



**Estudo panorâmico da produção  
biotecnológica de ácido succínico visando  
extrapolação industrial.**

**Ludmylla Bastos Rocha de Souza**

**Monografia em Engenharia de Bioprocessos.**

**Orientadores**

**Prof. Nei Pereira Jr., *PhD.***

**Prof. Elcio Ribeiro Borges, *Dsc.***

**Dezembro de 2012**

# ESTUDO PANORÂMICO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO SUCCÍNICO VISANDO EXTRAPOLAÇÃO INDUSTRIAL.

*Ludmylla Bastos Rocha de Souza*

Monografia em Engenharia de Bioprocessos submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

---

Carolina Araújo Barcelos, *Dsc*

---

Estevão Freire, *Dsc*

---

Eliana Mossé Alhadef, *Dsc*

Orientado por:

---

Professor Nei Pereira Jr. , *PhD*

---

Professor Elcio Ribeiro Borges. , *Dsc*

Rio de Janeiro, RJ - Brasil  
Dezembro de 2012

Souza, Ludmylla Bastos Rocha de.

Estudo panorâmico da produção biotecnológica de ácido succínico visando extrapolação industrial. / Ludmylla Bastos Rocha de Souza.

Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2012.

p.; il.xi,63.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2012.

Orientadores: Nei Pereira Jr. & Elcio Ribeiro Borges.

1. Ácido succínico. 2. Fermentação. 3. Biotecnologia. 4.

Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Nei Pereira Jr., *PhD* e Elcio Ribeiro Borges. *Dsc.* I. Estudo panorâmico da produção biotecnológica de ácido succínico visando extrapolação industrial.

*Dedico este trabalho ao meu amado irmão, Yuri,  
Para que nos momentos de dúvida, isto te sirva como inspiração e prova de que você pode tudo.*

“Perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.”

Margareth Fishback Powers

## Agradecimentos

A Deus, antes de tudo, por me abençoar todos os dias com saúde e discernimento para enfrentar os desafios típicos do cotidiano;

Ao meu orientador, professor Nei Pereira Jr, cuja postura e palavras repletas de paixão pela ciência foram fontes de inspiração e certeza da profissão que eu gostaria de abraçar. Agradeço ainda pela generosa acolhida no LADEBIO, sob sua orientação, o que me proporcionou uma oportunidade de aprendizado *sui generis*;

Ao meu, também, orientador Elcio Ribeiro Borges, pela dedicação que demonstrou durante a execução deste trabalho e pela amizade de todos os dias.

Aos meus pais, Jozivaldo e Cristina, e ao meu irmão, Yuri, por todo suporte, carinho e incentivo dados a mim durante toda a vida. Vocês personificam toda a felicidade e amor que há em mim.

Aos meus preciosos amigos, “bioamigos” e companheiros de LADEBIO, que estiveram ao meu lado durante essa jornada, repleta de emoções intensas, chamada graduação. Vocês foram a brisa fresca, quando o calor era insuportável.

Aos meus professores, que doaram a mim o único bem que não me pode ser usurpado: o conhecimento.

A essa instituição, Escola de Química – UFRJ, onde sempre sonhei em estudar, que me proporcionou momentos inesquecíveis.

Por fim, agradeço aos componentes da banca desta monografia, pela atenção e tempo dispendido na leitura e avaliação do trabalho.

Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

## **ESTUDO PANORÂMICO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO SUCCÍNICO VISANDO EXTRAPOLAÇÃO INDUSTRIAL.**

Ludmylla Bastos Rocha de Souza

Dezembro, 2012

Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD*.

Elcio Ribeiro Borges, *DSc*.

Atualmente, a maioria do ácido succínico produzido comercialmente é feito por síntese química. Entretanto, recentemente a atenção tem sido focalizada na produção microbiana de ácido succínico por microrganismos como uma alternativa para a síntese química.

No presente trabalho objetivou-se apresentar um panorama geral das pesquisas voltadas à produção biotecnológica do ácido succínico e posicionar o uso dessas tecnologias industrialmente. Pretendeu-se ainda, nesta monografia, expor a evolução do volume de publicações e patentes sobre o assunto utilizando técnicas de prospecção tecnológica de maneira simplificada através da análise de dados obtidos em duas bases *on-line*: *Web of science* e *Derwent Innovations Index*.

Com os dados quantitativos obtidos nestas pesquisas foi possível perceber o interesse crescente no assunto baseado no progressivo aumento do volume de artigos publicados e patentes depositadas sobre o ácido succínico produzido por rota biotecnológica ao longo dos últimos anos.

Além disso, em uma análise qualitativa da revisão bibliográfica apresentada, apontou-se que para aumentar a competitividade da produção biológica de ácido succínico, os trabalhos futuros devem ter como enfoques: o aumento da concentração de ácido succínico e produtividade por meio da engenharia metabólica; a utilização de matérias-primas de baixo custo de base não alimentar e técnicas de *downstream* com melhor custo-benefício.

# Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Ácido succínico .....	3
2.2	Aplicações do ácido succínico.....	4
2.3	Aspectos mercadológicos .....	7
2.3.1	Produção mundial de ácido succínico .....	7
2.3.2	Perspectivas em relação ao polibutileno ácido succínico .....	9
2.4	Processos de produção de ácido succínico.....	11
2.4.1	Rota química .....	11
2.4.2	Rota fermentativa .....	11
2.5	Matérias-primas utilizadas na produção de ácido succínico .....	13
2.5.1	Substrato.....	13
2.5.2	Fornecimento de CO <sub>2</sub> .....	16
2.5.3	Influência do pH no meio de cultura .....	18
2.6	Microrganismos produtores de ácido succínico.....	20
2.6.1	Metabolismo para produção de ácido succínico .....	23
2.7	Estratégias de fermentação para a produção de ácido succínico.....	26
2.7	Processos de separação e purificação de ácidos orgânicos .....	34
2.7.1	Cristalização direta.....	36
2.7.2	Precipitação .....	37
2.7.3	Separação por membrana .....	38
2.7.4	Extração .....	39
2.7.5	Cromatografia .....	40
3.	METODOLOGIA.....	42
3.1	Base de Dados de Artigos Científicos Utilizada .....	42
3.2	Estratégia de Busca Utilizada .....	43
3.3	Tratamento dos dados obtidos .....	44
4.	RESULTADOS.....	45
4.1	Panorama geral das pesquisas sobre ácido succínico .....	45
4.1.1	Dados levantados na base <i>on-line</i> “ <i>Web of science</i> ” .....	45
4.1.2	Dados levantados na base <i>on-line</i> “ <i>Derwent</i> ” .....	48
4.2	Desafios e perspectivas associadas aos processos de separação e purificação de ácido succínico ..	48
5.	CONCLUSÃO.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56



## Lista de figuras

FIGURA 1: VIA BIOQUÍMICA PARA SÍNTESE DE ÁCIDO SUCCÍNICO, POR <i>E. COLI</i> , EM PRESENÇA DE GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO (VEMURI <i>ET AL.</i> , 2002). .....	24
FIGURA 2: METABOLISMO DE <i>A. SUCCINICIPRODUCENS</i> E <i>A. SUCCINOGENES</i> . (ZEIKUS <i>ET AL.</i> , 1999). .....	25
FIGURA 3: NÚMERO DE ARTIGOS SOBRE PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR ANO DE PUBLICAÇÃO. ....	46
FIGURA 4: NÚMERO DE PUBLICAÇÕES SOBRE PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR PAÍS DE ORIGEM NO PERÍODO DE 1990 ATÉ 2012. ....	46
FIGURA 5: ANÁLISE DA DISPERSÃO GEOGRÁFICA DOS ARTIGOS SOBRE PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO SUCCÍNICO. ....	47

## Lista de tabelas

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO SUCCÍNICO. (SOLOMONS, 1996).....	3
TABELA 2: VALORES ENCONTRADOS E CALCULADOS PARA RENDIMENTO ( $Y_P/S$ ), PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA (QP) E TAXA ESPECÍFICA DE FORMAÇÃO DE PRODUTO (QP), A PARTIR DOS DADOS OBTIDOS PELA LITERATURA, PARA DIFERENTES LINHAGENS E ESTRATÉGIAS DE FERMENTAÇÃO (BORGES,2011).....	28
TABELA 3: PARÂMETROS PARA APLICAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO (BORGES, 2011).....	35
TABELA 4: VANTAGENS E DESVANTAGES EM CADA PROCESSO DE <i>DOWNTREAM</i> .....	50

## Lista de siglas e abreviaturas

**ABS:** Absorvância;  
**ARD:** Agro-industrie Recherches e Développements;  
**AS:** Ácido succínico;  
**AA:** Ácido acético;  
**AS:** Ácido fórmico;  
**AL:** Ácido láctico;  
**ATP:** Adenosina trifosfato;  
**BHT:** Butirolactona;  
**CIP:** Institut Pasteur Collection;  
**DCCR:** Delineamento Composto Central Rotacional;  
**DNP:** Diversified Natural Products;  
**DOE:** Departamento de Energias do EUA;  
**ED:** Eletrodiálise;  
**EL:** Extrato de levedura;  
**ELL:** Extração líquido-líquido;  
**EMP:** Embden-Meyerhof Pathway;  
**IUPAC:** União Internacional de Química Pura e Aplicada;  
**LADEBIO:** Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos-Departamento de Engenharia Química-Escola de Química/UFRJ;  
**MF:** Microfiltração;  
**NF:** Nanofiltração;  
**OI:** Osmose Inversa;  
**P.E:** Ponto de ebulição;  
**P.F:** Ponto de fusão;  
**PA:** Poliamida;  
**PBS:** Polibutilenosuccinato;  
**PBT:** Polibutilenotereftalado;  
**PEP:** Fosfoenolpiruvato;  
**PES:** Polisuccinato de etileno;  
**PET:** Polietileno tereftalato;  
**PHA:** Polihidroxialcanoato;  
**PVC:** Poli (cloreto) de vinila;  
**TCA:** Ciclo dos ácidos tricarbóxicos;  
**TES:** Tereftalato etileno succinato;  
**THF:** Tetrahidrofurano;  
**UF:** Ultrafiltração;

# 1. Introdução

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

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

Os desenvolvimentos recentes na produção de ácido succínico tem sido focados em alternativas biotecnológicas, em particular, baseados na utilização de transformação microbiana de biomassa renovável como matéria-prima. Nota-se que o fato de o CO<sub>2</sub> ser assimilado durante a fermentação do ácido succínico é considerado como uma vantagem do processo (HATTI-KAUL. *et al.*, 2007).

O ácido succínico e seus derivados são largamente utilizados como especialidade química para aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (SONG & LEE, 2006).

Na última década, diversos processos contínuos de fermentação foram descritos e revisados; entretanto, ainda mencionam-se diversos requisitos para que os processos de fermentação sejam atraentes economicamente (BORGES, 2011).

Em suma, há várias justificativas que impulsionaram a realização do presente trabalho:

- O ácido succínico pode ser considerado um produto “commodity” de ampla aplicação industrial, tornando-se alvo de interesse por grandes empresas nos últimos anos;
- Possui alta reatividade, devido a sua quiralidade natural, pela presença de dois grupamentos carboxila;
- Permite o uso de matéria-prima renovável no processo fermentativo;
- É economicamente viável em relação à rota química;
- Está inserido no contexto de tecnologia de captação de CO<sub>2</sub>;

Dessa forma, faz-se evidente a importância do desenvolvimento de projetos sobre esta temática.

O presente trabalho tem por objetivo apresentar um panorama geral das pesquisas voltadas à produção biotecnológica do ácido butanodióico, mais conhecido como ácido succínico e posicionar o uso dessas tecnologias industrialmente. Pretende-se ainda, nesta monografia, expor a evolução do volume de publicações e patentes sobre o assunto utilizando técnicas de prospecção tecnológica de maneira simplificada.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Ácido succínico

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

Com exceção do ácido clorídrico presente no suco gástrico, os ácidos mais comuns com os quais convivemos são orgânicos, ou seja, àqueles contendo átomos de carbono. Destes, o maior grupo é o dos ácidos carboxílicos, que são os ácidos caracterizados pela presença do grupo funcional (COOH), a carboxila (SNYDER, 1995). Eles são classificados ainda em monocarboxílicos ou dicarboxílicos, de acordo com o número de carboxilas presentes em sua estrutura química. Dentro desta classificação o ácido succínico está entre os dicarboxílicos e tem sua fórmula química estrutural, assim como algumas características apresentadas na Tabela 1 (Tabela 1). A presença do grupo COOH confere aos ácidos carboxílicos, entre outras propriedades, a de serem ácidos fracos em meio aquoso e de apresentarem elevados pontos de ebulição devido à facilidade com que formam interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio (LINTOMEN *et al.*, 2001).

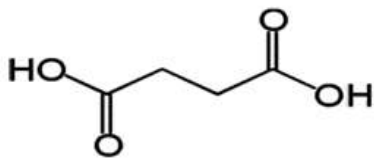
<b>Características do Ácido Succínico : HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH</b>	
Ponto de Fusão	187°C
Ponto de Ebulição	235°C
Constantes de dissociação ácida	$K = 6,2 \times 10^{-5}$
	$K = 2,3 \times 10^{-6}$
Fórmula estrutural	

Tabela 1: Características do Ácido Succínico. (SOLOMONS, 1996)

## 2.2 Aplicações do ácido succínico

O ácido succínico tem uma vasta gama de aplicações industriais, tais como intermediário químico para a produção de vernizes e ésteres para perfume, bem como *flavor*, bacteriostático ou agente neutralizante na indústria de alimentos. Além disso, o ácido succínico também tem aplicações em mercados de produtos químicos especiais como surfactantes, corantes, detergentes, solventes verdes, plásticos biodegradáveis, e ingredientes que estimulam o crescimento das plantas e animais. Com base na estrutura de ácido dicarboxílico saturado linear, o ácido succínico pode ser prontamente convertido em outros produtos químicos tais como 1,4-butanodiol, gama-butirolactona, tetrahydrofurano, ácido adípico, N-metilpirrolidona ou ésteres alifáticos lineares (CUKALOVIC *et al.*, 2001).

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

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

- I. Indústria química: Setor que constitui o maior mercado de aplicação deste ácido, podendo ser usado na fabricação de resinas sintéticas, biopolímeros (PBS, PES), detergentes, solventes biodegradáveis e intermediários para sínteses químicas (WILKE *et al.*, 2004). Também pode ser utilizado na produção de fibra de vidro e resinas de troca iônica (LEE *et al.*, 2003 (a); KIM *et al.*, 2004). Segundo RUDNER *et al.* (2005), as substâncias químicas mais importantes, produzidas a partir do ácido succínico, são:
  - n-metilpirrolidona: recomendado como substituto do cloreto de metileno como solvente para diminuir poluições tóxicas. Este composto é conhecido como “solvente verde”;
  - 1,4-butanodiol: matéria-prima para a produção de resinas, plásticos e polímeros de alta resistência, sendo também utilizado como solvente;
  - Tetrahydrofurano (THF): ingrediente de solventes, colas e tintas;
  - $\gamma$ -butirolactona: ingrediente de solventes de tintas e produtos têxteis;

- Ácido adípico: precursor do nylon 6.6 e matéria-prima na fabricação de espumas e produtos industriais;
- Dietil-ácido succínico: químico “verde” utilizado na limpeza de superfícies metálicas e também como removedor de tintas;
- Ésteres lineares alifáticos: utilizados na fabricação de resinas, plásticos e outros produtos de consumo industrial;
- Succimidas: utilizadas como combustíveis e em materiais absorventes.

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

- II. Indústria de alimentos: É usado como modificador de pH e como agente antimicrobiano. O ácido succínico de sódio tem a característica de acentuar o sabor dos alimentos, podendo ser utilizado no lugar do glutamato de sódio (CAROLE *et al.*, 2004). Outros sais do ácido podem ser utilizados como aditivos no cultivo de plantas e na alimentação animal, atuando como precursor de proteínas, fontes de energia e estimulantes de crescimento. Em alguns aminoácidos é usado para produzir substâncias com qualidades de proteínas de soja.
- III. Indústria farmacêutica: O ácido succínico é utilizado na produção de fármacos, antibióticos, aminoácidos, vitaminas, sedativos, medicamentos anticoncepcionais e medicinais combatendo inflamações, espasmos, artrites e até mesmo o câncer. O mercado destas substâncias está acima de 400 milhões de dólares ao ano (ZEIKUS, 1999).

Com várias implicações ambientais, a demanda por ácido succínico deverá aumentar significativamente nos próximos anos pelo interesse em novos polímeros biodegradáveis, por exemplo, o poli (1,3-propileno ácido succínico), que pode ser obtido por policondensação térmica de ácido succínico com 1,3-propanodiol (RANUCCI, *et al.*, 2001). O ácido succínico pode ter seu uso estendido à síntese de copolímeros biodegradáveis (RUDNER, 2005), tais como os poliésteres: PES (poliácido succínico de etileno), PBS (polibutilenoácido succínico), com excelentes propriedades térmicas e mecânicas, assim como processabilidade termoplástica (MINH, *et al.*, 2010), PBSA (polibutileno ácido succínico adipato) e PBT (polibutilenotereftalado) (PRADELLA *et al.*, 2006).



O PBS é um poliéster alifático sintético obtido através da copolimerização do 1,4 butanodiol (BDO) com ácido succínico, ambos produzidos por fermentação. Munoz-Guerra *et al.* (2005) publicaram a síntese de copoliésteres alifático-aromáticos obtidos pela reação em massa do PET com o poli (ácido succínico de 1,4 butileno) (PBS) em diferentes proporções de cada homopolímero (KINT *et al.*, 2003). A reação do PET pós-consumo com poliésteres alifáticos destaca-se por ser um meio simples e de baixo custo para a produção de novos termoplásticos com propriedades intermediárias entre os poliésteres aromáticos e alifáticos, aliado à vantagem destes copolímeros serem biodegradáveis.

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

O desenvolvimento dessas rotas alternativas possibilitará redução de custos de produção, de modo a tornar o PBS uma alternativa futura aos polímeros convencionais (PET) e mesmo a outros biopolímeros (PLA). Hoje, seu custo só permite o uso como blenda com amido ou copolímeros adipatos, produzidos pela japonesa Showa Highpolymer e a coreana SK Polymers (NOLAN, 2002). A DuPont, a Eastar e a Basf produzem o polibutileno ácido succínico tereftalato (PBST), com base no BDO e no ácido succínico (BASTOS, 2007).

## 2.3 Aspectos mercadológicos

### 2.3.1 Produção mundial de ácido succínico

A comercialização do Ácido succínico existe há décadas, porém novas rotas de produção e aplicações começaram a ser desenvolvidas e testadas recentemente, com a expectativa de implementação da primeira planta industrial via rota biotecnológica até o final de 2012.

O valor monetário do ácido succínico, produzido por síntese química, está na faixa de US\$ 5,90 – 8,80/kg dependendo do seu grau de pureza (SONG & LEE, 2005). De acordo com Koutinas *et al.* (2007), a produção de ácido succínico via fermentativa, a partir de glicose, poderia reduzir o preço de mercado em relação à rota petroquímica, de US\$ 7,0/kg para US\$ 0.6/kg. Isto associado aos crescentes aumentos no preço do petróleo e a potencial exaustão desse recurso natural não renovável, a biorrefinaria tornar-se-á uma realidade cada vez menos contestada.

As atuais fabricantes de ácido succínico baseado em petróleo incluem a DSM, a Gadiv Petroquímica baseada em Israel, as empresas japonesas Mitsubishi Chemical, Kawasaki Kasei Chemicals e Nippon Shokubai e muitos pequenos produtores chineses como Anqing Química Hexing e Anhui Sunsing Chemicals, além de pequenos produtores na Índia.

A produção de ácido succínico global atual é de 30.000 a 50.000 toneladas por ano, (ADSUL, *et al.*, 2011), incluindo rota biotecnológica e química, contudo há uma projeção de crescimento a uma taxa anual de 23.5% entre 2006 e 2015, estimando-se alcançar em torno 144.7 mil toneladas nos próximos cinco anos. Este crescimento pode ser justificado pelos interesses acerca da sua posição de destaque como bloco de construção. Em um relatório publicado, através do Mercado Global, foi descrito um total de 27 grandes empresas que estão empenhadas em consolidar a produção em larga escala de ácido succínico, como a ARD (Agro-Industrie Recherches et Développements, França), Anhui Sanxin Chemical Co., Ltd.(China), Anqing Hexing Chemical Co., Ltd. (China), BASF SE (Alemanha), Bio-amber S.A.S (França), DNP Green Technology, Inc.(EUA), Kawasaki Kasei Chemicals Ltd.(Japão), e a MBI International, Myriant Technologies, LLC (EUA), Roquette Frres S.A. (França) e a Royal DSM N.V.

A Royal DSM N.V e a Roquette criaram uma aliança estratégica para comercializar ácido succínico em escala industrial a partir de um processo de fermentação com fontes renováveis

(glicose) e suprimento de CO<sub>2</sub>. Desde 2009, uma planta piloto para demonstração foi inaugurada em Pomacle (França), (KIDWELL *et al.*, 2008 e SCOTT *et al.*, 2009). O grupo divulgou ainda o início da operação da primeira planta comercial de ácido bio-succínico em Cassano Spinola, Itália, em outubro de 2012, com capacidade de produção de 10.000 toneladas por ano.

No início de 2011, a BioAmber entrou em acordo exclusivo de licenciamento de tecnologia com a CELEXION para produzir ácido succínico e ácido adípico, a partir de fontes renováveis, aumentando sua infra-estrutura. A empresa também criou uma unidade de P&D em Plymouth (Minnesota) com uma considerável eficiência em seus processos fermentativos, em química analítica e biologia molecular. E, em parceria com a Mitsui, sediada no Japão, também espera iniciar a sua produção em escala comercial, com capacidade inicial de 17.000 toneladas / ano (expansível para 34.000 toneladas / ano) em Sarnia, Canadá, em 2013 (BIOAMBER, 2012).

Em dezembro de 2009, a Myriant Technologies (Myriant) pelo sucesso na produção em escala piloto de ácido bio-succínico, foi agraciada com um subsídio de US \$ 50 milhões do Departamento de Energia dos EUA para promover um scale up. A instalação para produção comercial, que tem o início de operação planejado para o primeiro trimestre de 2013, será em Lake Providence, Louisiana, onde serão produzidos 13.600 toneladas de ácido succínico anualmente, com previsão de expansão para para 77.000 toneladas / ano até início de 2014.

Ainda em 2011, a Myriant e a Davy Process Technology (Davy), uma empresa Johnson Matthey, assinaram um memorando de entendimento, sobre a utilização de ácido succínico como matéria-prima para a obtenção de 1,4-butanodiol e gama-butirolactona (GBL), visando minimizar os custos de recuperação e purificação do ácido succínico, na etapa de Downstream. Nos últimos quinze anos, as empresas Davy desenvolveram uma tecnologia baseada em butanodiol obtido pelo anidrido maleico e, licenciou mais de meio milhão de toneladas de capacidade anual sobre a produção das diferentes misturas de tetraidrofurano (THF), butanodiol (BDO) e gama-butirolactona (GBL) (MYRIANT, 2012).

Outras empresas, como a BASF AG e a Purac Ltd, também anunciaram parcerias para iniciar em 2013 a produção de 25000 toneladas por ano ácido succínico em uma instalação na cidade de Barcelona, Espanha (PURAC,2012).

Enquanto isso, a Mitsubishi Chemical Corp. Ltd, e a PTT PLC estão em andamento com os estudos para fabricação do polímero biodegradável, PBS, derivado de ácido succínico (MM *et al.*, 2009).

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

Pode se concluir, que o interesse na produção de ácido succínico por fermentação está, claramente, associado às aplicações para a obtenção de plásticos biodegradáveis. Além disso, o uso de recursos renováveis resultam em uma redução de energia em torno de 30-40% em relação a um processo químico atual, diminuindo as emissões de CO<sub>2</sub>, já que se trata do primeiro processo onde o CO<sub>2</sub> é usado ativamente durante a produção (WILLKE & VORLOP, 2004; ZHANG, 2008).

### 2.3.2 Perspectivas em relação ao polibutileno ácido succínico

O mercado de polibutileno ácido succínico (PBS) é pequeno, mas deve aumentar junto a crescente demanda por plásticos biodegradáveis, segundo a Myriant. Polibutileno succinato é atualmente produzido pela combinação ácido succínico à base de petróleo e 1,4 butanodiol (BDO).

Myriant, BioAmber e Reverdia estão focadas no mercado de polibutileno succinato utilizando ácido succínico.

O Polibutileno Ácido succínico pode também ser combinados com os polímeros, tais como polipropileno (PP), poliestireno (PS) e policarbonato (PC), bem como os bioplásticos tais como o ácido poliláctico, poli-hidroxialcanoato, poli(3-hidróxi-butirato-3-hidróxi-valerato). Em compósitos, PBS pode ser combinado com fibras ou enchimentos para aplicações, tais como interiores de automóveis, não tecidos, materiais de construção e bens de consumo (MINH, *et al.*, 2010).

Segundo a BioAmber, estima-se que o mercado para polibutileno succinato, misturas de polibutileno succinato e compósitos de polibutileno succinato alcance US\$ 2 bilhões. A *joint venture* BioAmber-Mitsui foi contratada pela Mitsubishi Chemical para ser seu fornecedor exclusivo de ácido succínico usado para obtenção de polibutileno succinato. A Mitsubishi Chemical formou uma *joint venture* com o Grupo PTT, a PTT MCC Biochem, para produzir

polibutileno succinato derivado de açúcar, a partir de uma planta de 20 mil toneladas / ano (Rayong, Tailândia). Dados mostram que a Mitsubishi Chemical produz e comercializa, atualmente, polibutileno succinato em torno de 3000 toneladas / ano (Japão) (ICIS, 2012).

De acordo com a Mitsubishi Chemical, o mercado de polibutileno succinato derivado de petróleo é de 5.000 a 6.000 toneladas / ano, e acredita-se que esse mercado irá crescer para 50 mil toneladas / ano nos próximos cinco anos, e para 100 mil toneladas / ano em torno de 10 anos, devido ao interesse por produtos biodegradáveis e por indicativos de que o polibutileno succinato será baseado em fontes renováveis (ICIS, 2012).

## 2.4 Processos de produção de ácido succínico

São duas as possíveis rotas para a obtenção de ácidos orgânicos. A primeira delas é a síntese química. Através de reações catalíticas, os ácidos orgânicos são produzidos a partir de derivados de petróleo. Contudo, são necessárias diversas etapas, e forma-se uma quantidade considerável de CO<sub>2</sub>, gás que provoca o efeito estufa (BECHTOLD *et al.*, 2008). A alternativa é a rota fermentativa, em que podem ser utilizados soro de queijo, amidos e outras fontes de carbono de baixo custo como meio de cultivo. Os ácidos orgânicos são o produto final do metabolismo de bactérias, fungos ou leveduras, anaeróbios ou aeróbios facultativos (OKINO *et al.*, 2008).

### 2.4.1 Rota química

Atualmente, a maioria do ácido succínico produzido comercialmente é resultado da síntese química envolvendo a hidrólise de produtos derivados do petróleo, o qual está associado a processos ambientalmente não favoráveis, gerando níveis de poluição. Esse processo se dá com a oxidação do butano até anidrido maleico, que é hidrolisado até obtenção do ácido maleico (CORNIL & LAPPE, 2002). Em seguida, através de sua hidrogenação é obtido o ácido succínico (ZEIKUS *et al.*, 1999)

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

### 2.4.2 Rota fermentativa

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

condução do processo fermentativo, requer estudos prévios de otimização, visando maiores rendimentos, contribuindo para diminuir os custos do processo (MCKINLAY *et al.*, 2007).

Os desenvolvimentos recentes na produção de ácido succínico tem sido focados em alternativas biotecnológicas, em particular, baseados na utilização de transformação microbiana de biomassa renovável como matéria-prima. Nota-se que o fato de o CO<sub>2</sub> ser assimilado durante a fermentação do ácido succínico é considerado como uma vantagem do processo (HATTI-KAUL. *et al.*, 2007).

## 2.5 Matérias-primas utilizadas na produção de ácido succínico

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

Uma grande variedade de matérias-primas para a produção de ácido succínico, utilizadas como fonte de substrato/carbono/energia, pode ser encontrada descrita na literatura. Diferentes estratégias para fermentação também tem sido reportadas a partir de soro do queijo (SAMUELOV *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2000,2003a; WAN *et al.*, 2008), melão de cana de açúcar (AGARWAL *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008), hidrolisado de madeira (LEE *et al.*, 2003b e OKUDA *et al.*, 2007), hidrolisado da madeira destoxificado (HODEG *et al.*, 2009), hidrolisado da palha de arroz (DONNELLY, 2004), fibra de milho (CHEN *et al.*, 2010), resíduos de talo de milho (corn stover) (LI *et al.*, 2010), alcachofra e topinambo de Jerusalém (REN *et al.*, 2008); trigo (DORADO *et al.*, 2009), milhocina (AGARWAL *et al.*, 2006); palha de trigo (DU *et al.*, 2008) e hidrolisado do sake (CHEN *et al.*, 2010).

### 2.5.1 Substrato

O melão de cana, pré-tratado com ácido sulfúrico, foi consumido como fonte de carbono para a síntese de ácido succínico usando *A.succinogenes* CGMCC1593. Na fermentação anaeróbia em frascos, foi obtido 50,6 g/L de ácido succínico com uma produtividade de 0,84 g/L.h, e a taxa de conversão do açúcar foi de cerca de 95,6%. Durante a fermentação em batelada alimentada com injeção de CO<sub>2</sub> e pH controlado, concentrações mais elevadas de ácido succínico (55,2 g/L) e produtividade (1,15 g/L.h) foram alcançados (LIU . *et al.*, 2008).

Ácido succínico foi sintetizado por *A. succinogenes* 130 Z a partir de soro de queijo. em pH 6,8, inóculo de 5%, 0,5 vvm de de CO<sub>2</sub> e 200 rpm, concentração inicial de 50 g/L de soro de queijo. Foram obtidos 21,5 g/L de ácido succínico com um rendimento de 0,57 g/g de soro de queijo e produtividade de 0,44 g/L.h (WAN . *et al.*, 2008).



O sabugo do milho foi usado como substrato em um processo SSF (fermentação e sacarificação simultâneas) com *A. succinogenes* CGMCC1593 para obtenção de ácido. O material *in natura* foi pré-tratado alcalinamente antes da fermentação de modo que parte da lignina pode ser removida. A celulose e hemicelulose foram ainda hidrolisadas por celulases, e usadas como meio de produção de ácido succínico. O sabugo do milho após explosão por vapor e tratamento com NaOH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi hidrolisados por enzimas, para a obtenção de glicose, xilose e celobiose. Usando este substrato, *A. succinogenes* CGMCC2650 pode produzir 15,8 g/L de ácido succínico. Os autores observaram que glicose e xilose foram consumidas simultaneamente, enquanto celobiose não foi usada até que a glicose e xilose fossem esgotadas do meio (LI . *et al.*, 2010).

*A. succiniciproducens* pode produzir ácido succínico a partir de soro de leite, glicerol, hidrolisado de madeira pré-tratada e galatose. Autores examinaram a produção de ácido succínico usando meios contendo galactose/glicose e galactose/lactose, respectivamente. *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 29305 consome galactose como único substrato e síntese ácido succínico com um rendimento de 0,87 g/g. Quando a glicose e galactose coexistiam o *A. succiniciproducens* consumiu os dois tipos de açúcares simultaneamente. Além disso, quando uma mistura de lactose e galactose foi utilizada como substrato, o consumo de galactose não foi afetado pela presença de lactose. Os autores concluíram que a produtividade e economicidade da produção biotecnológica de ácido succínico pode ser melhorada pela co-fermentação a partir de galactose e outros açúcares (LI . *et al.*, 2008).

A produção de ácido succínico a partir do soro de leite, cujo principais componentes são a lactose, proteína e ácido láctico, foi investigada em processo contínuo e batelada alimentada usando culturas de *A. succiniciproducens* ATCC 29305. Utilizando um meio com CO<sub>2</sub> limitado (MgCO<sub>3</sub> 1g/L), apenas 48% da lactose foi metabolizada e o ácido láctico foi acumulado como produto principal. Porém, quando utilizado um meio com elevado nível de CO<sub>2</sub> (MgCO<sub>3</sub> 35 g/L), mais de 90% da lactose foi metabolizada e ácido succínico acumulado como produto principal. A maior produtividade de ácido succínico, 3 g/L.h, foi alcançada em processo contínuo e o rendimento foi de 0,64 g/g. Os valores de concentração e o rendimento de produto mais elevados (34,7 g/L e 0,906 g/g) foram obtidos em batelada alimentada (SAMUELOV. *et al.*, 1999).

Lee *et al.* (2001) descobriram que *A. succiniciproducens* ATCC 29305 pode metabolizar glicerol como fonte de carbono para acumular ácido succínico e o consumo de glicerol depende da concentração de extrato de levedura presente no meio. Quando o glicerol foi utilizado como

única fonte de carbono em um meio enriquecido com extrato de levedura, uma concentração igual a 19 g/L, de ácido succínico foi obtida. Quando uma mistura de glicerol-glicose foi utilizada como co-substrato, 29,6 g/L de ácido succínico foram produzidos. Os autores concluíram que a produção de ácido succínico a partir de glicerol tem algumas vantagens em relação ao uso de glicose, tais como aumento do rendimento de ácido succínico e a diminuição da formação de acetato.

*M. succiniciproducens* produziu ácido succínico quando cultivado em soro de leite e hidrolisado de madeira. Os resíduos celulósicos de madeira de carvalho, após pré-tratamento por explosão a vapor, foram hidrolisados com celulase obtendo-se uma mistura de glicose e xilose. Esta mistura foi previamente tratada com hidróxido de sódio antes da esterilização, visando reduzir inibidores. *M. succiniciproducens* MBEL55E metabolizou xilose e glicose como co-substrato em meio com base em hidrolisado de madeira para a produção de ácido succínico. Nas fermentações em batelada, 11,7 g/L de ácido succínico foi obtido, resultando em um rendimento de ácido succínico de 0,56 g/g de açúcar, com uma produtividade de 1,17 g/L.h, enquanto que as fermentações contínuas a uma taxa de diluição de 0,4 h<sup>-1</sup> resultaram em um rendimento de ácido succínico semelhante (0,55 g/g), mas com maiores valores de produtividade (3,19 g/L).

Usando a mesma estirpe em outros substratos como o soro de leite e a milhocina, foram investigadas a produção de ácido succínico conduzida em batelada e fermentação contínua. Em fermentações por batelada foram obtidos 13,4 g/L de ácido succínico, dando um rendimento de ácido succínico de 0,71 g/g de lactose e uma produtividade de 1,18 g/L.h. O rendimento em fermentação contínua encontrado a partir de lactose ficou entre 0,63-0,69 g/g. O maior valor de produtividade alcançado foi de 3,9 g/L.h, com uma taxa de diluição de 0,6 h<sup>-1</sup> (LEE. *et al.*, 2003).

A produção de ácido succínico a partir de hidrolisado enzimático do sabugo do milho usando uma espécie recombinante de *E. coli* SD121 foi estudada por Wang *et al* (2011). Neste caso, uma estratégia de batelada em duas fases (aeróbica e anaeróbica) foi usada. O cultivo aeróbio foi realizado primeiro durante 12 h com concentração de açúcares redutores cerca de 44 g/L e o crescimento celular entrou na fase média exponencial com 7,6 g/L de células em peso seco. Em seguida, a cultura anaeróbica foi conduzida com injeção de CO<sub>2</sub>. A concentração final de ácido succínico foi de 57,81 g/L. A produtividade global e o rendimento de ácido succínico em toda a fase anaeróbica foram de 0,96 g/L.h e 0,87 g/g de açúcar, respectivamente.

Açúcares a partir de hidrolisados de resíduos de biomassa (especialmente aqueles derivados a partir da fração hemicelulósica) têm sido utilizados para a obtenção de ácido

succínico por fermentação. O primeiro trabalho sobre aproveitamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de ácido succínico foi publicada por Borges (2011) utilizando *Actinobacillus succinogenes*. Foi utilizado o processo SSF, sacarificação e fermentação simultâneas, em frascos agitados, com uma concentração inicial de glicose igual a 75 g/L, relação sólido-líquido 3:10 (g/mL), carga enzimática 25 FPU/g, concentração inicial de células de 3 g/L e aproximadamente 32 horas de processo, obtendo uma concentração final de ácido succínico e produtividade volumétrica iguais a 35,1 g/L e 1,21 g/L.h, respectivamente.

Entretanto, a matéria-prima celulósica contém frequentemente inibidores que afetam negativamente o rendimento da fermentação e os rendimentos de ácido succínico. Estes inibidores podem incluir ácidos fracos, furanos e compostos fenólicos (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 1999. PARAJO, 1998)., podendo ser parcialmente removidos por processo de destoxificação. Entre os métodos mais conhecidos encontram-se aqueles destinados a mudanças de pH com CaO, Ca(OH)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou utilização de carvão ativo, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos e até enzimas (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996; POUTANEN *et al.*, 1990; HAHN HÄGERDAL *et al.*, 1991 e 1998). Para melhorar ainda mais o rendimento da fermentação, as condições de cultura apropriadas e técnicas de destoxificação devem ser desenvolvidas para aliviar as inibições.

## 2.5.2 Fornecimento de CO<sub>2</sub>

O fornecimento de CO<sub>2</sub> é uma variável importante na fermentação para produção de ácido succínico, podendo ser fornecido externamente ou mediante o uso de carbonatos dissolvidos no meio de fermentação. Quando o CO<sub>2</sub> ou carbonatos estão em solução aquosa, reagem com a água produzindo HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O equilíbrio entre o CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>-</sup> são definidos pelo pH do meio (Zou *et al.*, 2011)

Os efeitos dos níveis de dióxido de carbono na fermentação de glicose e crescimento celular, em pH 6,2, foram estudados por Samuelov *et al.* (1991). Neste estudo, a fonte de CO<sub>2</sub> fornecida foi MgCO<sub>3</sub>. Quando a relação molar entre o CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e glicose foi de 0,5-1,0, cerca de 15% do carbono disponível (glicose mais CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) foi convertido para a biomassa e 65% do carbono foi convertido para ácido succínico. Quando a relação molar entre o CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e glicose foi 0,065, apenas 8% do carbono foi convertido em biomassa. Aproximadamente 50% do carbono foi fermentado a lactato e 30% foi convertido em ácido succínico. Em baixa concentração de CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o rendimento de ATP foi de 0,75 mol/mol de glicose, ao passo que

em uma elevada concentração de  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ , o rendimento de ATP foi de 2,55 e 2,47, respectivamente. Os rendimentos de ATP foram significativamente maiores em condições em que havia  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$  suficientes, sugerindo que há um valor crítico de  $\text{CO}_2$  acima do qual a produção de ácido succínico por *A.succiniciproducens* melhora significativamente. Os autores concluíram que a produção de lactato em *A. succiniciproducens* foi controlada pelo pH elevado e que a produção de ácido succínico foi direcionada pela disponibilidade de  $\text{CO}_2$ . Em pH 6,2 e condições suficientes de  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ , o ácido succínico é acumulado como produto principal. A atividade da PEP carboxikinase é alta, mas a atividade da lactato desidrogenase e do álcool desidrogenase fica prejudicada. Em pH 7,2 e condições insuficientes de  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ , a atividade de PEP carboxikinase é ligeiramente menor e a atividade da lactato desidrogenase e álcool desidrogenase pode ser detectada (SAMUELOV *et al.*,1991).

O efeito da injeção de  $\text{CO}_2$  em pH diferentes sobre o crescimento de células e formação de ácido succínico foi investigado por Lee *et al.* (1999) usando *A. succiniciproducens* em fermentações em batelada com pH controlado e 0,25 vvm de fluxo de  $\text{CO}_2$ . O crescimento celular foi inibido pela injeção de  $\text{CO}_2$  em pH 6,2 e 6,5. Em pH 6,2, teve um rendimento de ácido succínico constante de 0,82-0,83 g/g de glicose com ou sem fornecimento de  $\text{CO}_2$ . No entanto, o rendimento do ácido succínico aumentou de 0,84 g/g, sem fornecimento de  $\text{CO}_2$ , para 0,88 g/g, com a fornecimento de  $\text{CO}_2$ , em pH 6,5. Em pH 7,2, tanto o peso seco de células, quanto o rendimento de ácido succínico diminuiu acentuadamente. Os autores concluíram que os diferentes rendimentos de ácido succínico foram devido a diferentes solubilidades de  $\text{CO}_2$  em pH diferentes. Isto pode explicar o aumento de rendimento na produção de ácido succínico com injeção de  $\text{CO}_2$  em pH 6,5. No entanto, não justifica o porque do rendimento de ácido succínico se manter constante, em pH 6,2, com ou sem fornecimento de  $\text{CO}_2$ . Diferente do rendimento de ácido succínico, a biomassa foi negativamente afetada pela injeção de  $\text{CO}_2$ . Esses fenômenos sugerem que o  $\text{CO}_2$  tem inibição seletiva sobre o metabolismo, afetando atividades enzimáticas intracelulares. Esta hipótese foi comprovada pela ação de algumas enzimas envolvidas em reações de carboxilação ou descarboxilação que são afetadas pelo suprimento de  $\text{CO}_2$  (LEE *et al.*,1999).

O efeito da disponibilidade de  $\text{CO}_2$  sobre a formação da biomassa e de ácido succínico na fermentação em diferentes pressões parciais de  $\text{CO}_2$  foram estudados por alguns autores em bateladas usando *M. succiniciproducens* MBEL55E. A formação de biomassa foi fortemente inibida sob baixa disponibilidade de  $\text{CO}_2$ . Apenas pouca formação de biomassa foi detectada durante as primeiras 4 h com a concentração de 8,74 mM de  $\text{CO}_2$  dissolvido. A formação de

biomassa e a produção de ácido succínico aumentaram à medida que a disponibilidade de CO<sub>2</sub> foi incrementada. Para disponibilizar mais CO<sub>2</sub> no meio, foram suplementadas variadas concentrações de NaCO<sub>3</sub>, MgCO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub> como fontes adicionais de CO<sub>2</sub>. Quando 119 mM de NaHCO<sub>3</sub> ou MgCO<sub>3</sub> foram adicionados, a formação da biomassa e de ácido succínico apresentaram um aumento. Comparando os rendimentos de biomassa e ácido succínico obtidos com uma concentração de 8,74 mM de CO<sub>2</sub> com os rendimentos obtidos sob a concentração de 141 mM de CO<sub>2</sub>, houve aumento de 49% para 52%, respectivamente. No entanto, a formação da biomassa e a produção de ácido succínico foram inibidos em algum grau nos meios com 238 mM de NaHCO<sub>3</sub> e MgCO<sub>3</sub> (correspondente a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido de 260 mM e 163 mM, respectivamente). Estes resultados mostram que a disponibilidade de CO<sub>2</sub> tem grande impacto sobre a formação de biomassa e de produtos. O pH é também um fator chave porque afeta a solubilidade do CO<sub>2</sub> no meio e como consequência influencia a disponibilidade de CO<sub>2</sub> para os microorganismos (SONG *et al.*, 2007).

### 2.5.3 Influência do pH no meio de cultura

O pH é um parâmetro fundamental no processo de bioconversão porque tanto as atividades enzimáticas intracelulares quanto a manutenção celular são estritamente dependentes do pH. Geralmente, o pH ótimo para culturas bacterianas é cerca de 6-7, nesta faixa a formação de biomassa ótima será obtida. A produção de ácido succínico por bioconversão é acompanhada pela acumulação de outros ácidos orgânicos, tais como acetato e lactato. Assim, durante a fermentação para produção de ácido succínico, se nenhum controle de pH for incluído, o meio irá aumentar a acidez gradualmente, causando inibição ao metabolismo celular (CHEG *et al.*, 2012).

Segundo VAN. *et al.* (1997), com a diminuição do pH de 7,0 para pH 5,2, o *Actinobacillus* sp. 130Z produziu acetato, formato, etanol e ácido succínico como produtos principais, mas a formação de biomassa foi desfavorecida. O pH ótimo para a formação de biomassa encontrado foi de 7,0. As concentrações de produto acumulados foram quase as mesmas dentro da faixa de pH 6,0 até pH 7,4. Resultados similares foram obtidos com *A. succinogenes* CGMCC1593, onde o microorganismo não se propagou e não houve acúmulo de ácido succínico a pH abaixo de 5,5 (LIU. *et al.*, 2008). O pH no qual foi encontrado o maior rendimento de ácido succínico foi 6,7. As razões molares de ácido succínico / acetato na faixa de pH 6,0-7,2 eram estáveis embora as concentrações fossem diferentes. Os efeitos de alguns neutralizadores como tampão (incluindo MgCO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH e NaOH) foram

investigados em fermentações ácido succínico usando *A. succinogenes* CGMCC1593. Os autores observaram que não houve acúmulo de ácido succínico ou outro ácido orgânico se  $\text{NH}_4\text{OH}$  for utilizado como tampão de neutralização. Quando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{NaOH}$  foi utilizado, as células flocularam após 16 h, e a concentração de biomassa caiu drasticamente. No entanto, o crescimento celular foi considerado normal durante o processo com  $\text{MgCO}_3$  como neutralizador de pH (LIU. *et al.*, 2008).

Verificou-se que *Enterococcus flavescens* acumula ácido succínico na faixa de pH 4,0-9,0. A produtividade máxima de 0,92 g/L.h foi alcançada em pH 6,5, acima do qual houve uma diminuição na concentração de ácido succínico. As enzimas envolvidas na formação de ácido succínico, tais como fosfoenol piruvato carboxilase (PPC), fosfoenol piruvato carboxiquinase (PPCK) e malato desidrogenase mostraram atividades máximas em pH 6,5. Do mesmo modo, verificou-se que a *M. succiniciproducens* MBEL 55E mostrou o crescimento de células em pH de 6,0-7,5 e acumulou ácido succínico, acetato e formiato a uma razão constante de 2:1:1 (AGARWAL. *et al.*, 2007).

Yuzbashev *et al.* (2010) modificou uma levedura *Yarrowia lipolytica* Y-3314 em que o gene de codificação de uma das subunidades da ácido succínico desidrogenase foi para possibilitar o uso de glicerol como um substrato a fim de produzir ácido succínico em pH abaixo de 3,5. Quando  $\text{CaCO}_3$  foi utilizado como tampão durante a fermentação em frascos agitados, a concentração média de ácido succínico encontrada foi de 45,5 g/L. Quando nenhum tampão foi utilizado, o pH diminuiu alcançando valores menores que 3,5 após 72 h de fermentação. No entanto, 17 g/L de ácido succínico foi acumulado na fase estacionária do crescimento celular.

## 2.6 Microrganismos produtores de ácido succínico

O primeiro passo no desenvolvimento de processos microbianos para síntese de ácidos orgânicos é identificar uma ou mais linhagens que produzam os metabólitos desejáveis e em quantidades aceitáveis. A variedade de linhagens que tem sido reportada como produtores em potencial de ácido succínico vêm se tornando uma realidade cada vez mais concreta, por se tratar de um intermediário metabólico comum de muitos microrganismos (CHENG *et al.*, 2012)

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

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

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

Dentre os microrganismos com grande habilidade para produzir ácido succínico, a *Anaerobiospirillum succiniproducens* sps; *Mannheimia succiniciproducens*; *Actinobacillus succinogenes* e a *Escherichia coli*, são os três mais indicados, de acordo com concentração final de produto e valores de rendimentos alcançados de acordo com as estratégias adotadas para cada caso. A bactéria *Anaerobiospirillum succiniproducens* é estritamente anaeróbica e gram negativa (ZEIKUS *et al.*, 1999), podendo ser considerada uma das mais eficientes, possuindo rendimento

e produtividade de 88% e 1,8.g/L.h, respectivamente, quando a concentração inicial de glicose utilizada foi de 40.g/L (LEE *et al.*,2003).

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

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

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

Devido a um vasto conjunto de ferramentas genéticas disponíveis e ao crescimento celular rápido e meio de cultura simples, *E. coli* é um dos sistemas mais estudado para a produção de ácido succínico. Estratégias em engenharia metabólica de *E. coli* podem ser classificadas em quatro métodos principais: melhoria do transporte de substrato, melhoria das rotas diretamente envolvidas na produção ácido succínico, deleção de vias envolvidas na acumulação de sub-produto, e combinações das técnicas anteriores (SANCHEZ . *et al.*, 2006).

Muitos esforços têm sido desenvolvidos na tentativa de obter altas concentrações de ácido succínico, a partir de *E. coli* modificada geneticamente (CHATTERJEE *et al.*, 2001; GOKARN *et al.*, 1997 e GOKARN *et al.*, 2001; HONG & LEE, 2001; VEMURI *et al.*, 2002). Para aumentar a produção, alcançando valores como 58.3 g/L de ácido succínico, várias estratégias já foram executadas, como a incorporação de betaína (aminoácido N-metilado) no meio, criando uma proteção natural para a célula. Valores elevados de concentração, rendimento



e de produtividades iguais a 86.5 g/L, 0.83 g/g, e 0.9 g/L.h (JANTAMA *et al.*, 2008), respectivamente, já foram registrados na literatura e, mesmo assim ainda está distante do valor ótimo para esta célula. Como subprodutos principais foram detectados a presença de piruvato, malato e acetato, sinalizando para uma possível deficiência no potencial redox desta linhagem.

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

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

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

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

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

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

*al.*, 2008 e LIU *et al.*, 2008). Já *A. succiniciproducens* pode produzir ácido succínico, acetato, formato, etanol e lactato a partir de glicose e lactose (ZEIKUS *et al.*, 1999).

As fontes de nitrogênio mais utilizadas são o extrato de levedura e polipeptona. Porém, resultados consideráveis foram obtidos com milhocina, que constitui uma fonte de nitrogênio mais econômica em comparação com as anteriores (LEE *et al.*, 2003). Fatores fisiológicos e nutricionais como concentração inicial de açúcar, fontes de nitrogênio, tamanho do inóculo, concentração dos íons carbonatos, pH e temperatura do meio de crescimento são reportados como os fatores mais críticos que afetam tanto o crescimento celular como a produção de ácido succínico (AGARWAL, *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 1999).

### 2.6.1 Metabolismo para produção de ácido succínico

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

A fermentação para obtenção de ácido succínico com *E. coli* pode ser através de processo anaeróbico ou de fase dupla, que consiste no crescimento aeróbio seguido por uma fase de produção anaeróbica. Na fase anaeróbica o fosfoenolpiruvato (PEP) e o piruvato são convertidos até formato, lactato e etanol, conforme mostra a Figura 1 (VEMURI *et al.*, 2002). As enzimas PEP carboxiquinase e PEP carboxilase atuam na carboxilação do PEP para produzir oxaloacetato (MILARD *et al.*, 1996). Já as bactérias *A. succinogenes* e *A. succiniciproducens* utilizam exclusivamente a via PEP carboxiquinase, onde a *A. succinogenes* utiliza quatro enzimas-chaves (PEP carboxiquinase, malato desidrogenase, fumarase e fumarato desidrogenase). A via PEP carboxiquinase é regulada pelo nível de CO<sub>2</sub>. Nas bactérias que utilizam esta via (*A. succiniciproducens* e *A. succinogenes*) a PEP carboxiquinase atua catabolicamente para fixar CO<sub>2</sub>, juntamente com ADP, e sintetizar oxaloacetato e ATP a partir do PEP. A concentração de CO<sub>2</sub> regula os níveis das principais enzimas da via PEP carboxiquinase, atuando como um acceptor de elétrons e alterando o fluxo do PEP, metabolizando piruvato e lactato/etanol em

baixos níveis de CO<sub>2</sub>, produzindo ácido succínico em altos níveis de CO<sub>2</sub>, conforme mostra a Figura 2 (KIM *et al.*, 2004; GUETLER *et al.*, 1996).

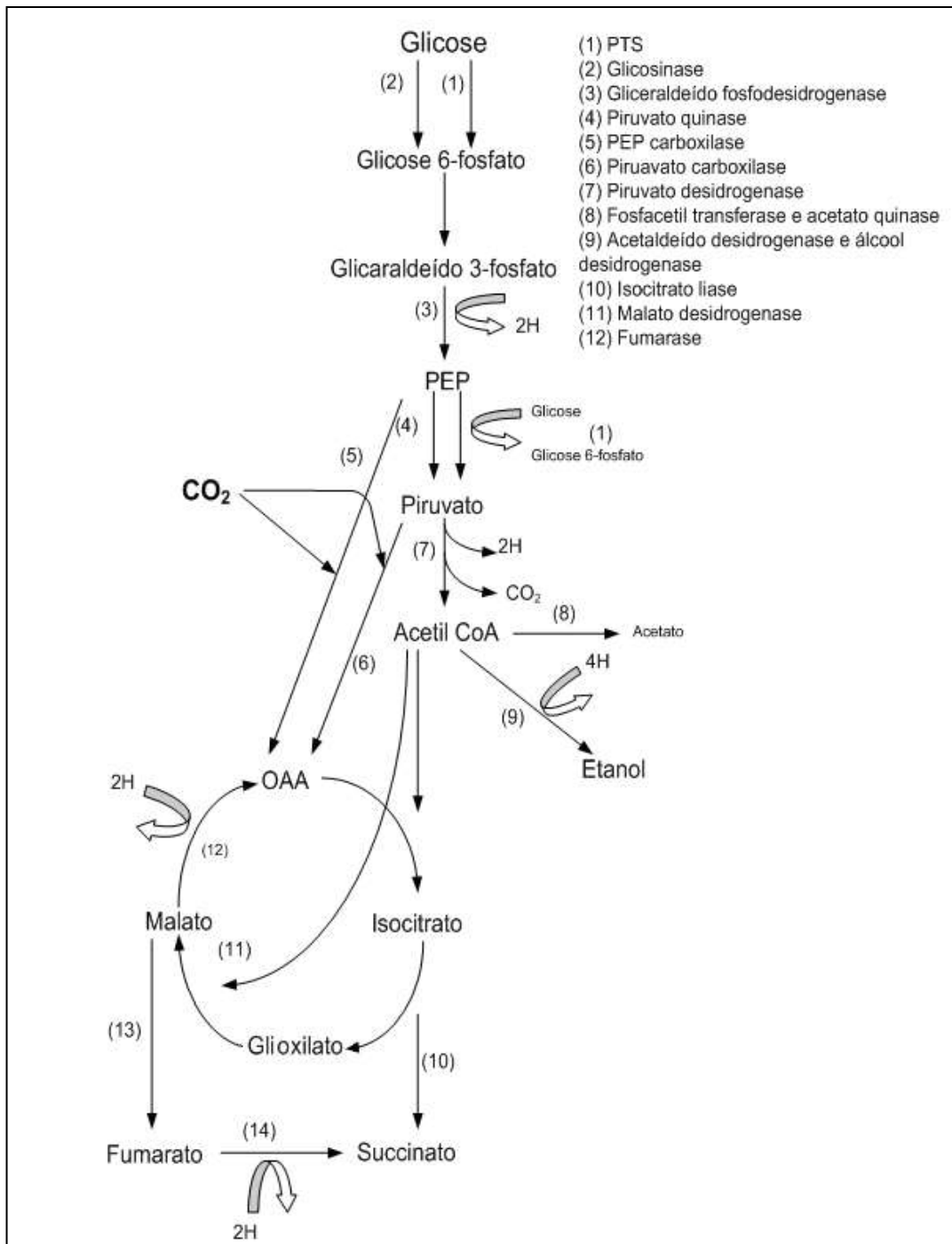


Figura 1: Via bioquímica para síntese de ácido succínico, por *E. coli*, em presença de glicose como fonte de carbono (VEMURI *et al.*, 2002).

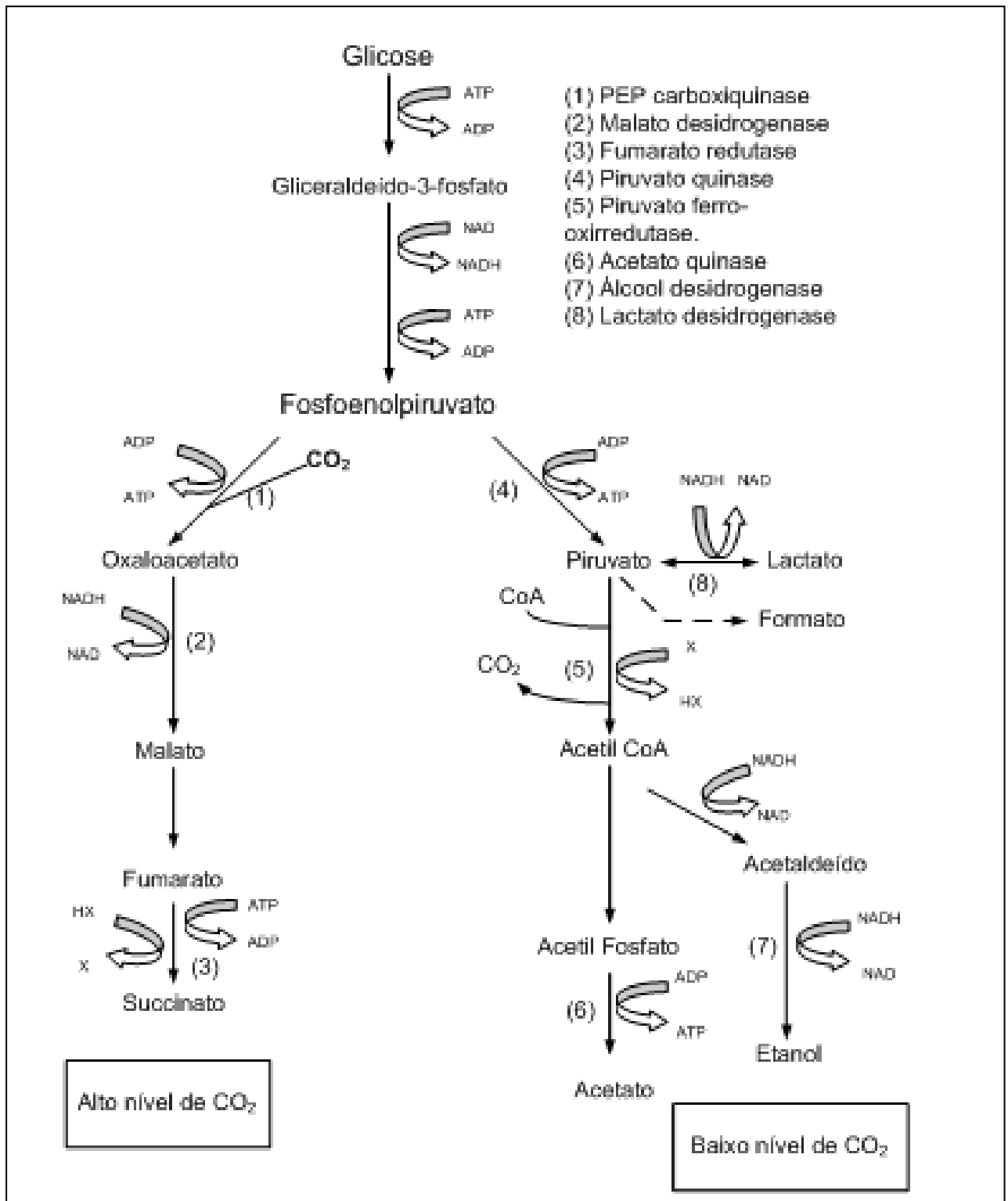


Figura 2: Metabolismo de *A. succiniciproducens* e *A. succinogenes*. (ZEIKUS *et al.*, 1999).

## 2.7 Estratégias de fermentação para a produção de ácido succínico

A Tabela 2, elaborada por BORGES (2011), avalia a produção de ácido succínico, mediante uma ampla revisão da literatura recente. Os aspectos selecionados para a análise foram os seguintes: as linhagens mais recorrentes (*A.succinogenes*, *A. succiniciproducens*, *M.succiniciproducens*, *E.coli*, *C.glutamicum* e *Bacteroides fragalis*), as estratégias de fermentação (aeração, operação do processo, componentes do meio e fonte de CO<sub>2</sub>), além dos valores de rendimento, taxa de formação de produto, concentração final de produto, produtividade volumétrica e subprodutos formados (BEAUPREZ *et al.*, 2010). Entre os trabalhos pesquisados, há um total de 11 patentes, que foram depositadas entre 1992 e 2005. Cabe ressaltar que os resultados encontrados para a linhagem *A. succinogenes* CIP 106512 foram os mais proeminentes.

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

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

Em um processo conduzido com batelada alimentada e reciclo de células, por *C. glutamicum* (OKINO *et al.*, 2008), uma concentração de 146 g/L de ácido succínico foi obtida.

Cabe ressaltar que os autores fizeram uso de engenharia metabólica para atingir os objetivos almejados. Utilizando a bactéria *A. succinogenes* CGMCC1593, ZHENG *et al.* (2009) conseguiram um rendimento de 80% em ácido succínico, a partir do hidrolisado da palha, após destoxificação para redução da concentração de inibidores do crescimento celular, além de conduzirem o processo em batelada alimentada.

Tabela 2: Valores encontrados e calculados para rendimento ( $Y_{p/s}$ ), produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) e taxa específica de formação de produto ( $q_p$ ), a partir dos dados obtidos pela literatura, para diferentes linhagens e estratégias de fermentação (BORGES,2011).

Linhasgens	Estratégia de fermentação	$Y_{p/s}$ (g/g)	$q_{AS}$ (g/g . h) <sup>d</sup>	$Q_p$ (g/L.h)	$P$ (g/L) <sup>c</sup>	Subprodutos <sup>b</sup>	Referências
<i>A. succinogenes</i>							
CIP106512	an; B; Xi, E.L, CO <sub>2</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	0.66	0.34	1.88	42.5	Fo,Ac	BORGES, 2011
CIP106512	an; B; Hbc, E.L, CO <sub>2</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	0.53	0.31	1.50	40.3	Fo,Ac	BORGES e PEREIRA Jr., 2011
CIP106512	an; B; Glc, E.L, CO <sub>2</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	0.52	0.27	1.77	41.6	Fo,Ac	BORGES, 2011
CIP106512	an; B; Bc(SSF), E.L, CO <sub>2</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	0.45	0.25	1.42	38.4	Fo,Ac	BORGES e PEREIRA Jr., 2011
FZ6	an; B; Mic, E.L, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.94	N.D.	1.01	63.7	Fo, Pi, Pr, Ac	GLASSNER <i>et al.</i> , 1996
130Z	an; B; Mic, E.L, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.79	N.D.	1.56	29–39	Fo, Pi, Ac	GLASSHER <i>et al.</i> , 1998
FZ53	an; B; Glc, Mic, E.L, MgCO <sub>3</sub>	0.82	N.D.	1.36	105.8	Fo, Pi, Pr, Ac	GUETLER <i>et al.</i> , 1996
130Z	an; B; Glc, Mic, E.L, Ac, MgCO <sub>3</sub>	0.87	N.D.	0.18	17.4	Fo, Pi, Ac	URBANCE <i>et al.</i> , 2003
130Z*	an; <b>Bs</b> ; Glc, Mic, E.L, Ac,	0.86	N.D.	0.88	33.9	Fo, Pi, Ac	URBANCE <i>et al.</i> , 2004
130Z	an; B; Glc, Def, NaHCO <sub>3</sub>	0.46	0.47	0.28	4.2	Fo, Ac, Et	MCKINLAY <i>et al.</i> , 2005
130Z	an; B; Glc, Def, NaHCO <sub>3</sub>	0.5	0.19	0.3	4.1	Fo, Ac, Et	MCKINLAY <i>et al.</i> , 2007
130Z	an; B; Glc, E.L, CO <sub>2</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	0.62	0.3	1.35	33.8	Fo, Ac	CORONA <i>et al.</i> , 2008
CGMCC1593	an; B; HM, E.L, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.79	N.D.	0.97	46.4	Fo, Ac	LIU <i>et al.</i> , 2008
CGMCC1593*	an; <b>BA</b> ; HM, E.L, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.94	N.D.	1.15	55.2	Fo, Ac	LIU <i>et al.</i> , 2008

<b>Linhagens</b>	<b>Estratégia de fermentação</b>	<b>Y<sub>p/s</sub> (g/g)</b>	<b>q<sub>AS</sub> (g/g . h)<sup>d</sup></b>	<b>Q<sub>p</sub> (g/L.h)</b>	<b>P (g/L)<sup>c</sup></b>	<b>Subprodutos<sup>b</sup></b>	<b>Referências</b>
CGMCC1593*	an; <b>BA</b> ; Glc, E.L CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.75	N.D.	1.3	60.2	Fo, Ac	LIU& ZHENG,2008
130Z	an; B; Sor, E.L, CO <sub>2</sub>	0.57	N.D.	0.58	50	Fo, Ac	WAN <i>et al.</i> , 2009
130Z	an; B; HTr, CO <sub>2</sub> , MgCO <sub>3</sub>	0.81	N.D.	1.19	64.2	Fo, Ac	DU <i>et al.</i> , 2008
CGMCC1593	an; B; HMil, CO <sub>2</sub> , MgCO <sub>3</sub>	0.81	N.D.	0.95	45.5	Fo, Ac	ZHENG <i>et al.</i> , 2009
CGMCC1593*	an; <b>BA</b> ; HMil, CO <sub>2</sub> , MgCO <sub>3</sub>	0.82	N.D.	1.21	53.2	Fo, Ac	ZHENG <i>et al.</i> , 2009
<b>A. succiniciproducens</b>							
ATCC 29305 <sup>a</sup>	an; B; Glc, Mic, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.79	N.D.	0.79	15.9	Fo, Ac, Et, La	SAMUELOV <i>et al.</i> , 1991
ATCC 53488	an; B; Glc, Mic, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.91	N.D.	1.93	43.5	Fo, Ac	SONG & LEE, 2006
ATCC 53488	an; B; Glc, P, E.L, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.88	N.D.	0.87	33.2	Fo, La, Ac	DATTA <i>et al.</i> , 1992
ATCC 53488*	an; <b>C2e</b> ; Glc, Mic , CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.85	N.D.	2.03	39.1	Fo, Ac	DATTA & JAIN, 1992
FA-10	an; B; Glc, Mi, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.66	N.D.	0.77	34.1	Fo, Ac, Pi	GUETLER & JAIN, 1994
FA-10	an; B; Glc, E.L, P, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.7	N.D.	0.78	31.6	Fo, Ac	GUETLER & JAIN, 1994
ATCC 53488	an; B; Glc, E.L, P, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.99	1.5	1.2	32.2	Fo, Ac	NGHIEM <i>et al.</i> , 1997
ATCC 53488	an; B; Glc, E.L, P, CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> ,	0.86	0.45	1.8	34.4	Ac	LEE <i>et al.</i> , 1999
ATCC 53488	an; B; Sor, Mic, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.84	N.D.	N.D.	34.3	Fo, La, Ac	SAMUELOV <i>et al.</i> , 1999
ATCC 53488*	an; <b>BA</b> ; Sor, Mic, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.91	N.D.	0.96	34.7	Fo, La, Ac	SAMUELOV <i>et al.</i> , 1999
ATCC 53488	an; <b>C</b> ; Sor, Mic, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.64	N.D.	3	19.8	Fo, La, Ac	SAMUELOV <i>et al.</i> , 1999
ATCC 53488	an; B; Glc/Gl, P, E.L, CO <sub>2</sub> ,	0.97	0.29	1.35	29.6	Ac	LEE <i>et al.</i> , 2001



Linhagens	Estratégia de fermentação	$Y_{p/s}$ (g/g)	$q_{AS}$ (g/g · h) <sup>d</sup>	$Q_p$ (g/L.h)	$P$ (g/L) <sup>c</sup>	Subprodutos <sup>b</sup>	Referências
ATCC 53488	an; B; HM, Mic, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.88	0.37	0.74	23.8	Ac	LEE <i>et al.</i> , 2003
ATCC 53488*	an; <b>Cm</b> ; Glc, P, E.L, CO <sub>2</sub> ,	0.88	1.1	10.4	83	Ac	MEYNIAL <i>et al.</i> , 2008
ATCC 53488*	an; <b>Cm</b> ; Glc, P, E.L, CO <sub>2</sub> ,	0.71	0.51	3.3	14.3	Ac	LEE <i>et al.</i> , 2008
ATCC 53488	an; B; Gal, P, E.L, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.87	1.32	1.46	15.3	Ac	LEE & CHANG, 2008
ATCC 53488	an; B; Gal/Glc, P, E.L, CO <sub>2</sub> ,	0.87	3	0.97	14.7	Ac	LEE & CHANG, 2008
<b><i>M. succiniciproducens</i></b>							
MBEL55E	an; B; Glc, P, E.L, CO <sub>2</sub>	0.70	0.54	1.87	14	Fo, La, Ac	LEE & HONG, 2002
MBEL55E	an; B; HM, Mic, E.L, CO <sub>2</sub>	0.72	0.37	1.22	13.5	Fo, La, Ac	LEE & CHANG, 2003
MBEL55E	an; C; HM, Mic, E.L, CO <sub>2</sub>	0.69	0.45	1.00	12	Fo, Ac	LEE & CHANG, 2003
MBEL55E	an; C; HM, Mic, E.L, CO <sub>2</sub>	0.60	1.77	3.90	5	Fo, La, Ac	LEE & CHANG, 2003
MBEL55E	an; B; HM, E.L, CO <sub>2</sub>	0.56	0.58	1.17	11.7	Fo, La, Ac	LEE <i>et al.</i> , 2003
MBEL55E	an; C; HM, E.L, CO <sub>2</sub>	0.60	1.80	1.40	9.5	Fo, La, Ac	LEE <i>et al.</i> , 2003
MBEL55E	an; C; HM, E.L, CO <sub>2</sub>	0.55	6.38	3.19	8	Fo, La, Ac	LEE <i>et al.</i> , 2003
LPK7*	an; <b>BA</b> ; Glc, E.L, CO <sub>2</sub>	0.76	0.72	1.80	52.4	Pi, Ma, Ac, La	LEE & SONG, 2006
MBEL55E	an; B; Glc, E.L, CO <sub>2</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	0.59	0.52	1.75	10.5	Fo, La, Ac	LEE <i>et al.</i> , 2007
LPK7	an; C; Glc (9 g/L), E.L, CO <sub>2</sub>	0.71	0.64	1.29	12.9	Pi, Ac, La	OH & LEE, 2008
LPK7	an; C; Glc (9 g/L), EL, CO <sub>2</sub>	0.29	0.78	1.56	5.2	Pi, Ac, La	OH & LEE, 2008
LPK7	an; C; Glc (18 g/L), EL, CO <sub>2</sub>	0.28	0.53	1.07	10.7	PI, Ac, La	OH & LEE, 2008

Linhagens	Estratégia de fermentação	$Y_{p/s}$ (g/g)	$q_{AS}$ (g/g . h) <sup>d</sup>	$Q_p$ (g/L.h)	$P$ (g/L) <sup>c</sup>	Subprodutos <sup>b</sup>	Referências
LPK7	an; C; Glc (18 g/L), EL, CO <sub>2</sub>	0.10	0.52	1.05	3.5	PI, Ac, La	OH & LEE, 2008
LPK7	an; B; Glc, Def, CO <sub>2</sub>	0.54	0.53	1.67	10.1	Fo, La, Ac	SONG & JANG, 2008
<b><i>E. coli</i></b>							
JCL1208pPC201	an; B; Glc, E.L, T, MgCO <sub>3</sub>	0.29	N.D.	0.59	10.7	Fo, Ac, Et, La	MILLARD <i>et al.</i> , 1996
NZN111pMEE1	d; B; Glc, E.L, T, CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> , MgCO <sub>3</sub>	0.64	N.D.	0.32	12.8	Ac, Et	STOLS & DONNELLY, 1997
MG1655/pUC18	an; B; Glc, E.L T, CO <sub>2</sub>	0.42	0.48	0.43	4.2	Fo, La	GOKARN <i>et al.</i> , 1998
<b>AFP111</b>	<b>d; B; Glc, Mi, CO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	<b>0.54</b>	<b>N.D.</b>	<b>0.52</b>	<b>51</b>	<b>Ac</b>	<b>NGHIEM <i>et al.</i>, 1999</b>
JCL1242- <i>pyc</i>	an; B; Glc, E.L, T, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.15	0.17	0.14	1.5	Fo, Ac, Et, La	GOKARN & ALTMAN, 2000
NZN111pTrcML*	d; <b>BA</b> ; Glc, E.L, T, CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	0.47	N.D.	0.08	9.4	Ma, Ac, Fo, La,	HONG & LEE, 2001
AFP400	an; B; Glc, EL, T, CO <sub>2</sub> , MgCO <sub>3</sub>	0.61	N.D.	0.61	6.1	Fo, Ac, Et, La	CHATTERJEE <i>et al.</i> , 2001
AFP111- <i>pyc</i>	d; B; Glc, EL, T, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.10	0.13	1.30	99.2	Ac, Et	VEMURI <i>et al.</i> , 2002
<b>NZN111pTrcML</b>	<b>d; B; So, EL, T, CO<sub>2</sub></b>	<b>1.10</b>	<b>N.D.</b>	<b>0.13</b>	<b>10</b>	<b>Ma, Ac, Et</b>	<b>HONG &amp; LEE, 2002</b>
SS373	d; B; Glc, EL, CO <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.73	N.D.	0.32	11	PI	CHANG & KIM, 2002
NZN111pTrcMLFu	d; B; Glc, EL, T, CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	0.35	N.D.	0.06	7	Ac, Et	HONG & LEE, 2004
HL27615k	ae; B; Glc, EL, T, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.45	N.D.	0.16	5	PI, Ac	LIN & BENNETT, 2005
HL27659k- <i>pepc</i> *	ae; <b>BA</b> ; Glc, EL, T, NaHCO <sub>3</sub>	0.62	0.09	0.72	58.3	PI, Ac	LIN & SAN, 2005
HL51276k- <i>pepc</i>	ae; B; Glc, EL, T, NaHCO <sub>3</sub>	0.71	0.05	0.14	8.3	PI, Ac	LIN & BENNETT, 2005
HL27659k*	ae; C; Glc, EL, T, NaHCO <sub>3</sub>	0.59	0.20	0.70	7	PI, Ac	LIN <i>et al.</i> , 2005

<b>Linhagens</b>	<b>Estratégia de fermentação</b>	<b>Y<sub>p/s</sub></b> <b>(g/g)</b>	<b>q<sub>AS</sub></b> <b>(g/g . h)<sup>d</sup></b>	<b>Q<sub>p</sub></b> <b>(g/L.h)</b>	<b>P</b> <b>(g/L)<sup>c</sup></b>	<b>Subprodutos<sup>b</sup></b>	<b>Referências</b>
SBS550MG*	an; <b>BA</b> ; Glc, EL, T, NaHCO <sub>3</sub>	1.06	0.21	0.42	40	Fo, Ac	SANCHEZ <i>et al.</i> , 2005
<b><i>E. coli</i></b>							
W3110GFA*	an; <b>BA</b> ; Glc, EL, NaHCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.2	N.D.	0.03	2.1	Fo, Ac, Et, La	LEE & KIM, 2005
SBS110MG- <i>pyc</i>	an; B; Glc, EL, T, NaHCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.9	N.D.	0.65	16	Fo, Ac	SANCHEZ <i>et al.</i> , 2005
TUQ19/pQZ6	d; B; Glc, EL, T, MgCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.8	N.D.	0.79	13	Ac, Et, La	WANG & CHEN, 2006
TUQ2/pQZ6/pQZ5	d; B; Glc, EL, T, MgCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.8	1.2	0.59	12	Ac, Et, La	WANG & WU, 2006
W3110	d; B; Sac, EL, T, CO <sub>2</sub> , MgCO <sub>3</sub>	1.2	N.D.	0.81	24	N.D.	ISAR <i>et al.</i> , 2006
<b>SBS550 pHL314*</b>	<b>an; BA; Glc, EL, T, NaHCO<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub></b>	<b>1.1</b>	<b>N.D.</b>	<b>0.42</b>	<b>40</b>	<b>Fo, Ac</b>	<b>KA-YIU <i>et al.</i>, 2005</b>
AFP184	d; B; Glc, Mic, CO <sub>2</sub>	0.8	N.D.	1.27	38	PI	ANDERSSON <i>et al.</i> , 2007
AFP184	d; B; Fru, Mic, CO <sub>2</sub>	0.7	N.D.	1.01	30	PI	ANDERSSON <i>et al.</i> , 2007
AFP184	d; B; Xi, Mic, CO <sub>2</sub>	0.5	N.D.	0.78	23	PI	ANDERSSON <i>et al.</i> , 2007
NZN111*	d; <b>BA</b> ; Glc, Ac, NaHCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.7	0.2	0.70	28	PI, Ac	WU & ZHOU, 2007
W3110	d; B; Me, Mic, CO <sub>2</sub> , MgCO <sub>3</sub>	0.52	N.D.	0.87	26	N.D.	AGARWAL <i>et al.</i> , 2007
KJ060	an; B; Glc, def, NaHCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.9	N.D.	0.90	87	Ma, Ac, La	JANTAMA <i>et al.</i> , 2008
KJ073	an; B; Glc, def, NaHCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.8	N.D.	0.82	79	Ma, Ac, PI	JANTAMA & HAUPT, 2008
KJ060	an; B; Glc, def, NaHCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	1.1	N.D.	0.61	73	Ma, Ac, La, PI	JANTAMA & HAUPT, 2008
KJ122	an; B; Glc, def, NaHCO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.9	0.4	0.88	83	Ma, Ac, PI	JANTAMA & ZHANG, 2008

<i>C. glutamicum</i> *							
R*	µae; <b>BArc</b> ; Glc, EL, Cas, NaHCO <sub>3</sub>	0.19	0.13	3.8	23	Ac, La	OKINO <i>et al.</i> , 2005
R <i>ΔldhA</i> -pCRA717*	µae; <b>BArc</b> ; Glc, EL, Cas, NaHCO <sub>3</sub>	0.92	0.06	3.17	146	Ac, Ma, La, PI	OKINO <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacteroides fragilis</i>							
MTCC1045	an; B; Glc, EL, P, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.62	N.D.	0.42	12.5	N.D.	ISAR & AGARWAL, 2006
MTCC1045	an; B; Glc, EL, P, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>	0.57	N.D.	0.83	20	N.D.	ISAR & AGARWAL, 2007

**Estratégia de fermentação:** an: anaeróbico, ae: aeróbico, d: duas fases; µae: microaeróbico; B: batelada, Bs: batelada sequencial (repetida); BA: batelada alimentada, BArc: batelada alimentada com reciclo de células, C: cultivo contínuo, C2e: sistema contínuo em dois estágios (2 taxas de diluição diferentes), Cm: cultivo contínuo integrado com sistema de membranas para reciclo de células.

**Meio de cultivo:** Xi: xilose, Glc: glicose, Gl: glicerol, Sac: sacarose, Fru: frutose Gal: galactose, So: sorbitol, P: peptona, T: triptona, E.L: extrato de levedura, Cas: casaminoácidos, Mic: milhocina, Sor: soro, HM: Hidrolisado de madeira pré-tratado, Me: melão de cana, HTr: Hidrolisado do trigo, HMil: Hidrolisado de resíduos de milho (corn stover), Bc: bagaço de cana-de-açúcar, Hbc: Hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar; Ac: acetato, Def: meio definido.

**Símbolos:** Qp: produtividade volumétrica, q<sub>AS</sub>: taxa específica de formação de ácido succínico, Yp/s: rendimento em produto por substrato consumido, N.D: Nenhum dado foi mencionado

**Subprodutos:** Fo: ácido fórmico, La: ácido láctico, Ac: ácido acético, PI: piruvato, Ma: malato, Pr: propionato, Et: etanol.

**Índices:** **a:** ATCC 29305 foi depositado novamente, como ATCC 53488, em 1992. **b:** Em muitos casos, não houve a formação de todos os subprodutos. **c:** Alguns casos apresentaram valores baixos na concentração de ácido succínico, devido ao uso de pequenas concentrações iniciais de fonte de carbono ou adotaram uma estratégia de fermentação pouco eficiente. **d:** Muitos estudos não apresentaram dados suficientes para que fossem realizados todos os cálculos referentes às taxas específicas de formação de produto.

\* Processos que utilizaram estratégias diferentes da condução em Batelada simples.

Dados em vermelho representam as referências de trabalhos que foram depositados como patente.

## 2.7 Processos de separação e purificação de ácidos orgânicos

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

O custo de processamento a jusante da fermentação corresponde a uma fatia muito elevada no custo total da produção, representando cerca de 50-70% deste (BECHTHOLD *et al.* 2008).

O processo de *downstream* para produção biológica de ácido succínico inclui geralmente três etapas principais. A primeira etapa versa sobre a remoção de células microbianas, principalmente por meio de filtração por membrana ou por centrifugação. A segunda etapa é a remoção de impurezas e a separação primária de ácido succínico a partir do caldo de fermentação utilizando-se, por exemplo, a evaporação para remoção de água ou de ácido acético, precipitação, eletrodialise, extração com solvente, a extração reativa, adsorção com resina de troca iônica, carvão ativado, peneira molecular ou uso de zeólita. O último passo é a purificação final de ácido succínico por evaporação sob vácuo e cristalização (CHEG *et al.*, 2012).

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

A técnica alternativa mais estudada é a extração líquido-líquido (ELL) reativa, onde é utilizada normalmente uma amina como extrato (HESTEKIN *et al.*, 2002). O sucesso de um processo de extração líquido-líquido depende muito da escolha do extratante mais conveniente, como por exemplo, alguns organofosforados, aminas alifáticas, solventes compostos e solventes simples com a adição de sais. (LINTOMEN, 1999).

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

O processo de separação permanece como um dos assuntos mais discutidos, quando a produção microbiana de ácido succínico é avaliada. Para uma efetiva aplicação industrial, conforme mostra a Tabela 3, a escolha do processo depende da escalabilidade, robustez, rendimento de separação global e principalmente dos custos envolvidos (KURZROCK *et al.*, 2010 e SONG & LEE, 2007).

Tabela 3: Parâmetros para aplicação de processos de separação (BORGES, 2011).

<b>Métodos</b>	<b>Escalabilidade</b>	<b>Robustez</b>	<b>Rendimento (separação)</b>	<b>Custo</b>
Ultrafiltração	-	+	+	-
Precipitação	+	+	-	-
Eletrodialise	-	-	+/-	-
Extração líquido-líquido	+	+	+	-

Entre os ácidos orgânicos, o ácido succínico é um dos mais facilmente extraídos para a fase orgânica, devido a sua baixa polaridade, pois é dicarboxílico, enquanto outros ácidos são, por exemplo, monocarboxílicos. Quanto menor a polaridade, menores são as interações com a água e mais “livre” se encontra o ácido para ser extraído pela

fase orgânica. Ácidos, em geral, mais polares apresentam uma forte ligação com a água, tornando-se então menos extraíveis pela fase orgânica. As interações com a água são do tipo ligações de hidrogênio que ocorrem entre grupos carboxilas e hidroxilas do ácido com as moléculas de água (Lintomen *et al.*, 1990).

Nos parágrafos abaixo encontram-se expostos alguns resultados relacionados a técnicas de *downstream*.

### 2.7.1 Cristalização direta

Como um dos processos mais antigos, mas eficaz, para a preparação de cristais de ácido succínico, é o processo de cristalização, que é utilizado geralmente como o passo final da purificação. A cristalização direta pode proporcionar o produto desejado sob a forma sólida sem a necessidade de muitas operações unitárias. No entanto, o rendimento do produto é baixo porque há muito ácido succínico residual no caldo e a pureza do produto é baixa a ponto de não poder ser usado como um monômero para polimerização. Para obter um elevado grau de pureza (> 99%) de ácido succínico, se faz necessário um processo de purificação para remover impurezas iônicas residuais no meio (Cheng *et al.*, 2012).

O método de cristalização direta foi estudado por Li *et al.* em 2010. O princípio deste método é que os ácidos carboxílicos tem uma distribuição entre as formas dissociada e não dissociada em pH variados, e o ácido carboxílico não dissociado tem solubilidade diferente. Descobriu-se que a solubilidade do ácido succínico foi de apenas 3% a 4 ° C e pH 2,0 enquanto os outros subprodutos, tais como o ácido láctico, ácido acético e ácido fórmico, eram ainda totalmente miscível em água. Neste estudo, a cristalização de ácido succínico a partir do meio de cultura foi realizada a 4 ° C e com pH < 2. Enquanto os ácidos subprodutos permaneceram solubilizados, o ácido succínico pode ser seletivamente cristalizado. Por este método de recuperação de um só passo, a produtividade e a pureza de ácido succínico atingiram 70% e 90%, respectivamente (LI *et al.* 2010).

## 2.7.2 Precipitação

Um método tradicional para o isolamento de ácidos orgânicos contidos em um meio fermentado é a precipitação com  $\text{Ca(OH)}_2$  ou  $\text{CaO}$ . Esta técnica é usada comercialmente para ácido láctico e ácido cítrico. No caso do isolamento de ácido succínico, após a adição de  $\text{Ca(OH)}_2$  ou  $\text{CaO}$ , o succinato de cálcio é separado do meio por filtração. O sal obtido reage com o ácido sulfúrico concentrado, resultando no ácido succínico livre. O ácido succínico é adicionalmente purificado por adsorção em carvão ativado ou por troca iônica, e em seguida, o produto é concentrado e cristalizado por evaporação (INCI & USLU, 2005).

Durante o processo de precipitação, altas concentrações de  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaO}$ , e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  são utilizadas. O uso destes reagentes em grande quantidade eleva os custos de operação. Além disso, outra desvantagem da precipitação com  $\text{Ca(OH)}_2$  ou  $\text{CaO}$  é o subproduto sulfato de cálcio em nível substancial (quantidade molar igual a de ácido succínico), e que não pode ser vendido diretamente como um produto devido a impurezas de odor e cor. Um tratamento adicional para este subproduto se faz necessário (Datta *et al*, 1992). A grande vantagem da precipitação com  $\text{Ca(OH)}_2$  ou  $\text{CaO}$  é que ele pode utilizar diretamente, ou com pequenas adaptações, os equipamentos existentes, a tecnologia já madura, e infra-estrutura já existentes e muito utilizadas na indústria de ácido láctico ou ácido cítrico. A precipitação com esses reagentes pode ser um processo viável para a produção comercial de ácido succínico com baixas barreiras tecnológicas e poucos riscos.

A precipitação com amônia foi pesquisada por Yedur *et al.* em 2001. O succinato de diamônio é obtido ajustando o pH do meio utilizando um composto à base de amônia. O succinato de diamônio do meio é então reagido com o ácido sulfúrico para produzir o precipitado de ácido succínico e o sulfato de amônio. O ácido succínico precipitado é purificado utilizando recristalização com metanol. O sulfato de amônio subproduto pode ser convertido em bissulfato de amônio ou a amônia por pirólise. O ácido succínico pode ser recuperado com um rendimento de 93,3% considerando o succinato de diamônio disponível no meio (Yedur *et al.* 2001). A vantagem da



precipitação utilizando este reagente é a menor quantidade de resíduos e subprodutos e a possível reciclagem de reagentes utilizados. As principais desvantagens são o alto consumo de energia e a corrosão de equipamento devido ao baixo pH e alta temperatura no ciclo dos reagentes utilizados (CHENG *et al.*, 2012).

### 2.7.3 Separação por membrana

A filtração por membrana (incluindo a microfiltração, ultrafiltração, e nanofiltração) e eletrodialise tem sido bastante estudadas atualmente para a separação e purificação do ácido succínico.

Na patente de Yao *et al.* (2008), o caldo de fermentação de ácido succínico foi tratado sucessivamente por microfiltração, ultrafiltração e adsorção em carvão ativado, respectivamente. O filtrado obtido foi acidificado a pH 2 e concentrado, sob vácuo, a 65°C para remover água e ácido acético. A cristalização da solução concentrada de ácido succínico foi então realizada, proporcionando um elevado grau de pureza (> 99,5%) do ácido de interesse com um rendimento superior a 75%.

Um meio de fermentação de ácido succínico a partir de hidrolisado de palha de milho foi submetido sucessivamente a microfiltração, ultrafiltração e a nanofiltração, removendo-se partículas de tamanho superior a 0,2 µm, peso molecular superior a 5000 Da, e posteriormente 150-350 Da, respectivamente, em cada tratamento. O filtrado final foi então concentrado sob vácuo e cristalizado para se obter um elevado grau de pureza (> 99,4%) de ácido succínico (WU *et al.* 2011).

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

#### 2.7.4 Extração

Em comparação com outros métodos de separação, a extração por solventes tem como vantagens o rendimento elevado e o baixo consumo de energia. Algumas tentativas tem sido feitas para recuperar o ácido succínico a partir de caldos de fermentação por extração líquido-líquido utilizando solventes extrativos, incluindo os hidrocarbonetos alifáticos, álcoois alifáticos, cetonas e organofosfatos.

Kurzrock *et al.* (2010) encontraram o maior rendimento da extração de ácido succínico a partir de uma solução aquosa com 423 mM de ácido succínico, a pH 2,0. Foram obtidos com 95% de rendimento utilizando trihexalamina misturado a 1-octanol, ou com di-hexalamina e iso-dioctilamina misturado em 1-octanol e 1-hexanol . A aplicação destes sistemas de extração reativa otimizados em caldo de fermentação de *E. coli* resultou em rendimentos de 78-85% na extração, devido ao aumento da força iônica do sobrenadante da fermentação e da coextração de outros ácidos orgânicos (por exemplo, ácido láctico e ácido acético).

Uma etapa de pré-tratamento para remoção de subprodutos usando extração reativa foi estudada por Huh *et al.* (2006). Ao controlar o pH em 5,0, subprodutos, tais como os ácidos acético, fórmico, láctico, pirúvico presentes no caldo de fermentado por *M. succiniciproducens* KCTC 0769BP foram seletivamente removidos utilizando extração reativa com tri-n-octilamina em 1-octanol. O ácido succínico remanescente no sobrenadante da fermentação foi então tratado por destilação sob vácuo e cristalização a um pH de 2 a fim de purificar o ácido succínico a 99,8%, obtiveram como rendimento de 73,1% em peso.

Song *et al.* (2007) propôs um processo semelhante na recuperação de ácido succínico em caldo de fermentação de *M. succiniciproducens* KCTC 10626BP. A pureza final do ácido succínico foi de 99,5% com um rendimento de 67,1% em peso.

Orjuela *et al.* (2011) apresentou uma abordagem para a obtenção de ácido succínico a partir do meio de fermentado promovendo acidificação e esterificação em etanol. O caldo de fermentação foi centrifugado para remover a biomassa celular e, para remoção de impurezas tais como fragmentos de proteínas e corpos coloridos, utilizou o tratamento por carvão ativado. A água foi removida do caldo tratado até que os sais de

succinato estivessem presentes na forma de sólidos úmidos. Esses sólidos foram colocados em etanol, juntamente com ácido sulfúrico em ligeiro excesso estequiométrico. A acidificação e esterificação simultâneas ocorreu de maneira que o sal de sulfato inorgânico formado precipitou na solução alcóolica. O ácido succínico foi recuperado como solução de ácido succínico livre, monoetil succinato, e dietil ácido succínico em etanol, mistura esta, adequada para esterificação por destilação reativa. A recuperações das espécies de ácido succínico em excesso foi de 95%.

Moraes (2011) abordou o uso de contactores com membranas para separações líquido-líquido, usando composto orgânico como extrator. Contactores com membranas são tipicamente dispositivos do tipo casco e tubo, análogos aos trocadores de calor convencionais, mas contendo feixe de membranas de fibra oca de diâmetro extremamente reduzido, o que permite obter elevada razão entre área de troca e volume de módulo. Uma das fases fluidas circula pelo interior das fibras, enquanto a outra circula pelo casco, com a operação podendo ser tanto concorrente quanto contracorrente (Moraes, 2011). Obteve-se 77% de eficiência na extração utilizando amina Primene JM-T, capacidade esta, superior a outros extratores destacados pela literatura e comparados no mesmo trabalho.

### 2.7.5 Cromatografia

As propriedades-chave desejadas para um adsorvente ideal são alta capacidade de adsorção, completa regenerabilidade e especificidade ao produto (CHENG *et al.*, 2012).

Uma zeólita com alta concentração de sílica ( $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3=218$ ) foi utilizada na recuperação do ácido succínico em água. O ácido succínico adsorvido nas colunas foi completamente dessorvido usando água a 80 ° C, sendo eficientemente separado. No entanto, em fase posterior, em experimentos utilizando meio fermentado a capacidade de adsorção das colunas diminuiu acentuadamente e esta capacidade só pode ser restaurada por calcinação a 600 ° C (EFE *et al.*, 2011).

Jun *et al.* (2007) propuseram o uso de sílica SBA-15 funcionalizada com adção de amino como um potencial adsorvente nos processos de separação e purificação do ácido succínico. A adsorção competitiva de ácido pirúvico e ácido succínico foi estudada usando uma composição semelhante a do meio de fermentação. Através da análise do calor isoestérico de adsorção e da análise termogravimétrica, eles descobriram que a adsorção originou-se da formação de complexos ácido-amino por ligações de hidrogênio. O ácido pirúvico foi adsorvido três vezes melhor do que o ácido succínico. Assim, este tipo de sílica parece ser mais adequada para a remoção de contaminantes ácidos do meio fermentado do que para a separação do ácido succínico.

Ponnampalam (1999) sugeriu o uso de resinas de troca iônica do tipo alcalinas para recuperar o ácido succínico do meio fermentado. A primeira etapa do procedimento consistiu em uma lavagem com água para remover material não aderente a resina. Um ácido inorgânico forte foi usado para liberar o ácido succínico. Esse método pode seletivamente recuperar ácido succínico, ácido acético e ácido láctico. A purificação adicional do ácido succínico foi realizada por cristalização produzindo cristais de ácido succínico com pureza maior que 99%.

### 3. Metodologia

Apesar da complexidade metodológica para a construção e uso de indicadores de produção científica, o seu emprego se dissemina: tanto para o planejamento e a execução de políticas como para a melhor compreensão sobre a ciência pela própria comunidade científica, pela comunidade empresarial e por outros segmentos da sociedade. (FAPESP, 2010)

#### 3.1 Base de Dados de Artigos Científicos Utilizada

Uma das etapas deste trabalho foi o levantamento de informações visando estabelecer um panorama evolutivo do interesse pelo tema “ácido succínico”. As pesquisas foram realizadas na base de dados *on-line* “*web of science*”, a partir dos artigos indexados no *Institute for Scientific Information* (ISI). A base ISI contém estatísticas de publicação e citação de mais de 170 países e 105 campos, representando mais de 9.000 periódicos nos diversos campos científicos. A base contém publicações a partir de 1945 e permite acesso ao título, resumo, autor(es), ano de publicação do artigo, nome do periódico, endereço do autor principal, referências, citações recebidas entre outras informações (CAPES, 2007).

A escolha da base ISI para seleção de artigos se justifica em função de sua relevância, pois é considerada pelo meio científico como uma das bases de dados mais relevantes e completas para pesquisa bibliográfica de artigos científicos. Além disso, oferece um conjunto de funcionalidades (por exemplo, a busca por artigos relacionados, a utilização de filtros variados para facilitar a pesquisa etc.) que possibilitaram a realização de uma pesquisa com maior profundidade no assunto de interesse e na avaliação da relevância dos artigos, através da análise de citações. (LIMEIRA, 2007).

O *Derwent Innovations Index* (DII), da Thomson Derwent, é uma potente ferramenta de pesquisa de patentes, combinando recursos do *Derwent World Patents Index* e do

*Patents Citation Index*. O DII contém mais de 11 milhões de invenções básicas e 22 milhões de patentes, com cobertura desde 1963 até o presente. Cerca de 25.000 novos registros de patentes são adicionados ao banco de dados por semana (DII, 2009).

### 3.2 Estratégia de Busca Utilizada

A determinação da palavra chave para a amostragem dos artigos e patentes foi realizada de tal forma a englobar aqueles cujo tema principal fosse a produção biotecnológica de ácido succínico. Em ambas as bases de pesquisa on-line, é possível realizar a ferramenta chama “busca avançada”, na qual é oferecida a opção de pesquisar definindo campos como assunto, título, autor, ano de publicação, país, ISSN (identificação internacional de periódicos).

Contudo, utilizou-se uma busca generalizada selecionando os campos de assunto (topic – TS) ou título (title – TI). A opção de busca por assunto engloba palavras encontradas tanto no título quanto no resumo da publicação.

A busca foi realizada mediante três procedimentos sendo o primeiro a busca por artigos sobre ácido succínico, por meio do termo “*succinic acid*” fixando o período da busca para publicações entre o ano de 1990 a 2012.

O segundo procedimento consistiu na busca de dos trabalhos a cerca de fermentações que tivesse como produto o ácido succínico por meio dos termos: “*succinic acid*” no título, a ferramenta lógica AND e “*fermentation*” no campo “tópico”.

O terceiro procedimento foi similar ao segundo exceto pela substituição do termo ácido succínico, no campo título, por “*succinic acid production*”, objetivando refinamento da busca.

Uma metodologia análoga a anteriormente apresentada foi utilizada para a base Derwent, porém em apenas duas fases. Na primeira, buscou-se as patentes que continham a expressão “*produção de ácido succínico*”, ressaltando que o idioma usado nas buscas é o inglês. E, na etapa posterior, os campos “título” e “tópico”, foram

preenchidos, respectivamente, pelos termos “produção de ácido succínico” e “fermentação”.

### 3.3 Tratamento dos dados obtidos

A seleção de um artigo ou patente das bases de dados foi feita apenas quando, de maneira clara e inequívoca, seu resumo apresentou o ácido succínico produzido por rota biotecnológica como assunto principal, salvo como exceção, a pesquisa a respeito de patentes sobre produção de ácido succínico sem restrições que teve um objetivo específico o que pode ser percebido na seção onde os resultados são apresentados.

As respostas às buscas da seção 3.2 são uma listagem dos artigos ou patentes correspondentes as condições impostas nos campos de busca. Esses artigos foram quantificados e analisados. Essas informações foram utilizadas para gerar gráficos demonstrativos utilizando o *software Microsoft Office Excel 2007*.

## 4. Resultados

### 4.1 Panorama geral das pesquisas sobre ácido succínico

#### 4.1.1 Dados levantados na base *on-line* “*Web of science*”

Nas pesquisas realizadas na base de dados *on-line* “*web of science*”, utilizando-se a expressão “*succinic acid*”, no período de 1990 a 2012, foram localizados um total de 884 artigos. Refinando-se a pesquisa, adicionando o termo “*fermentation*”, foi possível listar os trabalhos versando a produção de ácido succínico associado a um processo de fermentação. Entretanto, cabe ressaltar, que os artigos não tratam necessariamente da produção deste ácido como produto principal. A pesquisa mostrou um total de 180 publicações.

Realizando-se uma busca mais avançada da pesquisa, focalizando a produção microbiana de ácido succínico, utilizou-se os termos “*succinic acid production*” e “*fermentation*”. Nesta etapa, foram identificadas 102 publicações, classificadas segundo ano da publicação na Figura 3 e segundo os países de origem dos trabalhos na Figura 4.



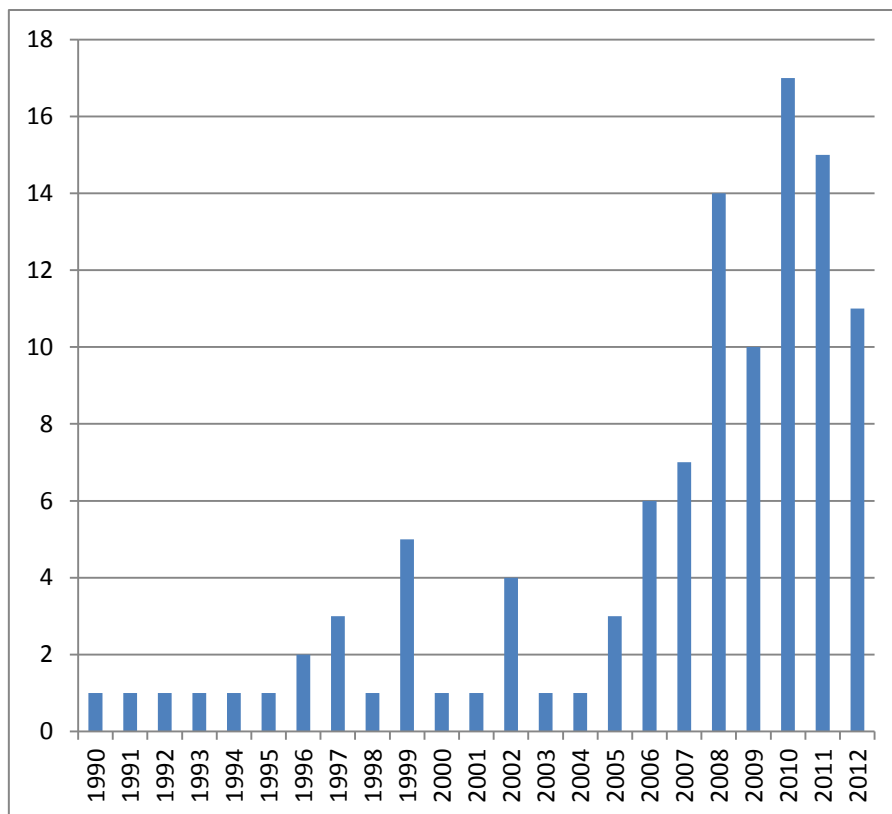


Figura 3: Número de artigos sobre produção de ácido succínico por ano de publicação.

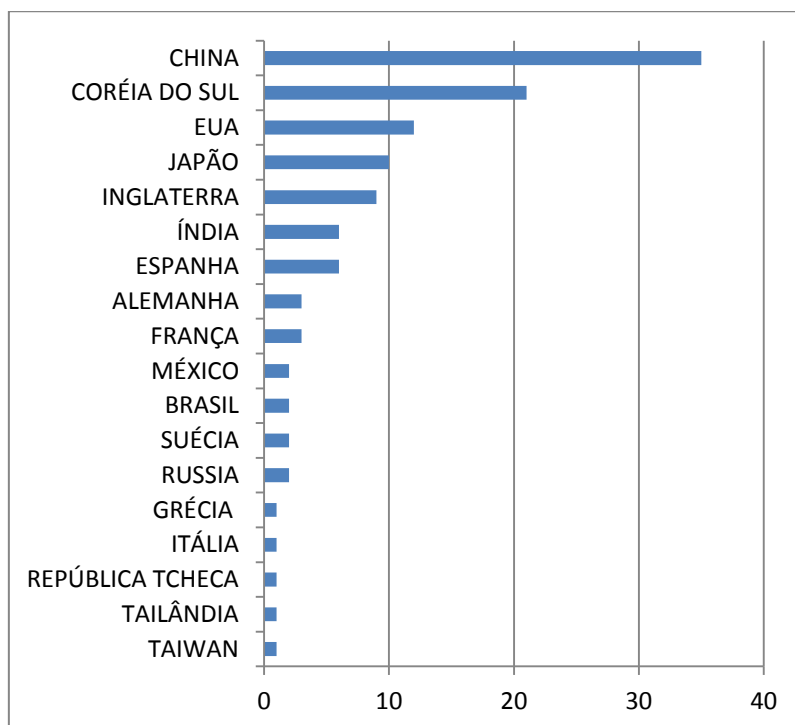


Figura 4: Número de publicações sobre produção de ácido succínico por país de origem no período de 1990 até 2012.

Com base nos resultados encontrados, uma análise de dispersão geográfica pode ser aplicada agrupando-se os países de origem dos artigos científicos por continente pertencente, é possível perceber a liderança dos grupos de pesquisa asiáticos, considerando o volume de publicações, seguido dos representantes europeus e da América do Norte, como disposto na Figura 5. Porém, vale ressaltar a contribuição das pesquisas brasileiras como país pioneiro na América do Sul a desenvolver trabalhos sobre ácido succínico por rota biotecnológica.

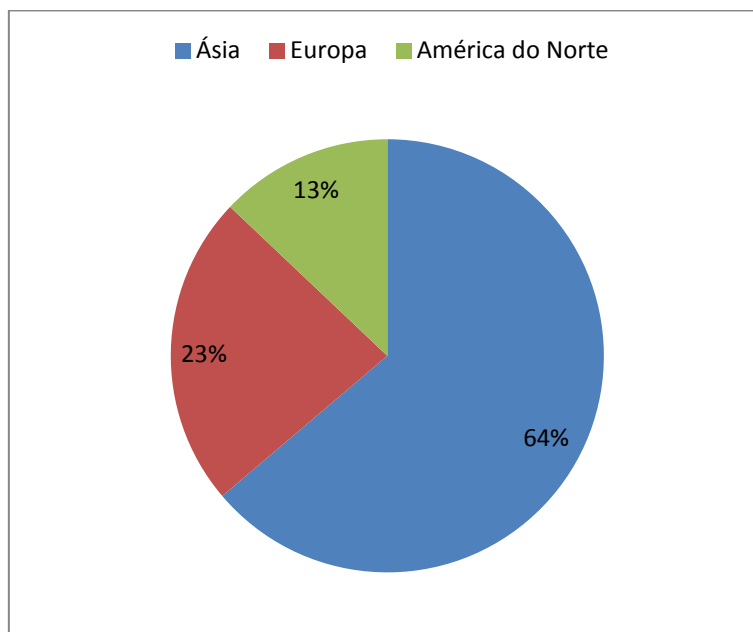


Figura 5: Análise da dispersão geográfica dos artigos sobre produção biotecnológica de ácido succínico.

Quando foi realizada a pesquisa utilizando apenas o termo “produção de ácido succínico”, foi possível fazer uma comparação entre os resultados apresentados anteriormente (102 publicações) e, verificou-se que há um total de 135 trabalhos publicados na faixa de tempo estabelecida, mostrando um direcionamento das pesquisas para produção biotecnológica desse ácido.

#### 4.1.2 Dados levantados na base *on-line* “Derwent”

Em uma segunda etapa desta pesquisa, foi realizada a busca de quantidades de patentes depositadas no mesmo período, mediante o uso da base de dados *on line* chamada *Derwent Innovations Index<sup>SM</sup>*.

Adotando-se os termos “produção de ácido succínico” e “fermentação” há 22 registros de patentes. Ampliando-se o campo utilizando apenas o primeiro termo, observou-se um total de 1770 registros. Esta grande diferença pode ser atribuída ao fato da produção de ácido succínico por rota biotecnológica ainda ser um assunto em desenvolvimento no qual as respostas ainda estão sendo estudadas e sendo estabelecidas.

#### 4.2 Desafios e perspectivas associadas aos processos de separação e purificação de ácido succínico

As dificuldades no desenvolvimento de um processo eficiente para a separação de ácido succínico de meios de fermentação estão associadas com a hidrofília do produto alvo e a complexidade do caldo de fermentação. A Tabela 4 apresenta as vantagens e desvantagens a cerca das técnicas de separação.

A cristalização direta exige não só uma entrada elevada de energia mas também remoção eficiente de impureza ou desproteínização como uma etapa de pré-tratamento.

A separação por eletrólise resulta em produto de baixo rendimento devido à perda de ácido succínico no efluente. Além disso, a vida útil da membrana de eletrólise pode ser relativamente curta por causa do envenenamento de membrana por macromoléculas (proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos). Uma situação semelhante ocorre também em ultrafiltração e nanofiltração. O desempenho da alumina, sílica ou adsorção por zeólita precisa ser verificada usando meio de fermentação real em vez de soluções modelo. Devido à baixa seletividade e capacidade assorvente, o ácido

succínico normalmente não é concentrado mas diluído usando cromatografia. Além disso, o meio cromatográfico ou a matriz (alumina, sílica ou zeólita) tem que ser regenerado com frequência se a alimentação não for dessalinizada ou desproteïnizada. A extração reativa exige complicado pré-tratamento (remoção de proteínas e de biomassa bem como de sais) e pós-tratamento (extração de volta, hidrólise ou destilação reativa). Além disso, o agente de extração e o diluente são de alto custo, o que também é um obstáculo para a aplicação de extração reativa em grande escala (CHEG, *et al.*, 2012).

Portanto, evidencia-se a necessidade de maiores pesquisas para o desenvolvimento de um processo simplificado que permita a purificação do ácido succínico diretamente a partir do meio de fermentação. Para efetivo desenvolvimento, as técnicas de separação tradicionais devem ser melhoradas juntamente com a tecnologia de purificação. Por exemplo, com o uso de modificação genética para exclusão de genes responsáveis pela síntese de subprodutos a extração do ácido succínico será melhorada. Tal abordagem, se precisamente otimizada, pode resultar em um bioprocessamento altamente eficiente.

**Tabela 4: Vantagens e desvantagens em cada processo de *downstream*.**

<b>Processos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Maturidade da tecnologia/ Custo/ <i>Scale up</i></b>
<b>Cristalização direta</b>	Poucas operações unitárias	Baixo rendimento e pureza. Grande consumo de energia para evaporação e destilação. Dessalinização e desproteinização necessárias.	Tecnologia imatura para aplicação industrial.
<b>Precipitação</b>	A precipitação com $\text{Ca(OH)}_2$ ou $\text{CaO}$ pode ser um processo viável para produção comercial de bioácido succínico com poucas barreiras tecnológicas.	O volume de produtos químicos demandado é elevado.  Reagentes não podem ser reutilizados.  O sulfato de cálcio subproduto principal tem baixo valor agregado.	Tecnologia madura para aplicações comerciais.  Custo de operação significativo. Deve ser testada em escala piloto antes de aplicação comercial.
	O processo de precipitação com amônia produz baixas quantidades de subprodutos e o reagente usado é reciclável.	A reciclagem dos reagentes e o baixo pH resultam em alto consumo de energia e erosão no equipamentos.	Custo de equipamentos é significativo.  Fácil escalonamento.
<b>Separação por membrana</b>	A microfiltração, ultrafiltração, e nanofiltração combinadas podem gerar alto rendimento e pureza.	Envenenamento da membrana.	Tecnologia madura para aplicações comerciais.  Custo elevado dos equipamentos.

<b>Extração</b>	Alto rendimento e baixo consumo de energia	A extração reativa é complicada. É necessário remover proteínas e sais antes da reação. O agente de extração e diluente são caros, o que é um obstáculo para a extração reativa aplicada em larga escala.	O custo de equipamentos é significativo.  Difícil aumento de escala.
<b>Cromatografia</b>	Fácil aumento de escala	A matriz cromatográfica tem que ser regenerada com frequência.  A regeneração do adsorvente precisa de grande quantidade de ácido e álcali.	Pesquisas em estágio inicial.

Além disso, Considerando que o objeto principal é produzir ácido succínico biológico econômico e verde, estratégias de biorrefinaria podem ser eficientemente utilizadas para a produção de ácido succínico e outros produtos de elevado valor agregado, como o propanodiol e ácido succínico, acetato de isoamilo e ácido succínico ou polihidroxibutirato e ácido succínico (DITTRICH *et al.* 2009).

Este tipo de fermentação, onde há a formação de dois ou mais produtos de interesse comercial pode ser considerado um processo de produção biológico promissor, diminuindo o custo de produção por partilhar o custo de recuperação e o custo de operação.

## 5. Conclusão

O ácido succínico foi incluído na lista *Top Value Added Chemicals from Biomass based* pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos com base em seu destacado potencial para se tornar um importante bloco de construção, na produção tanto de commodities quanto de especialidades químicas.

Guiando-se por esta tendência, a otimização de um processo para a obtenção de ácido succínico vem sendo tópico constante de várias pesquisas nos últimos anos, como pode ser observado pela Tabela 2. Embora observe-se processos de desempenho de fato promissores, muitos problemas foram descobertos. Existe uma expressiva quantidade de microrganismos produtores de ácido succínico, conforme foi descrito anteriormente, com destaque para as espécies *A. succinogenes*, *A. succiniciproducens*, *M. succiniciproducens*, *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* e *Bacteroides fragilis*. As linhagens naturalmente ocorrentes, vêm apresentando uma série de “auxotrofias”, aumentando as exigências pelo substrato e, conseqüentemente encarecendo o processo. Além disso, a maioria dos rendimentos eficientes, foi alcançada mediante a utilização de um meio de cultivo complexo.

Para evitar o principal problema de auxotrofia, a *E.coli* foi escolhida como alternativa para alguns processos, devido a sua facilidade de crescimento em meio de composição mínima e alteração genética do metabolismo. Embora muitos processos tenham utilizado de forma recorrente esses métodos de mutação, nenhuma linhagem foi desenvolvida sem a necessidade de uma suplementação que compensasse a auxotrofia. Portanto, deveriam ser desenvolvidos modelos mais aprimorados para aumentar a taxa de produção. Cabe ressaltar a importância do uso de ferramentas computacionais para uma correta otimização, mediante simulações do processo, seguidas de uma coerente análise dos parâmetros do modelo e sua hierarquia de influência sobre a variável de resposta (BORGES, 2011).

Pode-se concluir também que, apesar das vantagens que os processos biotecnológicos apresentam, um dos principais problemas deste tipo de processo está relacionado à alta diluição do produto em solução aquosa, aumentando o custo do



processo de purificação e separação, tornando-o o fator economicamente limitante do processo.

Para aumentar a competitividade da produção biológica de ácido succínico, os trabalhos futuros devem ter como enfoques: aumento da concentração de ácido succínico e produtividade por meio da engenharia metabólica; introdução e otimização da rota de síntese de ácido succínico em espécies com alta tolerância a ácido succínico; superar o efeito da repressão por substrato e utilização de matérias-primas de baixo custo de base não-alimentar, por exemplo, resíduos agro-industriais lignocelulósicos.

Assim como para a produção de etanol, a transformação dos materiais lignocelulósicos para a produção de ácido succínico deve ser estudada sob diferentes estratégias de processamento. Devido a presença de diferentes açúcares, muitas vezes se faz necessário o multiprocessamento, ou seja, o emprego de enzimas simultaneamente a ação de microorganismos. Ou mesmo a utilização de diferentes microorganismos em etapas sucessivas, ou de microrganismos recombinantes de maneira a se aproveitar ao máximo dos açúcares (substratos) disponíveis (PEREIRA JR, 2010).

Ao se estudar engenharia metabólica combinada a tecnologia dos pré-tratamentos físicos e químicos, espera-se adotar a tecnologia da biorrefinaria. Biorrefinaria é um termo relativamente novo, que se refere ao uso de matérias-primas renováveis (biomassas) e de seus resíduos, de maneira mais integral e diversificada, para a produção, por rota química ou biotecnológica de uma variedade de valiosas substâncias e energia, com mínima geração de resíduos e emissões (PEREIRA JR, 2008).

A recuperação e a purificação do ácido succínico representam um desafio tecnológico e um obstáculo econômico para uma produção microbiana eficiente em larga escala. Todos os métodos utilizados atualmente apresentaram rendimento de produto e pureza insatisfatórios. Para maiores desenvolvimentos, técnicas de separação tradicionais deve ser melhoradas juntamente com outras tecnologias de *downstream*. Uma vez que a inibição por produto é relatada de forma recorrente nas fermentações para produção de ácido succínico, outra abordagem a ser mais estudada seria o aumento da produtividade do processo de fermentação combinada com a remoção do produto *in*

*situ*. Tal abordagem, se precisamente otimizada, pode resultar em um bioprocesso altamente eficiente.

O ácido succínico microbiano pode diminuir o uso de um recurso não-renovável e reduzir as emissões de gases de efeito estufa. Atualmente, a demanda por ácido succínico está em pleno crescimento, trazendo benefícios e uma força motriz para as pesquisas nesse campo. Acreditamos que através de extensa co-operação indústria-universidade no campo da pesquisa, por-se-á estabelecer um processo sustentável e economicamente viável para a produção bioácido succínico em um futuro próximo.

Concluindo este trabalho, transcreve-se citação de uma declaração do orientador da presente monografia.

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

## 6. Referências Bibliográficas

- ADSUL, M.G., SINGHVI, M.S., GAIKAIWARI, S.A., GOKHALE, D.V., 2011. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, v. 102, p. 4304–4312.
- AGARWAL, L., ISAR, J., MEGHWANSHI, G.K., SAXENA, R.K., 2007. Influence of environmental and nutritional factors on succinic acid production and enzymes of reverse tricarboxylic acid cycle from *Enterococcus flavescens*. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 40, p. 629–636.
- BORGES, E. R., 2011. Desenvolvimento de um processo biotecnológico para a produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*. Tese de doutorado, UFRJ.
- BORGES, E. R., PEREIRA JR, n., 2011. Succinic acid Production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. V 38, p. 1001-1011.
- CHENG, K., ZHAO, X., ZENG, J., ZHANG, J., 2012. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels, bioproducts and biorefining*. V 6, p. 302–318.
- CHENG, K., ZHAO, X., ZENG, J., WU, R., XU, Y., LIU, D., ZHANG, J., 2012. Downstream processing of biotechnological produced succinic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V- 95, p.841–850.
- CORDOBA, P. G., 2001. Modernos Conceitos do Tratamento de Caldo, *Jornal Cana*, Série II, Ano VIII, n. 91, pp. 37.
- CUKALOVIC, A., STEVENS, C.V., 2008. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuel Bioprod Bioref* 2, p. 505–529.
- DATTA, R., GLASSNER, D.A., JAIN, M.K., VICK, R.O.Y. JR., 1992. Fermentation and purification process for succinic acid. US Patent 5:168,055.

- PETRIDES, D., 2012. Bioprocess Design and Economics. Livro. C. 11, p.11-2.
- DITTRICH, C.R., BENNETT, G.N., SAN, K.Y., 2009. Metabolic Engineering of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* for the simultaneous anaerobic production of isoamyl acetate and succinic acid. *Biotechnol Prog.* V. 25, p.1304–1309.
- EFE, C., PIETERSE, M., VAN DER WIELEN, L.A.M., STRAATHOF, A.J.J., 2011. Separation of succinic acid from its salts on a high-silica zeolite bed. *Chemical Engineering Process.* V. 50, p. 1143 –1151.
- FAPESP, 2010. Análise da produção científica a partir de publicações em periódicos especializados. Capítulo 4. Disponível em: <http://www.fapesp.br/indicadores/2010/volume1/cap4.pdf>
- HATTI-KAUL, R., TORNVALL, U., GUSTAFSSON, L., BORJESSON, P., 2007. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals-a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.* v. 25, p.119–124.
- HEPBURN, A.J., DAUGULIS, A.J., 2012. The use of CO<sub>2</sub> for reversible pH shifting, and the removal of succinic acid in a polymer-based twophase partitioning bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* V. 87, p.42–50.
- HUH, Y.S., JUN, Y.S., HONG, Y.K., SONG, H., LEE, S.Y., HONG, W.H. (2006). Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Process Biochem.* V.41, p.1461–1465.
- INCI, I., BAYAZIT, S.S., ASCI, Y.S., 2011. Separation of succinic acid from aqueous solution by alumina adsorption. *Journal of Chemical Engineering Data.* v.56, p. 4449–4453.
- KANG, Z., GAO, C.J., WANG, Q., LIU, H.M., QI, Q.S., 2010. A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* 101:7675–7678.
- KWIATKOWSKI, J. R. *et al.* (2006). Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, v. 23, n. 3, p. 288-296.

KURZROCK, T., WEUSTER-BOTZ, D., 2010. Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnol Lett* 32:331–339.

LEE, P.C., LEE, S.Y., CHANG, H.N., 2008. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 29305 growing on galactose, galactose/glucose, and galactose/lactose. *Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 18, p.1792–1796.

LEE, P.C., LEE, S.Y., CHANG, H.N., 2001. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnology Bioengineering*, v 72, p. 41–48.

LEE, P.C., LEE, S.Y., HONG, S.H., CHANG, H.N., 2003. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 26, p. 63–67.

LEE, P.C., LEE, W.G., KWON, S., LEE, S.Y., CHANG, H.N., 1999. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: Effects of the H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and glucose concentration. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 24, p. 549–554.

LI, Q., YANG, M.H., WANG, D., LI, W.L., WU, Y., ZHANG, Y.J., 2010. Efficient conversion of crop stalk wastes into succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3292–3294.

LI, Q., YANG, M.H., WANG, D., LI, W.L., WU, Y., ZHANG, Y.J., 2010. One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization. *Separation and Purification Technology*. V. 72, p. 294–300.

LI, Q., WANG, D., HU, G.Y., XING, J.M., SU, Z.G., 2011. Integrated bioprocess for high-efficiency production of succinic acid in an expanded bed adsorption system. *Biochemical Engineering Journal*. V. 56, p.150–157.

LIN, S.K.C., DU, C.Y., BLAGA, A.C., CAMARUT, M., WEBB, C., STEVENS, C.V., SOETAERT, W., 2010. Novel resin-based vacuum distillation–crystallization method

for recovery of succinic acid crystals from fermentation broths. *Green Chem.* v. 12, p.666–671.

LINTOMEN, L., PINTO, R. T. P., BATISTA, E., MEIRELLES, A. J. A., MACIEL, M. R. W., 2001. Liquid-Liquid Equilibrium of the Water + Citric Acid + Short Chain Alcohols + Tricaprylin System at 298.15 K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v.46, p.546 - 550.

LIU, Y. P., ZHENG, P., SUN, Z.H., NI, Y., DONG, J.J., ZHU, L.L., 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, v 99, p. 1736–1742.

LIMEIRA, M. do S. C. O, 2007. (des)conhecimento da série “Iniciados” produzida pela UFPB e a disseminação da produção científica no CCSA. 2007, 55 f. Monografia (Curso de Graduação em Biblioteconomia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

LUQUE, R., LIN, C.S.K., DU, C., MACQUARRIE, D.J., KOUTINAS, A., WANG, R., WEBB, C., CLARK, J.H., 2009. Chemical transformations of succinic acid recovered from fermentation broths by a novel direct vacuum distillation–crystallisation method. *Green Chem.* v. 11, p. 193–200.

NATTRASS L., ADRIAN H., 2012. Succinic Acid. The UK’s national centre for biorenewable energy, fuels and materials. <http://www.nnfcc.co.uk/>.

NGHIEM, N.P., DAVISON, B.H., SUTTLE, B.E., RICHARDSON, G.R., 1997. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63, P.565–576.

MACY, J.M., LJUNGDAHL L.G., GOTTSCHALK G., 1978. Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*, v.134, p.84–91.

MCKINLAY, J.B., SHACHAR-HILL, Y., ZEIKUS, J.G., VIEILLE, C., 2007. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of C-13-labeled metabolic product isotopomers. *Metab Eng* 9:177–192.

MINH D., BESSON, M., PINEL, C., FUERTES, P., PETITJEAN, C., 2010. Aqueous-Phase hydrogenation of biomass-based succinic acid to 1, 4-butanediol over supported bimetallic catalysts. *Top Catal*, v.53,p. 1270–1273 .

OKINO S., NOBURYU R., SUDA M, JOJIMA T., INUI M., YUKAWA H., 2008. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* v 81, p.459–464.

ORJUELA, A., YANEZ, A.J., PEEREBOOM, L., LIRA, C.T., MILLER, D.J., 2011. A novel process for recovery of fermentation-derived succinic acid. *Separation and Purification Technology*. V. 83, p.31–37.

PARK, D.H., LAIVENIEKS, M., GUETTLER, M.V., JAIN, M.K., ZEIKUS, J.G., 1999. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Applied Environment Microbiology*. v 65, p. 2912–2917.

PONNAMPALAM, E., 1999. Purification of organic acids using anion exchange chromatography. WO Patent 9:944,707.

PEREIRA JR, NEI, 2010. *Química verde no Brasil: 2010-2030 - Ed. rev. e atual.* - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010. Capítulo 1.

RANUCCI, E., LIU, Y., LINDBLAD, M.S., ALBERTSSON, A.C., 2000. New biodegradable polymers from renewable sources. High molecular weight poly(ester carbonate)s from succinic acid and 1,3-propanediol. *Macromol Rapid Commun*. p 680–684.

SAMUELOV, N.S., DATTA R JAIN, M.K., ZEIKUS, J.G., 1999. Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinatebased animal feed additive. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2260–2263.

SAMUELOV, N.S., LAMED, R., LOWE, S., ZEIKUS, J.G., 1991. Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub> levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of

*Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Applied Environmental Microbiology, v.57, p. 3013–3019.

SANCHEZ, A.M., BENNETT, G.N., SAN, K.Y., 2006. Batch culture characterization and metabolic flux analysis of succinate-producing *Escherichia coli* strains. Metabolic Engineering, v 8, p 209–226.

SINGH, A., SOH, K.C., HATZIMANIKATIS, V., GILL, R.T., 2011. Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*. Metabolic Engineering, v 13, p 76–81.

SNYDER, C.H., 1995. The extraordinary chemistry of ordinary things. 2<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: JOHN WILEY & SONS. p. 242-245, 574-575.

SOLOMONS, T.W.G., 1996. *Química Orgânica 2*. 6<sup>a</sup> ed. Trad. H. Macedo. Rio de Janeiro, LTC. p. 91-96.

SONG, H., HUH, Y.S., LEE, S.Y., HONG, W.H., HONG, Y.K. (2007). Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* strain. Journal of Biotechnology. V. 132, p.445–452.

WAN, C.X., LI, Y.B., SHAHBAZI, A., XIU, S.N., 2008. Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. Applied Biochemistry and Biotechnology, v 145, p. 111–119.

WANG, D., LI, Q.A., MAO, Y., XING, J., SU, Z., 2010. High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in ptsG mutant *Escherichia coli*. Applied Microbiology Biotechnology v 87, p 2025–35.

WANG, J., ZHU, J.F., BENNETT, G.N., SAN, K.Y., 2011. Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains. Metabolic Engineering, v. 13, p. 328–335.



WU, H., JIANG, M., WEI, P., LEI, D., YAO, Z., ZUO, P., 2011. Nanofiltration method for separation of succinic acid from its fermented broth. Chinese Patent CN200910025531.5

VAN DER WERF, M.J., GUETTLER, M.V., JAIN, M.K., ZEIKUS, J.G., 1997. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch Microbiol* 167:332–342.

VASUDEVAN D, Reduction of maleic-acid at a Ti ceramic TiO<sub>2</sub> cathode, 1995. *Journal of Applied Electrochem*, v. 25, p.176–178.

YAO, Z., WU, H., LIU, H., LI, S., JIANG, M., 2008. Method for separation succinic acid from anaerobic fermentation broth. Chinese Patent CN200610086003.7

YEDUR, S., BERGLUNG, K.S., DUNUWILA, D.D., 2001. Succinic acid production and purification. US Patent 6:265,190.

YUZBASHEV, T.V., YUZBASHEVA, E.Y., SOBOLEVSKAYA, T.I., 2010. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Bioengineering*, v. 107, p.673–682.

ZHANG, S.G., ZHANG, W., 2004. *Manual of Fine Chemicals and Intermediates*, 1<sup>a</sup> ed. Chemical Industry Press, Beijing, China.

ZEIKUS, G.J., JAIN, M.K., ELANKOVAN, P., 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology Biotechnology*, v 51, p 545–552.

ZOU, W., ZHU, L., LI, H., TANG, Y., 2011. Significance of CO<sub>2</sub> donor on the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618. *Microbial Cell Factories*.