L., SILVEIRA, M.M., SCHROEDER, A.G., SCHMID-MEYER, A.C., JONAS, R. Influence of Different Vitamin-Nitrogen Sources on Cell Growth and Propionic Acid Production from Sucrose by *Propionibacterium shermanii*. *Acta Biotechnol. V. 18., n.3, p. 267-274, 1998*.
- RAMSAY, J.A.; ALY HASSAN, M.C.; RAMSAY, B.A. Biological conversion of hemicelulose to propionic acid. *Enzyme microb. Technol.*, v. 22, p 292-295.1998.
- RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 2ª ed. Campinas, SP. Editora Cárita, 2009.
- SHERMAN, J. M. & SHAW, R. H. The propionic acid fermentation of lactose. *The Journal of Biological Chemistry*, 1923.
- SHULER, M.L. & KARGI, F. *Bioprocess Engineering-Basic Concepts*, In: Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, p.479, 1992.

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

SÓLIMO, H. N.; BONATTI, C. M.; ZURITA, J. L.; GRAMAJO DE DOZ, M. B. Liquid-liquid equilibria for the system water + propionic acid + 1-butanol at 303.2 K. Effect of addition of sodium chloride. *Fluid PhaseEquilibria*. n.137. p.163-172, 1997.

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

USLU, H.; INCI, I. (Liquid + liquid) equilibria of the (water + propionic acid + Aliquat 336 + organic solvents) at T = 298.15 K. *J. Chem. Thermodynamics*. n.39. p.804–809, 2007.

WANG, K.; CHANG, Z.; Ma, Y.; LEI, C.; JIN, S.; Wu, Y.; MAHMOOD, I.; HUA, C.; LIU, H. Equilibrium study on reactive extraction of propionic acid with N1923 in different diluents. *Fluid Phase Equilibria*. n. 78. p.103–108, 2009.

WINTER, A.; SBAITE, P.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL FILHO, R.; WOLF MACIEL, M. R.; MEDINA, L.; GOMES, A.; KUNERT, R.; MATHIAS LEITE, L.F.; PONTES BITTENCOURT, C. Caracterização de correntes de resíduos pesados de petróleo obtidos pelo processo de destilação molecular. 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2005.

WOOD, H. G. & WERKMAN, C. H. The utilization of CO₂ by the propionic acid bacteria. *Journal Paper*.48-53, 1938.

WOOD, H. G. & WERKMAN, C. H. The utilization of CO₂ in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. *Journal Paper*.48-53, 1935.

WOOD, H. G.; STONE, R. W.; WERKMAN, C. H. The intermediate metabolism of propionic acid bacteria. *Journal Biochem*.31(3), 349-359, 1936.

- WOSKOW, S.A.; GLATZ, B.A. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation. *Appl. Environmental microb.* 57:2821-2828, 1991.
- YAZDANI, S. S. E GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Energy biotechnology: Current Opinion in Biotechnology.* n. 18, p 213-219, 2007.
- ZHANG, A.; YANG, S-T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineering *Propionibacterium acidipropionici*. *Proc. Biochem.* 44(12): 1346-1351, 2009.
- ZHANG, A.; YANG, S-T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineering *Propionibacterium acidipropionici*. *Proc. Biochem.* 44(12): 1346-1351, 2009.
- ZHU, L.; WEI, P.; CAI, J.; ZHU, X.; WANG, Z.; HUANG, L.; XU, Z. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresour. Technol.*, 2012.
- ZIDWICK, M. J. CHEN, J. S.; ROGERS, P. Organic acid and solvent production propionic acid and butyric acids and ethanol. *Applied Bacteriology and Biotechnology*, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE I – Curva padrão

Neste apêndice é apresentada a curva de calibração utilizada para a quantificação das concentrações dos componentes da fermentação propiônica (glicerina, ácido propanóico, ácido succínico).

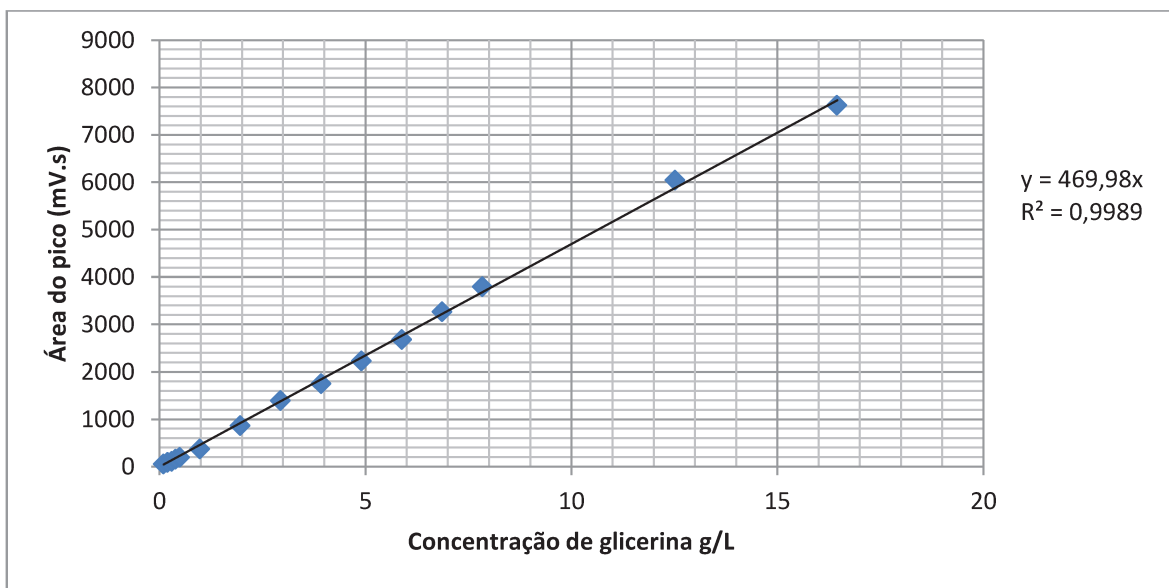


Figura A.I.1 - Curva padrão da glicerina

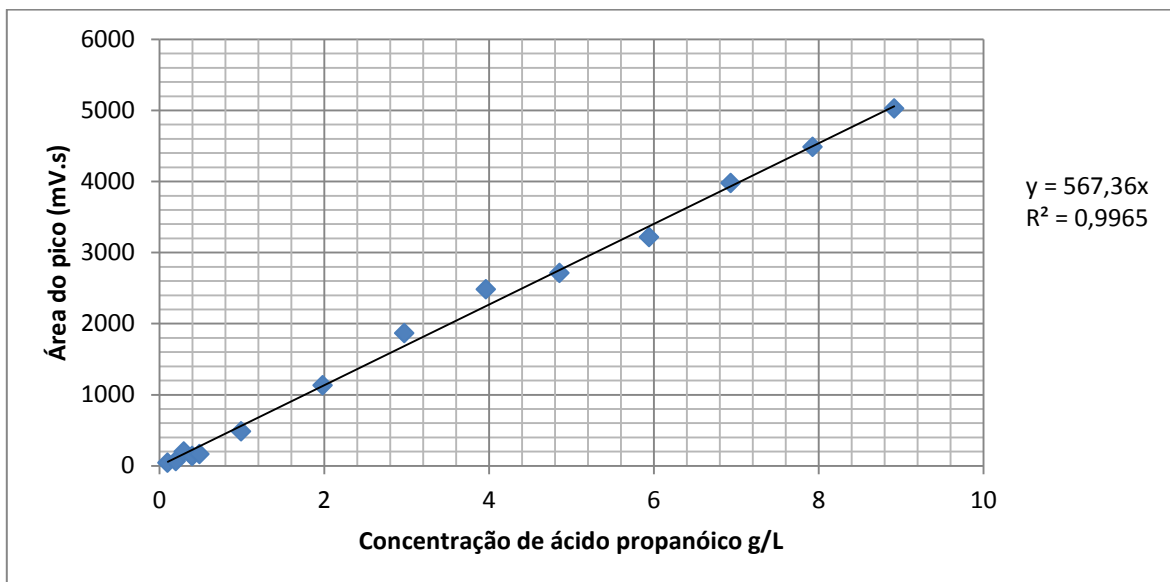


Figura A.I.2 - Curva padrão do ácido propanóico

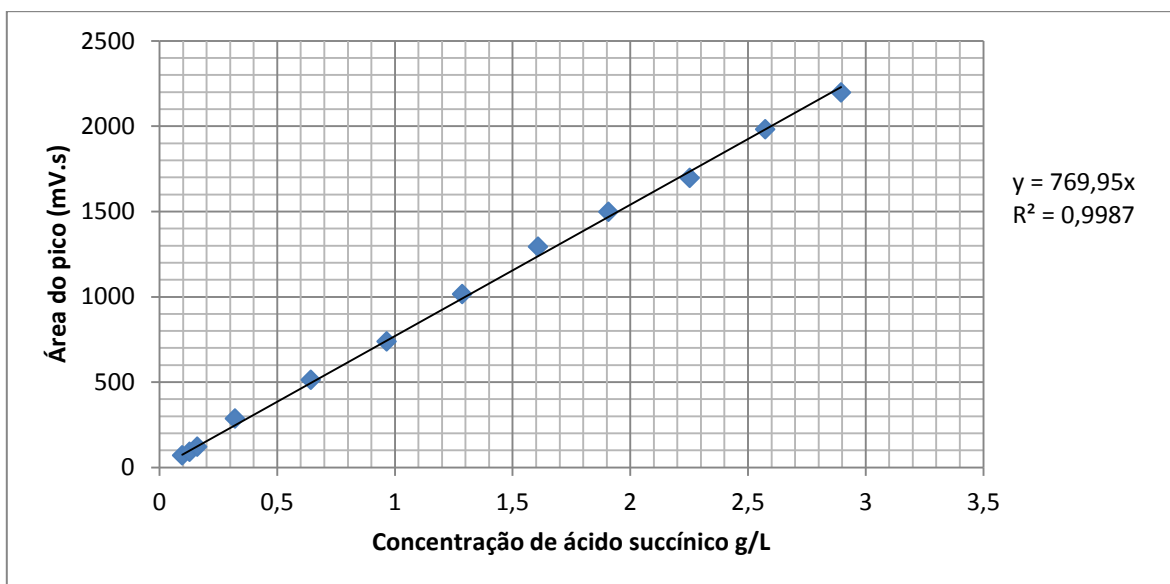


Figura A.I.3 - Curva padrão da do ácido succínico

APÊNDICE II – Análise do nível de confiança

Este apêndice apresenta um estudo do nível de confiança a ser aplicado no planejamento de experimentos realizado para a análise do meio de cultura.

A análise por meio de gráficos normais é uma técnica alternativa para tentarmos distinguir, nos resultados de um planejamento, os valores que correspondem realmente aos efeitos, dos outros valores que são devidos apenas ao ruído. Seu funcionamento se baseia na noção de probabilidade cumulativa.

A análise por gráficos normais mostra os efeitos significativos e independe do nível de confiança escolhido. Assim, pode nos ajudar a escolher o nível de confiança a trabalhar.

Os pontos centrais que se ajustam a numa reta sobre o ponto zero do eixo da abscissa, vem de uma distribuição normal com média zero e não têm significado físico.

Então, se considerarmos que as amostras são aleatórias e seguem uma distribuição normal, se isso for verdade podemos considerar os efeitos como uma amostra aleatória retirada de uma distribuição aproximadamente normal com média zero. Com isso os dados que não estiverem em torno da média zero significa que não segue uma distribuição normal e, portanto os seus são significativos.

Os efeitos significativos do gráfico normal não coincidem com a análise da tabela dos efeitos (baseada em $t(v)$, p valor e intervalos de confiança).

A Tabela A.II.1 apresenta os efeitos dos fatores sobre o rendimento do ácido propanóico para um nível de significância de 10 %.

Tabela A II.1 - Efeito do planejamento de experimentos para o rendimento da fermentação propiônica ($p = 0,10$).

Fatores	Estimativa do Efeito (%)	Erro Padrão (%)	t(2)	p -valor	Estimativa por Intervalo (90%)	
					Limite inferior (%)	Limite superior (%)
Média	46,43	0,39	119,66	0,00007	45,3	47,6
* x_1	-24,98	0,85	-29,54	0,00114	-27,4	-22,5
* x_2	18,86	0,85	22,30	0,00200	16,4	21,3
* x_3	-5,02	0,85	-5,94	0,02716	-7,5	-2,5
x_4	2,14	0,85	2,53	0,12695	-0,3	4,6

Nota: *Fatores significativos.

Para o estudo do rendimento os valores dos efeitos padronizados estão apresentados no gráfico de Pareto apresentam-se no gráfico da Figura A.II.1.

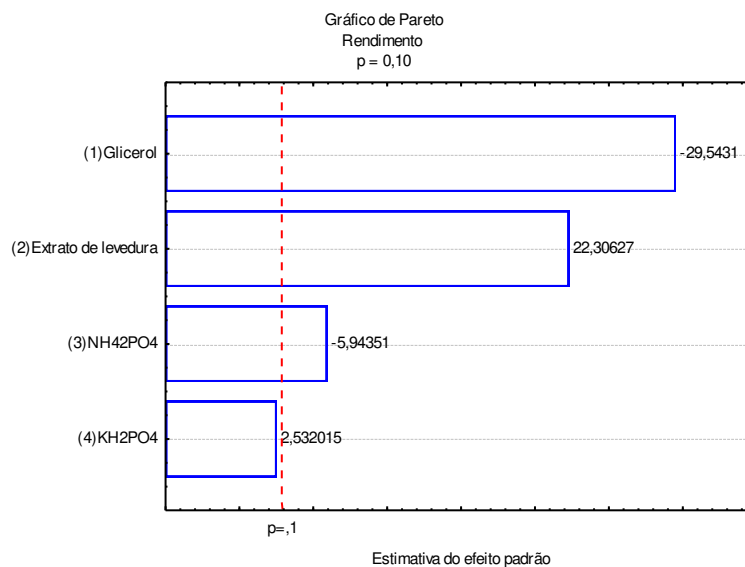


Figura A. II.1 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para o rendimento como variável dependente para $p = 0,10$.

Deste modo, conforme a Figura A II.2, temos que a linha tracejada é o limiar de significância, ou seja, todos os valores a direita da linha são significativos. Que pode ser confirmado pela Tabela A II.1 pelos valores de p que são menores que o nível de significância e também pela estimativa dos intervalos que não possuem a raiz zero.

A partir deste gráfico podemos concluir que os efeitos significativos para um intervalo de confiança de 90% são: o ácido propanóico, o extrato de levedura, a glicerina e o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Assim como, dentre os intervalos estudados, o sal KH_2PO_4 não possuiu efeito significativo.

No entanto, ao se avaliar o gráfico apresentado na Figura A II.2, gráfico normal temos que as 4 variáveis apresentam significância por não estarem dispostos no ponto zero da linha da abscissa.

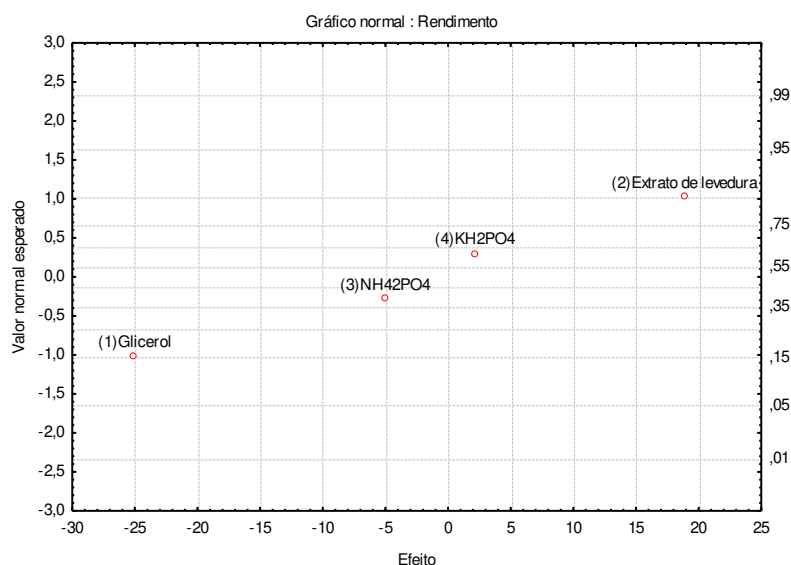


Figura A II.2 – Gráfico normal: rendimento como variável dependente.

Como no gráfico normal houve uma maior quantidade de efeitos significativos em relação ao estudo da tabela dos efeitos, significa que o nível de confiança está alto, ou seja, em geral devemos diminuir o nível de confiabilidade aumentando, portanto o número de efeitos significativos que foi apresentado na Tabela para que as duas análises concordem, portanto ao realizar a análise estatística com 85% de confiança, é verificado a compatibilidade dos resultados.

A Tabela A II.2 apresenta os efeitos dos fatores sobre a eficiência do ácido propanóico para um nível de significância de 10 %.

Tabela A II.2 - Efeito do planejamento de experimentos para a eficiência da fermentação propiônica (p = 0,10).

Fatores	Estimativa do Efeito (%)	Erro Padrão (%)	t(2)	p -valor	Estimativa por Intervalo (90%)	
					Limite inferior (%)	Limite superior (%)
Média	57,77	0,53	108,28	0,00008	56,2	59,3
*x ₁	-31,05	1,16	-26,70	0,01400	-34,4	-27,6
*x ₂	23,44	1,16	20,16	0,02452	20,0	26,8
*x ₃	-6,24	1,16	-5,37	0,03297	-9,6	-2,8
x ₄	2,66	1,16	2,28	0,14921	-0,7	6,0

Nota: *Fatores significativos.

Deste modo, conforme o apresentado na Tabela A II.2, dentre as quatro variáveis estudadas na avaliação da eficiência propiônica, apenas o extrato de levedura, a glicerina e o NH₄H₂PO₄ apresentaram efeitos estatisticamente significativos.

Para o estudo da eficiência os valores dos efeitos padronizados apresentados no gráfico de Pareto apresentam-se no gráfico da Figura A II.3.

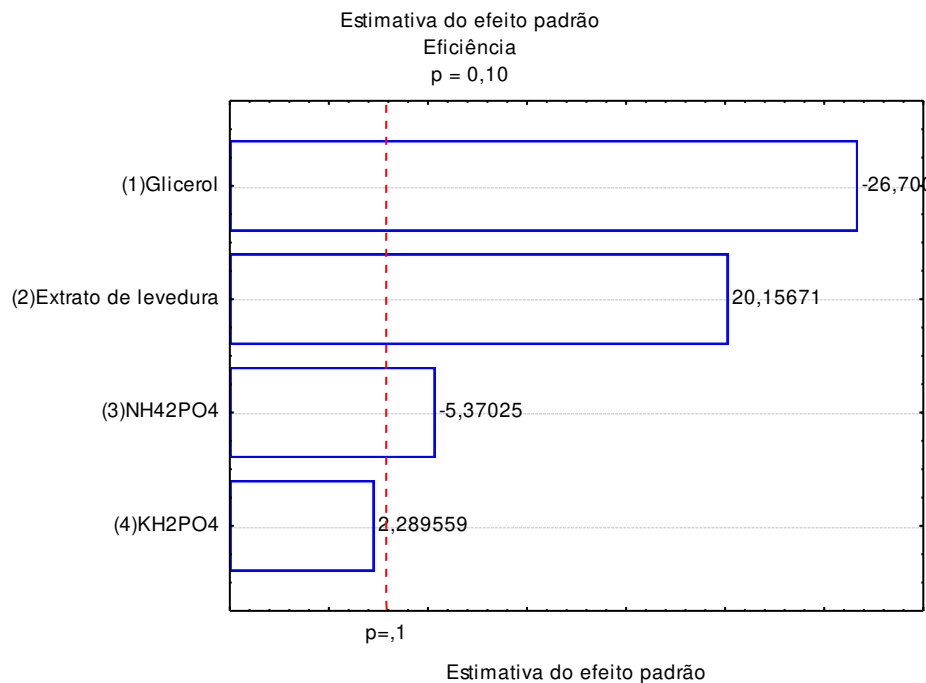


Figura A II.3 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a eficiência como variável dependente para $p = 0,10$.

Deste modo, conforme a Figura A II.3, temos que a linha tracejada é o limiar de significância, ou seja, todos os valores a direita da linha são significativos.

A partir deste gráfico podemos concluir que os efeitos significativos para um intervalo de confiança de 90% são: o ácido propanóico, o extrato de levedura, a glicerina e o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Assim como, dentre os intervalos estudados, o sal KH_2PO_4 não possuiu efeito significativo.

No entanto, ao se avaliar o gráfico apresentado na Figura A II.4, gráfico normal, temos que as 4 variáveis apresentam significância para a variável estudada por não estarem dispostos no ponto zero da linha da abscissa.

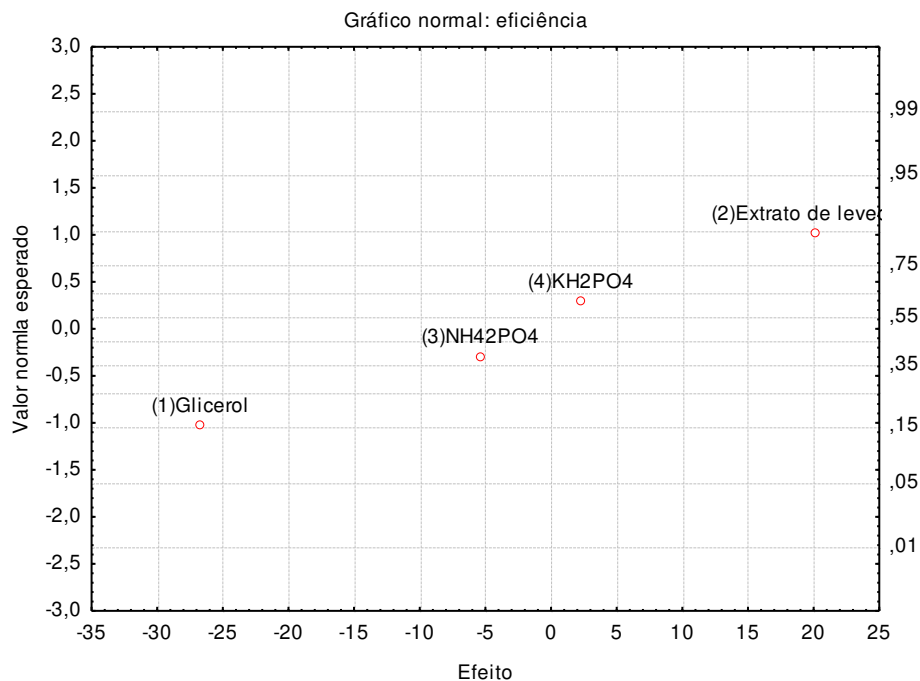


Figura A II.4 – Gráfico normal: eficiência como variável dependente.

Como no gráfico normal houve uma maior quantidade de efeitos significativos em relação ao estudo da tabela dos efeitos, significa que o nível de confiança está alto, ou seja, em geral devemos diminuir o nível de confiabilidade aumentando, portanto o número de efeitos significativos que foi apresentado na Tabela para que as duas análises concordem.

A Tabela A II.3 apresenta os efeitos dos fatores sobre a conversão.

Tabela A II.3 - Efeito do planejamento de experimentos para a conversão.

Fatores	Estimativa do Efeito (%)	Erro Padrão (%)	t(2)	p -valor	Estimativa por Intervalo (90%)	
					Limite inferior (%)	Limite superior (%)
Média	48,6	1,6	29,4	0,00115	43,8	53,4
x ₁	-8,8	3,6	-2,4	0,13489	-19,3	1,7
*x ₂	13,15	3,6	3,6	0,06736	2,6	23,7
x ₃	6,1	3,6	1,7	0,23147	-4,3	16,6
x ₄	4,1	3,6	1,1	0,36773	-6,3	14,7

Nota: *Fatores significativos.

Conforme o apresentado na Tabela A II.3, dentre as quatro variáveis estudadas apenas o extrato de levedura apresentou efeito estatisticamente significativo no estudo da conversão da fermentação propiônica.

Para o estudo da conversão os valores dos efeitos padronizados estão apresentados no gráfico de Pareto apresentam-se no gráfico da Figura A II.5.

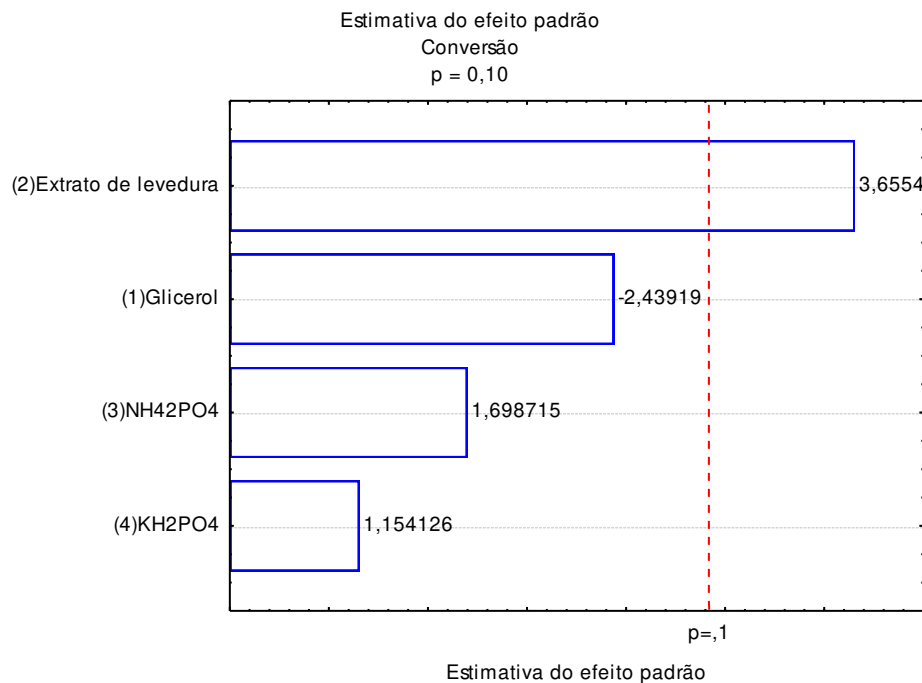


Figura A II.5 – Gráfico de Pareto: efeito padronizado para a conversão como variável dependente para $p = 0,10$.

Deste modo, conforme a Figura A II.5, temos que a linha tracejada é o limiar de significância, ou seja, todos os valores a direita da linha são significativos.

A partir deste gráfico podemos concluir que os efeitos significativos para um intervalo de confiança de 90% é apenas o extrato de levedura. Sendo que as demais variáveis estudadas não possuem efeito significativo.

No entanto, ao se avaliar o gráfico apresentado na Figura 3.8 gráfico normal, tem que não somente a variável extrato levedura quanto à glicerina apresentam-se estatisticamente significativos.

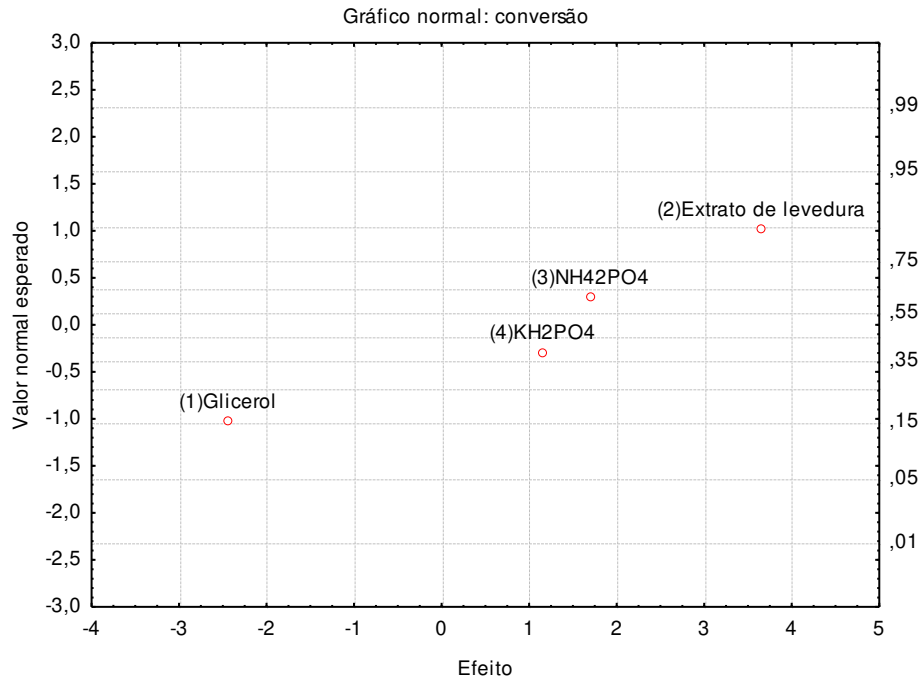


Figura A II.6 – Gráfico normal: conversão como variável dependente.

Como no gráfico normal houve uma maior quantidade de efeitos significativos em relação ao estudo da tabela dos efeitos, significa que devemos diminuir o nível de confiabilidade. Conforme apresentado nos estudos anteriores para o estudo do rendimento e eficiência os modelos avaliados foram para um nível de confiabilidade de 15 %.

ANEXOS

ANEXO A – Noções de estatística

Neste anexo é apresentada uma noção de estatística, com o qual foram realizados os cálculos do estudo da influência do meio de cultura.

Para o estudo estatístico se faz necessário conhecer se o efeito da variável, a qual se está analisando é significativo, como também saber se o modelo estudado é válido. Portanto, são apresentados alguns conceitos segundo Rodrigues e Iemma (2009).

A1. t de student

$t(v)$ é o valor de t de student para o efeito \hat{n} , erro padrão S_{efeito} , e v graus de liberdade e pode ser calculado pela equação (4)

$$t(v) = \frac{\text{Efeito}}{\text{Erro padrão}} = \frac{\hat{n}}{S_{efeito}}$$

Para sabermos, olhando $t(v)$ se um efeito é ou não significativo temos pela equação (5) do intervalo de confiança de t de Student,

$$\hat{n} - t_v \cdot S_{efeito} < n < \hat{n} + t_v \cdot S_{efeito}$$

Para um efeito ser significativo ele não deve incluir o zero, porque se incluir o zero significa que a probabilidade do efeito ser zero é a mesma para qualquer valor do intervalo por isso a inequação de significância será:

$$\begin{aligned} \hat{n} &> t_v \cdot S_{efeito} \\ |t(v)| &> t_v \end{aligned}$$

A equação acima mostra ainda, que só devemos considerar estatisticamente significativos os efeitos cujas estimativas (obtidas no experimento) forem superiores em

Tese de Doutorado - Dayana de Gasmão Coelho

valor absoluto ao produto do erro padrão pelo ponto da distribuição t de STUDENT, porque só assim o intervalo de confiança não inclui o valor zero.

A.2 Coeficiente de determinação do modelo

Quanto maior for a fração descrita pela equação de regressão, melhor será o ajuste do modelo, pois quanto a regressão irá se aproximar do total, o que podemos quantificar por meio da razão expressa pela equação 2.6

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Na qual, R^2 é chamado de coeficiente de determinação do modelo e quanto mais perto de 1 estiver R^2 , melhor é o modelo.

A.3 Soma quadrática

O método de análise de variância (ANOVA) baseia-se em dividir a variância total de uma dada resposta em duas partes: a primeira devida ao modelo de regressão e a segunda devida aos resíduos deixados pelo modelo. Portanto, a soma quadrática total será definida pela equação 2.7.

$$SQT = SQR + SQr$$

$$[SQ \text{ em torno da média}] = [SQ \text{ devida à regressão}] + [SQ \text{ residual}]$$

$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i)$$

Na qual,

$(\hat{y}_i - \bar{y})$ = Desvio da predição em relação à média global;

$(y_i - \hat{y}_i)$ = Diferença entre o valor previsto e o experimental;

Pode-se demonstrar que o somatório dos produtos é igual.

$$\begin{aligned} \sum(y_i - \bar{y})^2 &= \sum[(\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i)]^2 \\ &= \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 + 2\sum(\hat{y}_i - \bar{y})(y_i - \hat{y}_i) + \sum(y_i - \hat{y}_i)^2 \\ \sum(y_i - \bar{y})^2 &= \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum(y_i - \hat{y}_i)^2 \end{aligned}$$

$$\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \text{ Regressão (modelo)}$$

$$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \text{ Desvios (erros deixados pelo modelo)}$$

Valor alto significa que boa parte da SQ residual ($SQ_r = SQ_{faj} + SQ_{ep}$) é devida aos erros experimentais.

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj}$$

$$SQ_r = SQ_{\text{erro puro (experimental)}} + SQ_{\text{falta de ajuste do modelo}}$$

$$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$$

Onde,

$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$ reflete a dispersão das respostas repetidas em torno de suas próprias médias. Este termo nos dá uma medida do erro aleatório e é chamado de soma quadrática devida ao erro puro (SQep).

$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$ depende do modelo e será maior quanto mais as estimativas para um dado nível i se desviarem da resposta média correspondente. Este termo fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas e é chamado de soma quadrática devida à falta de ajuste (SQfaj).

E a cada soma quadrática está associado um nº de graus de liberdade, que indica quantos valores independentes envolvendo as n observações são necessários para determiná-la.

A.4 Graus de liberdade

Como $SQ_T = SQ_R + SQ_r$, podemos expressar os graus de liberdade pela equação 2.8

$$V_R = V_T - V_r$$

Sendo

$$v_R (SQ_R) = p-1$$

$$v_r (SQ_r) = n-p$$

$$v (SQ_{faj}) = m-p$$

$$v (SQ_{ep}) = n-m$$

$$v_T (SQ_T) = n-1$$

A.5 Média quadrática

Podemos definir, ainda, as médias quadráticas para a regressão e para o resíduo. As médias quadráticas são as somas quadráticas divididas pelos seus respectivos graus de liberdade.

Quando dividimos estas somas quadráticas pelos seus respectivos graus de liberdade teremos médias quadráticas, cujos valores vamos comparar para avaliar a falta de ajuste do modelo.

$$MQ_R = SQR / v_R$$

$$MQ_r = SQ_r / v_r$$

$$MSQ_{faj}(\text{RESÍDUO}) = SQ_{faj} / v_{faj}$$

$$MSQ_{ep}(\text{RESÍDUO}) = SQ_{ep} / v_{faj}$$

