



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112021022088-7 B1



(22) Data do Depósito: 08/05/2020

(45) Data de Concessão: 02/08/2022

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM UM REATOR EM BATELADA DE SEQUENCIAMENTO E APARELHO PARA REALIZAR O DITO MÉTODO

(51) Int.Cl.: C12P 7/56; C12M 1/34.

(30) Prioridade Unionista: 10/05/2019 NL 2023113.

(73) Titular(es): NATURE'S PRINCIPLES B.V..

(72) Inventor(es): JULIUS LAURENS ROMBOUTS; MARINUS CORNELIUS MARIA VAN LOOSDRECHT; ROBBERT KLEEREBEZEM; DAVID GREGORY WEISSBRODT; GERBEN STOUTEN; MAXIMILIENNE TOETIE ALLAART.

(86) Pedido PCT: PCT EP2020062951 de 08/05/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/229370 de 19/11/2020

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/11/2021

(57) Resumo: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM UM REATOR EM BATELADA DE SEQUENCIAMENTO E APARELHO PARA REALIZAR O DITO MÉTODO. A presente invenção está no campo de um método de produção de ácido lático em alto rendimento em um reator em batelada de sequenciamento. Nesse caso, a glicose pode ser usada como matéria-prima para bactérias, que fermentam a glicose em ácido lático. O reator é operado sob condições não axênicas pelo menos parcialmente definidas e em um modo cíclico.

RELATÓRIO DESCRITIVO

“MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM UM REATOR EM BATELADA DE SEQUENCIAMENTO E APARELHO PARA REALIZAR O DITO MÉTODO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção está no campo de um método de produção de ácido láctico em alto rendimento em um reator em batelada de sequenciamento. Nesse caso, a glicose, ou outros açúcares, pode ser usada como matéria-prima para bactérias, que fermentam a glicose em ácido láctico. O reator é pelo menos parcialmente operado sob condições definidas e em um modo cíclico.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$) é um composto químico orgânico simples que pode ser usado em muitas aplicações. É uma molécula quiral e ocorre como ácido L- ou D-láctico. É observado que o ácido láctico é altamente solúvel.

[003] A fermentação do ácido láctico é realizada em escala industrial por bactérias lácticas (*espécies Lactobacillus*), que convertem carboidratos simples como glicose, sacarose ou galactose em ácido láctico, ou por síntese química. Bactérias produtoras de ácido láctico podem produzir dois moles de lactato de um mol de glicose, ou um mol de lactato de um mol de glicose, bem como dióxido de carbono e ácido acético/etanol, esse último não é o preferido.

[004] Normalmente, a fermentação do ácido láctico é realizada sob condições bastante restritas. Em primeiro lugar, uma cultura relativamente pura é usada, como *Lactobacillus delbrueckii*. A solução aquosa em que a fermentação é realizada é normalmente parcialmente neutralizada, como com cal. Normalmente, um pH de cerca de 4,5-5,0 é usado. A temperatura de fermentação é $> 50\text{ }^\circ\text{C}$, pois a produção é frequentemente insignificante até $45\text{ }^\circ\text{C}$. Para a fermentação, normalmente um fermentador e um reator de sementes são usados. Tendo em vista a esterilização de cultura pura da matéria-prima e do equipamento usado, por exemplo, o fermentador, é necessário. O rendimento de ácido láctico é bastante alto, como $> 0,9$ ácido láctico/g de glicose (rendimento em carbono de 90%), a produtividade é boa (por exemplo, >5

g/l*h) e a titulação relativamente alta (>150 g/l ácido láctico).

[005] Esses métodos da técnica anterior são, no entanto, caros. Uma cultura pura pode atribuir cerca de 15% dos custos de produção. O inóculo custa cerca de 3% e o consumo de energia cerca de 4%. O fermentador é relativamente grande (alguns milhares de metros cúbicos), o reator de sementes também possui um volume significativo (algumas centenas de metros cúbicos), sendo necessário ser feito de um material relativamente caro, como o aço inoxidável, tornando os investimentos relativamente altos. Como mencionado, a esterilização adequada é necessária, resultando em um tempo de inatividade do fermentador de cerca de 20% e alto consumo de energia, normalmente resultando na produção de CO₂. Em casos de azar, pode ocorrer uma infecção por fago, resultando na perda de um lote de matéria-prima e na necessidade de obter uma cepa resistente a fago, o que pode atrasar o processo de produção. Frequentemente, os reatores e suas partes precisam ser limpos, o que também contribui para os custos.

[006] Alguns documentos relatam a produção de ácido láctico. Akao et al. Em *Water Research*, Elsevier, Amsterdam, Vol. 41, N^o 8, 23 de março de 2007, p. 1774-1780 descreve um método para a produção de L-lactato por fermentação semicontínua de lixo sem condições estéreis. Tang Jialing et al., em *Waste Management*, Elsevier New York Vol. 52, 31 de março de 2016, p. 278-285 recita um método para a produção de ácido láctico em uma fermentação em lote de sequência de uma matéria-prima de lixo. A técnica anterior pode ser encontrada em Liang et al., *Waste management*, Vol. 45, 1 de novembro de 2015, p. 51-56, Zhang et al., em *Bioresource Technology*, Elsevier Amsterdam, Vol. 99, No. 4, 1 de março de 2008, p. 855-862 e documento número US 2011/210001 A1.

[007] O ácido láctico é um precursor do ácido polilático (PLA), que pode ser atático ou sindiotático, e cujos polímeros são poliésteres biodegradáveis. O ácido láctico também pode ser usado como conservante de alimentos, em cosméticos e como componente farmacêutico. O tamanho do mercado de ácido láctico é enorme (> 5 M €/ano) e crescente. Portanto, existe a necessidade de um método eficiente de

produção de ácido láctico.

[008] A presente invenção, portanto, se refere a um método melhorado de produção de ácido láctico por fermentação, que resolve um ou mais dos problemas e desvantagens da técnica anterior acima, fornecendo resultados confiáveis, sem comprometer a funcionalidade e as vantagens.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] É um objetivo da invenção superar uma ou mais limitações dos métodos e dispositivos da técnica anterior e, pelo menos, fornecer uma alternativa aos mesmos. Em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um método de produção de ácido láctico em um reator de lote de sequenciamento que compreende passagem por ciclo adaptativa (consulte, por exemplo, a Figura 1b) pelo menos uma vez entre (i) uma fase de reação, (ii) uma fase de efluente e (iii) uma fase de alimentação, preferencialmente 2-5000 vezes o ciclo adaptativo, mais preferencialmente 4-1000, como 5-1000 vezes. Cada fase é considerada relacionada a um período de tempo. Ao acoplar a dosagem de base ao consumo de substrato e ao monitorar de perto um consumo de base, um ciclo adaptativo pode ser encerrado quase imediatamente quando concluído, o consumo de substrato (por exemplo, glicose) é o mais rápido possível, resultando em altas taxas volumétricas médias no tempo. Normalmente, são possíveis 1-20 ciclos adaptativos por dia, como 2-10 ciclos adaptativos. A operação do reator pode ser continuada por longos períodos de tempo. A manutenção pode ser realizada de 1 a 4 vezes por ano ou menos. O presente método usa uma cultura mista com capacidade para fermentar o sacarídeo em ácido láctico, que é adicionado, por exemplo, ao reator. Comparado com os métodos da técnica anterior, conforme descrito acima, o presente método é considerado >20% mais barato em termos de custos de produção unitários de ácido láctico. Algumas razões para isso são que nenhuma esterilização é necessária, nenhuma cultura pura, como uma cultura de *Lactobacillus delbrueckii*, é necessária, nenhum reator de inóculo e reator de semente são necessários, o tamanho do presente reator pode ser um fator menor e em que ainda tem uma taxa de produção semelhante, o presente método fornece uma

biomassa inicial elevada que permite uma alta produtividade, como $> 6 \text{ g/l}\cdot\text{h}$, a possibilidade de reutilizar a biomassa como fonte de proteína e vitamina, reduzindo assim o consumo de peptídeo e fonte de vitamina, a produção (indireta) de CO_2 é reduzido significativamente, o tempo de inatividade programado é baixo, pois nenhuma esterilização é necessária, e o tempo de inatividade não programado, como devido à infecção por fago, é muito improvável devido à cultura mista que compreende várias cepas e espécies. A biomassa pode ser reciclada, especialmente porque ainda pode estar intacta, contribuindo assim para o aumento da produtividade e do rendimento. Além disso, o rendimento é maior. O lado negativo é que rendimentos um pouco mais baixos (70% versus 90%) são obtidos, o que pode ser devido a mais biomassa e possível subproduto e, em geral, não há controle direto sobre a razão D/L de ácido láctico; no entanto, em condições específicas, o último pode ser resolvido. Surpreendentemente, a um pH de cerca de 7, nenhum ácido D-láctico detectável ($<0,1\%$) é formado e $> 99,9\%$ de ácido L-láctico.

[010] Diferenças importantes entre a presente invenção e a técnica anterior são que na técnica anterior o impacto da presença ou ausência de proteínas não foi especificamente abordado como aumento do rendimento e da produtividade do ácido láctico. Apenas a quantidade de carboidratos e proteínas são quantificados. Além disso, a presença ou ausência de vitaminas B na matéria-prima não é mencionada. E o mais importante, nenhuma das referências demonstra um processo de “passar por ciclo adaptativo”. Essas são consideradas as partes mais exclusivas da invenção, com os outros fatores que aumentam a eficácia da invenção.

[011] O presente método compreende uma fase de reação em que (ia1) mantém o pH a um nível predeterminado entre 5,6 e 8,5, de preferência, entre 5,9 e 8,0, mais preferencialmente entre 6,4 e 7,5, como 7,0, que é comparado aos métodos da técnica anterior relativamente elevados, (ia2) mantém a temperatura a 30-80 °C, preferencialmente a 32-72 °C, mais preferencialmente a 35-63 °C, ainda mais preferencialmente a 37-60 °C, como 38-50 °C, por exemplo, 40-45 °C, cujo intervalo preferido é comparado aos métodos da técnica anterior relativamente baixo, (ia3)

agitação da fase de reação, como a 1-600 rpm, (ib) adição de uma base quando o pH está abaixo do nível predeterminado até o pH estar igual ou acima do nível predeterminado. O pH pode ser medido diretamente com um sensor de pH simples.

(ic1) Permitir que a fermentação continue durante um tempo de fermentação até que a fermentação atinja uma fase estacionária, fase essa que pode ser determinada quando a fermentação para substancialmente e, como consequência, o pH permanece mais ou menos constante, como em que o pH é substancialmente constante durante pelo menos 10 minutos, e nenhuma base adicional precisa ser adicionada. Então, por exemplo, monitorando-se uma quantidade de base adicionada ao longo do tempo, a fase estacionária pode ser determinada adequadamente, embora com um pequeno atraso no tempo. (ic2) Quando a fermentação atingiu a fase estacionária, removendo parte do efluente para a fase efluente, e (ic3) adicionando alimentação à fase de reação, com isso reabastecendo em grande parte ou totalmente a fase de reação. A alimentação pode ser adicionada subsequentemente para remover o efluente da fase de reação, durante a reação, antes da reação e suas combinações. Na fase de efluente (iia), pelo menos parte do ácido láctico é removida e (iib) de preferência um restante da fase de efluente é fornecido para a fase de alimentação, de preferência em que 30-70% do caldo é fornecido para a fase de alimentação, como 40-60% de caldo. O ácido láctico pode ser removido através de uma saída em direção a um recipiente ou semelhante, pode ser precipitado no reator, por exemplo, pela adição de Ca^{2+} , pode ser separado através de uma membrana e combinações dos mesmos. Assim, uma parte do caldo pode ser reciclada. Em alternativa, ou adicionalmente, o ácido láctico pode ser removido da fase de reação, como por separação localmente. Na fase de alimentação (iia), uma mistura de alimentação aquosa é fornecida compreendendo > 10 g/l de um composto que compreende sacarídeo, em que o composto de sacarídeo é selecionado a partir de glicose, sacarose, frutose, galactose, lactose, dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, como com 3-100 sacarídeos, amido, inulina, de preferência em que o composto que compreende o sacarídeo é um único composto, como apenas glicose,

e> 1 g de peptídeo / 100 g de composto de sacarídeo, ou uma combinação dos mesmos, em que a concentração de peptídeo na fase de alimentação está entre 1-30 g de peptídeo/100 g de sacarídeo. Foi constatado que, além de um sacarídeo como composto alimentar básico, também são necessários peptídeos para obter rendimento suficiente. Sem a quantidade de peptídeo mencionada, o rendimento cai para cerca de 10%, muito inferior aos 70% normalmente obtidos. Ao iniciar o pelo menos um ciclo adaptativo, é adicionada uma cultura inicial mista, no início da fase de reação, que é capaz de fermentar o sacarídeo em ácido láctico, como adicionado ao reator. Um tempo de retenção hidráulica de biomassa é controlado entre 4h-144h, como entre 1-8 dias. Observe que o tempo de retenção de sólidos e o tempo de retenção hidráulica podem ser substancialmente os mesmos, especialmente quando a mistura contínua é aplicada durante a troca de volume, como durante a remoção de efluentes. O HRT é considerado dependente do tempo de ciclagem, que é controlado pela ciclagem adaptativa.

[012] Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a um aparelho para realizar um método de acordo com a invenção, que pode ser um aparelho relativamente barato, como um aparelho de plástico ou concreto, que compreende um recipiente de alimentação, sendo que o recipiente de alimentação tem um volume de 1-50 m³, em que o recipiente de alimentação está em contato fluídico com um reator através de uma válvula de alimentação, em que o reator tem um sensor de pH em contato fluídico com a solução aquosa do reator, um reservatório que compreende uma base e uma válvula de reservatório e, opcionalmente, uma bomba, sendo que o reator tem um volume de 10-100 m³, em que o reator está em contato fluídico com um recipiente de efluente através de uma válvula de efluente, sendo que o recipiente de efluente tem um volume de 1-50 m³ e em que o recipiente de efluente está em contato fluídico com o recipiente de alimentação, cada recipiente e reator têm um misturador para girar uma fase aquosa com 1-600 rpm, o recipiente de efluente tem uma saída para remover ácido láctico e o recipiente de alimentação tem uma entrada para reabastecer a alimentação e um controlador adaptado (a) para abrir a válvula do

reservatório quando o pH cai abaixo de um nível predeterminado e para fechar a referida válvula do reservatório quando o pH atingiu o dito nível predeterminado novamente, (b) para abrir a válvula de alimentação quando a fermentação atinge uma fase estacionária e para adicionar alimentação, (c) para abrir a válvula de alimentação quando o efluente foi parcialmente removido e adicionar alimentação para reabastecer o reator e (d) para abrir a válvula de efluente quando o efluente é removido, como quando o líquido no reator atingiu um volume predeterminado.

[013] A presente invenção fornece uma solução para um ou mais dos problemas acima mencionados e supera as desvantagens da técnica anterior.

[014] As vantagens da presente descrição são detalhadas ao longo da descrição.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[015] Em uma modalidade exemplar do presente método, a biomassa pode ser adaptada passada por ciclo pelo menos uma vez entre a fase de reação, a fase de efluente e a fase de alimentação. Foi constatado que a biomassa não apenas contribui para a fermentação do sacarídeo em ácido láctico, mas também fornece peptídeos, melhorando assim o rendimento e a produtividade.

[016] Em uma modalidade exemplar do presente método, a fase de alimentação pode compreender > 80 g/l de composto de sacarídeo, como 100-200 g/l.

[017] Em uma modalidade exemplar do presente método, a concentração de peptídeo na fase de alimentação está entre 1-40 g de peptídeo/100 g de sacarídeo, de preferência entre 2-30 g/100 g, mais preferencialmente entre 5-15 g/100 g.

[018] Em uma modalidade exemplar do presente método, o peptídeo pode ser selecionado a partir de mono-peptídeos, di-peptídeos, tri-peptídeos, tetra-peptídeos ou é fornecido como biomassa microbiana e combinações dos mesmos. Em um exemplo de biomassa, também podem ser usados peptídeos em extrato de levedura, soro de leite ou subproduto de origem biológica. E, além disso, a biomassa no presente sistema pode ser reciclada, fornecendo peptídeos, bem como vitaminas ou precursores dos mesmos.

[019] Em uma modalidade exemplar do presente método, um tamanho de reator

pode ser 50-1000 m³, como 100-300 m³. Tal é muito menor do que os reatores da técnica anterior, com isso reduzindo significativamente o consumo de energia no processo de produção, como matriz para agitação (agitação) da fase de reação.

[020] Em uma modalidade exemplar do presente método, o reator pode ser um reator em batelada de sequenciamento ou um reator em batelada de fornecimento de sequenciamento. O presente reator pode se referir a um reator que compreende pelo menos uma de uma zona de um aparelho, uma fase de operação de um aparelho e um sub-reator. O sequenciamento em combinação com o ciclo adaptativo fornece uma inicialização rápida, alto rendimento e boa adaptabilidade do sistema a características variáveis potenciais.

[021] Em uma modalidade exemplar do presente método, nenhuma esterilização precisa ser realizada.

[022] Em uma modalidade exemplar do presente método, nenhuma inoculação precisa ser realizada.

[023] Em uma modalidade exemplar do presente método, nenhuma levedura viva está presente no estoque da fase de alimentação.

[024] O acima está relacionado a uma redução significativa nos custos de operação, modo de operação simplificado, tempo de inatividade reduzido e risco reduzido de infecções.

[025] Em uma modalidade exemplar do presente método, a fase de alimentação pode compreender uma vitamina B e/ou seu precursor metabólico, de preferência 10⁻²-10 mg de vitamina B/g de sacarídeo e/ou precursor, de preferência 2*10⁻²-5 mg/g vitamina B e/ou precursor, como 0,05-1 mg/g. Foi constatado que essas vitaminas e precursores aumentam significativamente o rendimento.

[026] Em uma modalidade exemplar do presente método, a vitamina B pode ser selecionada a partir de vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (niacina, nicotinamida, ribosídeo de nicotinamida), vitamina B₅ (ácido pantotênico), vitamina B₆ (piridoxina), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₁₂ (cobalamina), um sal dos mesmos, como um sal de fosfato e combinações dos mesmos.

[027] Em uma modalidade exemplar do presente método, o precursor pode ser selecionado a partir de precursores metabólicos para a coenzima no catabolismo do açúcar, cofator FAD, cofator FMN, coenzima NAD, coenzima NADP, coenzima A, uma coenzima metabólica, um metabolismo de ácido graxo coenzima, uma coenzima de metabolismo de aminoácidos e combinações das mesmas.

[028] Em uma modalidade exemplar do presente método, uma titulação de cultura de ácido láctico de > 40 g/l pode ser mantido, tipicamente > 50 g/l, como > 100 g/l, ou seja, titulações elevadas podem ser obtidas.

[029] Em uma modalidade exemplar do presente método, uma concentração de magnésio (cátion) na fase de alimentação pode ser 0,1-5 g/l, como 0,2-2 g/l.

[030] Em uma modalidade exemplar do presente método, uma concentração de cálcio (cátion) na fase de alimentação pode ser > 1,5 mg Ca/g de sacarídeo. Assim, para 10-200 g de sacarídeo/l, mais de 1,5-300 mg Ca/l podem ser fornecidos.

[031] O magnésio e o cálcio, normalmente fornecidos como íons Mg^{2+} e íons Ca^{2+} , contribuem para a fermentação.

[032] Em uma modalidade exemplar do presente método, a cultura mista pode ser enriquecida, como aumentando-se uma quantidade de composto de sacarídeo, por exemplo, para > 100 g/l, como > 200 g/l.

[033] Em uma modalidade exemplar do presente método, um tempo de retenção de biomassa pode ser controlado, como entre 1-8 dias.

[034] Em uma modalidade exemplar do presente método, a fase de reação compreende > 10% de Streptococcus, como > 50% de Streptococcus, que pode ser determinado por um método semiquantitativo como hibridização fluorescente localmente, ou com qualquer outro método, como com PCR.

[035] Em uma modalidade exemplar do presente método, um tempo de retenção hidráulica (HRT) pode ser de 1-8 dias, de preferência entre 18-96 horas, como 24-48 horas.

[036] Em uma modalidade exemplar do presente método, uma base pode ser selecionada a partir de hidróxidos, óxidos, amônia e combinações dos mesmos, de

preferência que compreende Ca^{2+} , Na^+ ou Mg^{2+} e combinações dos mesmos.

[037] Em uma modalidade exemplar do presente método, um pH pode ser mantido em 7,0. Em uma modalidade exemplar do presente método, um pH pode ser mantido em 7,0, Em uma modalidade exemplar do presente método, um pH pode ser mantido a $7,0 \pm 0,5$, uma temperatura a 30-55 C, uma quantidade de peptídeo em $> 2\text{g}/100\text{g}$ de sacarídeo, uma vitamina B a $> 0,1 \text{ g/l}$, e em que $> 98\%$ de ácido L-láctico é produzido, como $> 99,9\%$ de ácido L-láctico (em um mol de lactato/mol de sacarídeo que compreende uma base de composto). Isto é bastante surpreendente que virtualmente nenhum ácido D-láctico seja produzido, e substancialmente apenas ácido L-láctico. 0,5, uma temperatura de 30-55 °C, uma quantidade de peptídeo em $> 2\text{g}/100\text{g}$ de sacarídeo, uma vitamina B em $> 0,1 \text{ g/l}$, e em que $> 98\%$ de ácido L-láctico é produzido, como $> 99,9\%$ de ácido L-láctico (em um mol de lactato/mol de sacarídeo que compreende uma base de composto). Isto é bastante surpreendente que virtualmente nenhum ácido D-láctico seja produzido, e substancialmente apenas ácido L-láctico.

[038] A invenção será posteriormente elucidada através dos seguintes exemplos que são exemplificativos e explicativos da natureza e não se destinam a ser considerados limitantes da invenção. Para o especialista na técnica pode ser claro que muitas variantes, sendo óbvias ou não, podem ser concebíveis caindo dentro do escopo de proteção, definido pelas presentes reivindicações.

SUMÁRIO DAS FIGURAS

[039] As Figuras 1a-b, 2, e 3a-b e 4 mostram alguns detalhes da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[040] Na Figura 1a, uma representação esquemática do presente ciclo adaptativo é mostrada. Uma fase de alimentação é dotada de um sacarídeo e, tipicamente, misturado. A alimentação é fornecida, em um modo cíclico adaptativo, a uma fase de reação, em que os microrganismos produzem ácido láctico a partir do sacarídeo. Na fase de reação, o pH é medido. Após a diminuição do pH, uma fonte de base é ativada

e a base é adicionada até que o pH atinja um nível predeterminado. Em seguida, a adição de base é interrompida, por enquanto. O efluente da fase de reação é transferido para uma fase de efluente e o ácido láctico é removido. Um restante da fase de efluente é realimentado para a fase de alimentação.

[041] Inicialmente, a base é adicionada à fase de reação, para compensar o pH do ácido láctico que é formado. A quantidade de base diminui com o tempo, até que um platô seja atingido. Em seguida, a adição de base é interrompida, uma vez que não se forma mais ácido láctico. É mostrado o volume do reator em função do tempo/fase de operação. Fases em um único ciclo adaptativo e perfis de dosagem de base teóricos associados do reator de lote de sequenciamento usados para realizar passagem por ciclo adaptativa de base adaptativa. A duração do ciclo adaptativo foi controlada pela imposição de um tempo constante base máximo, após o qual um novo ciclo adaptativo foi iniciado, a partir da fase efluente.

[042] A Figura 2: Resultado de uma imagem FISH usando a sonda str (cinza claro), específica para o gênero estreptococo (Trebesius et al. 2000) em comparação com a mistura de sonda EUB338 (cinza escuro) (Amann et al. 1990).

[043] As Figuras 3a-b mostram imagens microscópicas de culturas bacterianas em pH = 5 (esquerda) e pH = 7 (direita), mostrando claramente que diferentes bactérias estão presentes em pH mais alto.

[044] A Figura 4: Desenvolvimento da abundância de leitura da região V3-V4 do gene 16S rRNA no tempo em nível de gênero. Várias espécies são encontradas, que se desenvolvem em quantidade ao longo do tempo. *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, e *Clostridium* são encontrados em quantidades relativamente altas.

EXEMPLOS

MATERIAIS E MÉTODOS

OPERAÇÃO DE REATOR

[045] O enriquecimento foi realizado em um biorreator de 3 l com um volume de trabalho de 2 l. As condições anaeróbias foram mantidas pulverizando continuamente

o reator com N_2 a uma taxa de 216 ml min^{-1} (@ $T = 273\text{K}$, $P = 10^5 \text{ kPa}$). A cultura foi retirada do reator para remoção do biofilme das paredes e cabeça do reator três vezes por semana. O reator foi agitado continuamente a uma velocidade de 300 rpm usando agitadores mecânicos. A temperatura do reator foi mantida a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por recirculação de água aquecida a $31 \text{ }^\circ\text{C}$ (termostato E300, Lauda, Alemanha) na parede externa do reator. Para evitar a evaporação do caldo de cultura, o gás de escape foi resfriado usando um criostato ajustado para $5 \text{ }^\circ\text{C}$. O pH do reator foi mantido em $5,0 \pm 0,2$ usando soluções de NaOH de 8 mol l^{-1} e HCl de 1 mol l^{-1} (ADI 1030 Bio controller, Applikon, Holanda). Para evitar a formação de espuma excessiva, o agente antiespuma (3% v:v antiespuma C, Sigma Aldrich, Alemanha) foi adicionado em quantidades iguais e em velocidade igual ao NaOH durante fermentações de glicose de 10 g l^{-1} .

MEIO DE ENRIQUECIMENTO

[046] O enriquecimento em 10 g l^{-1} de glicose foi realizado usando um meio ao qual NH_4Cl , KH_2PO_4 e $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ foram adicionados para obter uma relação C:N:P:Fe molar de 100:5:1:0,33 e 1,5 g de extrato de levedura foi adicionado por 10 g de glicose. As soluções de glicose e extrato de levedura foram autoclavadas separadamente a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos e então combinadas. Os sais foram fornecidos ao reator a partir de um segundo vaso, que foi autoclavado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$. As concentrações de magnésio foram ajustadas para aumentar as concentrações de glicose. Os elementos-traços foram fornecidos em quantidades suficientes.

FASES SBR E ARRANQUE

[047] O reator foi operado no modo SBR. Em uma fase de inicialização para o desenvolvimento da cultura, o reator foi operado em modo descontínuo até que a glicose fosse totalmente consumida. Para inoculação do enriquecimento, foram usados 10 ml (0,5% v/v) de solo suspenso e peneirado ($150 \text{ } \mu\text{m}$ filtrado) do jardim botânico de TU Delft (pH 7,4) e 10 ml de lodo do digestor anaeróbico (Harnaschpolder, Holanda). Após a fase de inicialização, o modo SBR com uma relação de troca de 50% foi inserido. Distinguem-se três fases SBR diferentes: a fase de efluente (5

minutos), a fase de alimentação (4 minutos) e a fase de reação. A duração da fase de reação era dependente da velocidade das conversões microbianas no reator: o ciclo adaptativo da base adaptativa foi usado para controlar o tempo do ciclo adaptativo (Figura 1). O tempo constante de base foi mantido inicialmente em 90 minutos para evitar a lavagem da biomassa, uma vez que uma fase inicial de latência foi observada nos ciclos adaptativos no início do enriquecimento. Ao longo do enriquecimento, o tempo constante de base foi diminuindo gradualmente para 20 minutos.

LOTE COM 100 G l⁻¹ DE GLICOSE A PH 5

[048] Anaerobicidade, temperatura, pH, agitação e evaporação do caldo foram controlados conforme descrito para os reatores em batelada de sequenciamento. Após 2,5 dias de operação, o reator foi enriquecido com 0,25 vezes a quantidade inicial de elementos-traços.

[049] Amostras para monitorar o crescimento da biomassa (OD₆₆₀), o consumo de glicose e a formação do produto foram coletadas a cada 30 minutos durante as primeiras 2,5 horas de cultivo. Depois disso, as amostras foram coletadas a cada hora até $t = 8$ h e finalmente 3 amostras por dia foram coletadas. A concentração final de biomassa foi calculada medindo os sólidos suspensos voláteis (VSS) no final da fermentação.

OPERAÇÃO SBR EM PH 7

[050] O enriquecimento em pH 7 foi realizado conforme descrito para pH 5, mas o pH foi controlado a $7,2 \pm 0,2$ com NaOH 8 mol l⁻¹. O reator foi inoculado com 5 ml de solo suspenso e peneirado e 5 ml de lodo do digestor anaeróbico. O ciclo adaptativo de base adaptativa com um tempo constante de base mínimo de 10 minutos foi usado para as primeiras duas semanas de enriquecimento, após o que um comprimento de ciclo adaptativo fixo de 90 minutos foi definido. Inicialmente, o caldo de cultura foi agitado a 300 rpm. No entanto, após 145 SRTs, a velocidade de agitação foi aumentada para 600 rpm para melhorar a transferência de massa de dióxido de carbono para a fase gasosa.

LOTE COM 100 G l⁻¹ DE GLICOSE A PH 7

[051] O reator em lote foi operado conforme descrito para o processo em lote em pH 5. O reator foi inoculado com peletes celulares de aproximadamente 1 l da cultura obtida ao final do enriquecimento em pH 7. As amostras foram coletadas a cada 30 minutos durante as primeiras 3,5 horas e a cada hora até que a glicose estivesse quase esgotada (<16 mM de glicose residual). Antiespuma foi adicionado manualmente quando ocorreu a formação de espuma. A cultura foi armazenada na geladeira durante a noite antes de coletar o sedimento para determinação de VSS.

MÉTODOS ANALÍTICOS

[052] As produtividades de gás (H₂ e CO₂) e dosagens de ácido/base para controle de pH foram monitoradas on-line por meio do software MFCS (Sartorius, Alemanha) e Rosemount Analytical NGA 2000 (Emerson, EUA). As concentrações de biomassa foram monitoradas medindo a densidade óptica (OD₆₆₀) e a quantidade de VSS no caldo, conforme descrito anteriormente, usando 150 ml de efluente (APHA/AWWA/WEF 1999), calculado assumindo um peso molecular de biomassa de 24,6 g mol⁻¹. Tanto OD quanto VSS foram sempre determinados em duplicado. As concentrações de glicose, etanol e VFA foram determinadas usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando uma coluna Aminex HPX-87H (BioRad, EUA) a 59 °C acoplada a um índice de refração e detector de ultravioleta (Waters, EUA). 1,5 mmol l⁻¹ de ácido fosfórico foi usado como eluente. A biomassa foi removida das amostras do reator por centrifugação e filtração usando um filtro de membrana de 0,22 µm (Millipore, Millex-GV, Irlanda).

ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIAL

[053] O DNA foi extraído de peletes celulares de diferentes pontos de tempo no enriquecimento usando o kit de extração microbiana DNAeasy (Qiagen Inc., Alemanha) seguindo as instruções do fabricante e enviado para Novogene (Hong Kong, China) para sequenciamento de amplicon 16S rRNA da região V3-V4 conforme descrito por Rombouts et al., (2019).

[054] A hibridização fluorescente localmente (FISH) foi usada para analisar a comunidade microbiana com microscopia de epifluorescência (Axioplan 2 imaging,

Zeiss, Alemanha). A fixação e a hibridização durante a noite foram realizadas conforme descrito por Johnson et al. (2009) usando as sondas listadas na tabela 1. Uma coloração DAPI adicional direcionada a todas as células microbianas foi usada incubando as lâminas por 15 minutos com 10 µl de solução DAPI 10 mg ml⁻¹ após a lavagem e secagem.

Micro-organismo	Sonda	Formamid a (%)	Sequência (5' 3')
Eubacteria	<u>EUB338</u>	5-30	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
Lactobacilos	<u>Lacto772</u>	25	YCACCGCTACACATGRAGT TCCAAT
Lactococcus	<u>Lactococcus4</u>	5	CTGTATCCCGTGTCGGAA
Megasphaera	Mega-X	25	G
Streptococcus	Str	30	GACTCTGTTTTTGGGGTTT
Enterobacteriaceae	<u>Ent183</u>	20	CAC TCT CCC CTT CTG CAC CTC TTT GGT CTT GCG ACG

Resultados

[055] Um espectro de produto foi monitorado no tempo de ambos os enriquecimentos. O lactato foi o principal produto da fermentação em ambas as condições. Aos 30 SRTs, a quantidade de elementos-traços foi duplicada, levando principalmente à produção de lactato. Em pH 7, foi alcançada uma produtividade 5,4 vezes maior. O que é muito surpreendente é que apenas o ácido L-láctico é produzido

em pH 7, enquanto uma mistura quase racêmica é produzida em pH 5.

		pH 5	pH 7
10 g l ⁻¹ de	<i>Rendimento máximo de lactato obtido</i>	0,76	0,69
glicose	(g _p g _s ⁻¹)	1,16	6,24
	<i>Produtividade máxima obtida (g l⁻¹ h⁻¹)</i>		
		53:47	<u>1:99</u>
	<i>Razão D:L - lactato</i>		
		0,14	0,20
	<i>Y_{x/s} (Cmol_x Cmol_s⁻¹)</i>		
		0,74	2,25
	<i>q_s (Cmol_s Cmol_x⁻¹ h⁻¹)</i>		
		0,11	0,46
	<i>μ_{médio} (h⁻¹)</i>		
		0,60	0,59
	<i>Y_{LA/s} (g_p g_s⁻¹)</i>		
100 g l ⁻¹ de		57,6	56,6
glicose	<i>Concentração de lactato final alcançada (g l⁻¹)</i>	0,09	0,14
	<i>Y_{x/s} (Cmol_x Cmol_s⁻¹)</i>	0,73	4,72
	<i>Produtividade média (g l⁻¹ h⁻¹)</i>		

[056] A análise da comunidade microbiana revelou que o enriquecimento do pH foi predominante por espécies de *Lactobacillus*. Uma população lateral significativa de *Megasphaera* foi detectada.

[057] Em pH 7, observou-se que *Streptococcus* é o gênero predominante,

ocorrendo também vários gêneros de *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella* e *Citrobacter*. A quantidade de *Streptococcus* mostrou ser muito dominante, na faixa de > 90% da biomassa.

[058] Outros testes foram realizados, utilizando 100 g/l de glicose produzindo 82 g/l de lactato, com uma razão L:D de 1:99. O rendimento de biomassa foi de 0,08 Cmol-x/Cmol-S e obteve-se uma produtividade de 2,35 g/l/h.

Conclusões

[059] A obtenção da produção seletiva de ácido L-láctico usando culturas mistas sem esterilização e um inóculo de cultura puro foi alcançada. Um ambiente ácido em pH 5 foi testado em comparação com um ambiente de pH neutro em pH 7 nas mesmas condições de cultivo. Foi usado um meio complexo, pois estimula o crescimento de bactérias de ácido láctico. Os tempos de ciclo adaptativos podem ser ajustados para a dosagem de base de tempo interrompida e o substrato, glicose, foi considerado esgotado (o "platô" foi atingido). Foi constatado que as bactérias de ácido láctico poderiam ser enriquecidas com sucesso em pH 5 e pH 7 usando a estratégia de enriquecimento descrita. Além disso, a produção de ácido láctico em pH 7 é favorecida em relação a pH 5, pois a produtividade é maior e há produção seletiva de ácido L-láctico.

[060] Os inventores obtiveram um alto rendimento de ácido láctico em glicose usando um meio definido e condições de biorreator definidas. Um rendimento estável de > 70% LA g/g de glicose e uma produtividade de 6,2 g/l* h em um biorreator de 2l a 10 g/l de glicose e uma titulação de ácido láctico de 57 g/l é obtido no reator. Essas condições, ou mais explicitamente, esses parâmetros ecológicos podem ser aplicados para otimizar as atuais fermentações em grande escala que produzem ácido láctico. Além disso, os fluxos de resíduos atuais podem ser usados para fermentar os mesmos em ácido láctico com alto rendimento e refinar o ácido láctico para fora do fluxo.

[061] Com o presente método e sistema, um rendimento máximo obtido de 0,69 (molp mols⁻¹), uma produtividade máxima obtida de 6,24 (g l⁻¹ h⁻¹), uma razão D:L-lactato de 0-100, e um a concentração final de lactato atingida de 56,6 (g l⁻¹) foi obtida.

[062] Abaixo, os resultados dos documentos da técnica anterior e da presente invenção são comparados.

[063] Tabela dos melhores resultados alcançados com base no rendimento

Parâmetro	Presente invenção	Akao <i>et al.</i> 2007	Tang <i>et al.</i> 2016	Liang <i>et al.</i> 2015	Zhang <i>et al.</i> 2008
pH	7,0	6	pH a 6 a cada 12 horas	Descontrolado, cerca de 3,5	7
Temperatura	30 °C	55 °C	37 °C	35 °C	35 °C
HRT e SRT	34 horas	240 horas	120 horas	24 horas	120 horas
Razão peptídeos/carboidratos (g/100 g)	7	31,4	10,9	56,1	25,2
Alimentação de concentração de carboidratos (g L ⁻¹)	100	83	56,8	11,97	99,14
rendimento de ácido láctico em carboidrato (g/g)	0,82	0,73	0,54	0,63	0,65
Produtividade (g LA L ⁻¹ h ⁻¹)	2,42	0,33	0,25	0,16	0,53
Concentração de ácido láctico no final do experimento, titulação de produto (g L ⁻¹)	82,3	39,6	30,5	7,5	64

Razão D:L	1:99	3:97	Não relatado	Não relatado	40:60
-----------	------	------	-----------------	--------------	-------

[064] Portanto, para obter os melhores resultados, nota-se que Akao usou uma temperatura diferente, com rendimento ainda menor e produtividade muito menor, Tang define o pH para 6 a cada 12 horas, o que não tem nada a ver com controle e Liang tem um pH descontrolado. Os rendimentos de ácido láctico são muito mais baixos e a produtividade é um fator mais baixo e, normalmente, quase uma ordem mais baixa. Além disso, a razão D:L é muito melhor.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de ácido láctico em um reator em batelada de sequenciamento **caracterizado por** compreender

passar por ciclo adaptativamente pelo menos uma vez entre (i) uma fase de reação, (ii) uma fase de efluente e (iii) uma fase de alimentação, de preferência, passar por ciclo 2-5000 vezes,

na fase de reação

(ia1) manter o pH em um nível predeterminado entre 5,6 e 8,5, de preferência, entre 5,9 e 8,0, mais preferencialmente entre 6,4 e 7,5, como em 7,0,

(ia2) manter a temperatura a 30-80 °C, de preferência, a 35-72 °C, mais preferencialmente a 37-63 °C, como 40-45 °C,

(ia3) agitar a fase de reação, como a 1-600 rpm,

(ib) adicionar uma base quando o pH estiver abaixo do nível predeterminado até que o pH esteja acima ou no nível predeterminado,

(ic1) permitir que a fermentação continue durante um tempo de fermentação até que a fermentação atinja uma fase estacionária em que o pH é substancialmente constante durante pelo menos 10 minutos,

(ic2) quando a fermentação atingiu a fase estacionária, remover a parte do efluente para a fase de efluente, e

(ic3) adicionar alimentação à fase de reação,

na fase de efluente

(iia) remover pelo menos parte do ácido láctico, e

(iib) fornecer, de preferência, um restante da fase de efluente para a fase de alimentação, de preferência, em que 30-70% do caldo é fornecido para a fase de alimentação, como 40-60% de caldo,

na fase de alimentação

(iiia) fornecer uma mistura de alimentação aquosa que compreende

> 10 g/l de um composto que compreende sacarídeo, em que o composto de sacarídeo é selecionado a partir de glicose, sacarose, frutose, galactose, lactose,

dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, amido, inulina, de preferência, um único composto ou uma combinação dos mesmos, e

> 1 g de peptídeo/100 g de composto de sacarídeo, em que a concentração de peptídeo na fase de alimentação está entre 1-30 g de peptídeo/100 g de sacarídeo, adicionar, no início da fase de reação, uma cultura inicial mista com capacidade para fermentar o sacarídeo em ácido láctico, como no reator, e em que um tempo de retenção hidráulica de biomassa é controlado entre 4h-144 h.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** biomassa microbiana ser passada por ciclo pelo menos uma vez entre a fase de reação, a fase de efluente e a fase de alimentação.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizado por** a fase de alimentação compreender > 80 g/l de composto de sacarídeo, como 100-200 g/l.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** a concentração de peptídeo na fase de alimentação estar entre 2-20 g de peptídeo/100 g de sacarídeo, mais preferencialmente entre 5-15 g/100 g.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** o peptídeo ser selecionado a partir de mono-peptídeos, dipeptídeos, tripeptídeos, tetrapeptídeos ou ser fornecido como biomassa microbiana e combinações dos mesmos, e/ou

em que pelo menos uma parte da biomassa é reciclada.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** o tamanho de reator ser de 50-1000 m³.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** o reator ser um reator em batelada de sequenciamento ou um reator em batelada de fornecimento de sequenciamento.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado por** nenhuma esterilização e/ou inoculação ser realizada e/ou

nenhuma levedura viva estar presente no estoque da fase de alimentação.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado por** a fase de alimentação compreender vitamina B e/ou precursor metabólico do mesmo, de preferência, 10^{-2} -10 mg de sacarídeo de vitamina B/g e/ou precursor metabólico.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** a vitamina B ser selecionada a partir da vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (niacina, nicotinamida, ribosídeo de nicotinamida), vitamina B₅ (ácido pantotênico), vitamina B₆ (piridoxina), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₁₂ (cobalamina), um sal das ditas vitaminas e combinações das mesmas.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** o precursor metabólico ser selecionado a partir de precursores metabólicos para coenzima no catabolismo de açúcar, cofator FAD, cofator FMN, coenzima NAD, coenzima NADP, coenzima A, uma coenzima metabólica, uma coenzima de metabolismo de ácido graxo, uma coenzima de metabolismo de aminoácido e combinações das mesmas.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado por** uma titulação de cultura de ácido lático de >40 g/l ser mantido, como > 50 g/l.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 **caracterizado por** uma concentração de magnésio (cátion) na fase de alimentação ser de 0,1-5 g/l, e/ou em que a concentração de cálcio (cátion) na fase de alimentação é > 1,5 mg Ca/g de sacarídeo.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** a cultura inicial mista ser enriquecida em microrganismos produtores de L-lático.

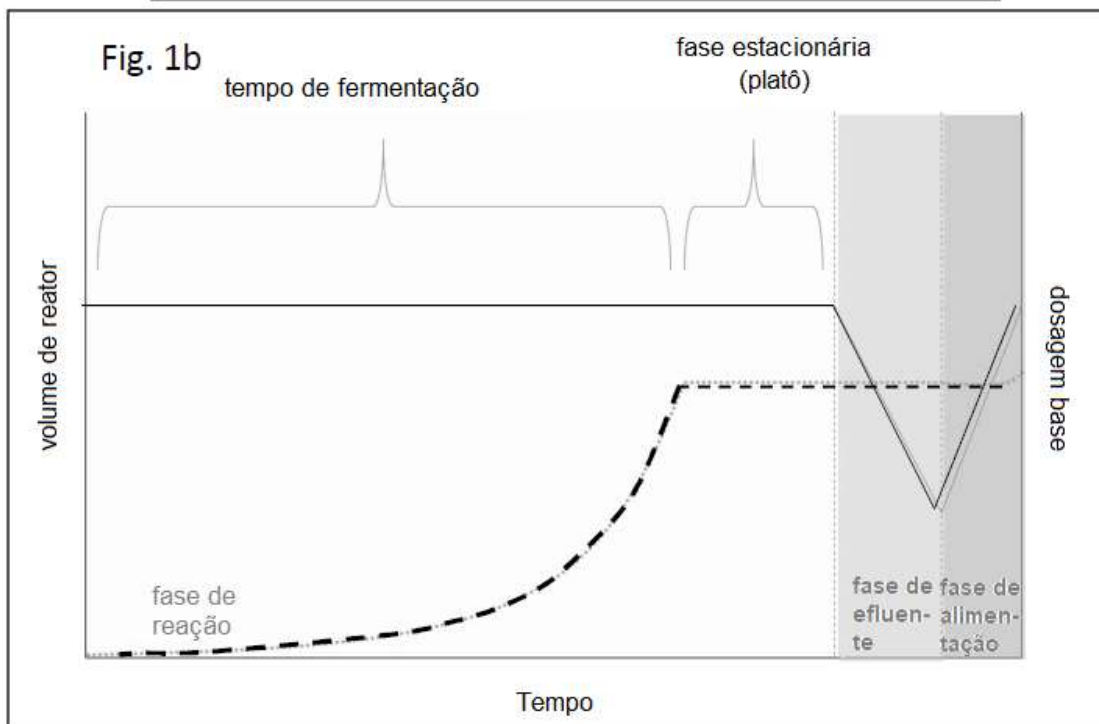
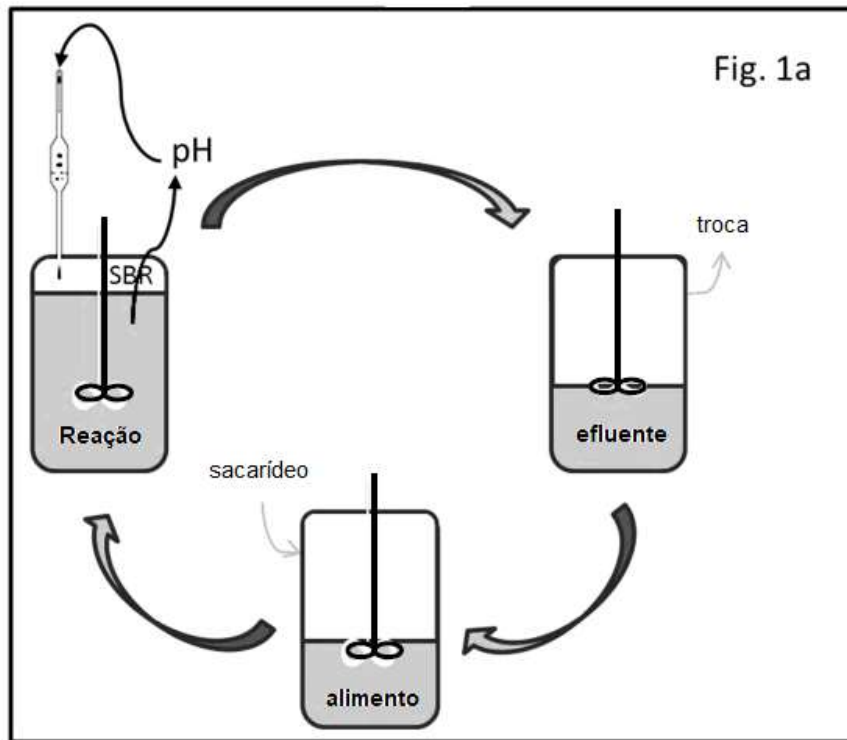
15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado por** um tempo de retenção hidráulica de biomassa ser controlado entre 18-96 horas, como entre 24-48 horas.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado por** a fase de reação compreender > 10% de Estreptococos.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **caracterizado por** um tempo de retenção hidráulica (HRT) ser de 1 a 8 dias.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizado por** uma base ser selecionada a partir de hidróxidos, óxidos, amônia e combinações dos mesmos, de preferência, que compreende Ca^{2+} , Na^+ , ou Mg^{2+} e combinações dos mesmos.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **caracterizado por** um pH ser mantido a $7,0 \pm 0,5$, uma temperatura a $30-55 \text{ }^\circ\text{C}$, uma quantidade de peptídeo a $> 2\text{g}/100\text{g}$ de sacarídeo, uma vitamina B a $> 0,1\text{g}/\text{l}$, e em que $> 98\%$ de ácido L-lático é produzido, como $> 99,9\%$ de ácido L-lático (em um mol de lactato/mol de sacarídeo que compreende uma base de composto).



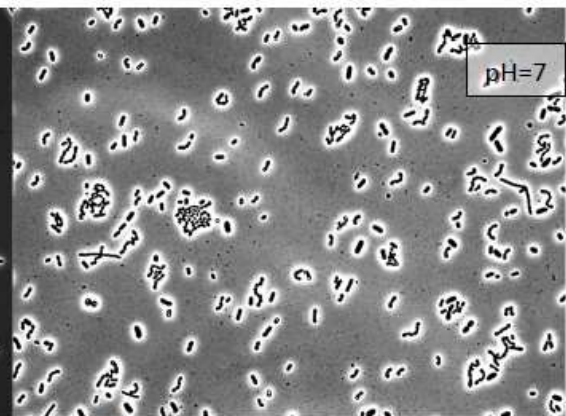
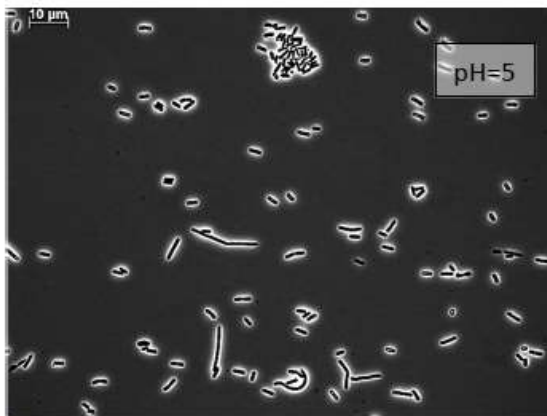
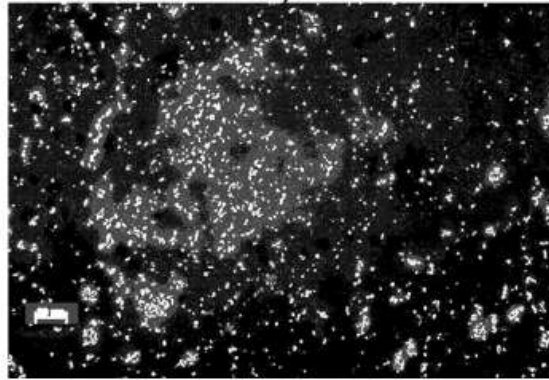


Fig. 3a

Fig. 3b

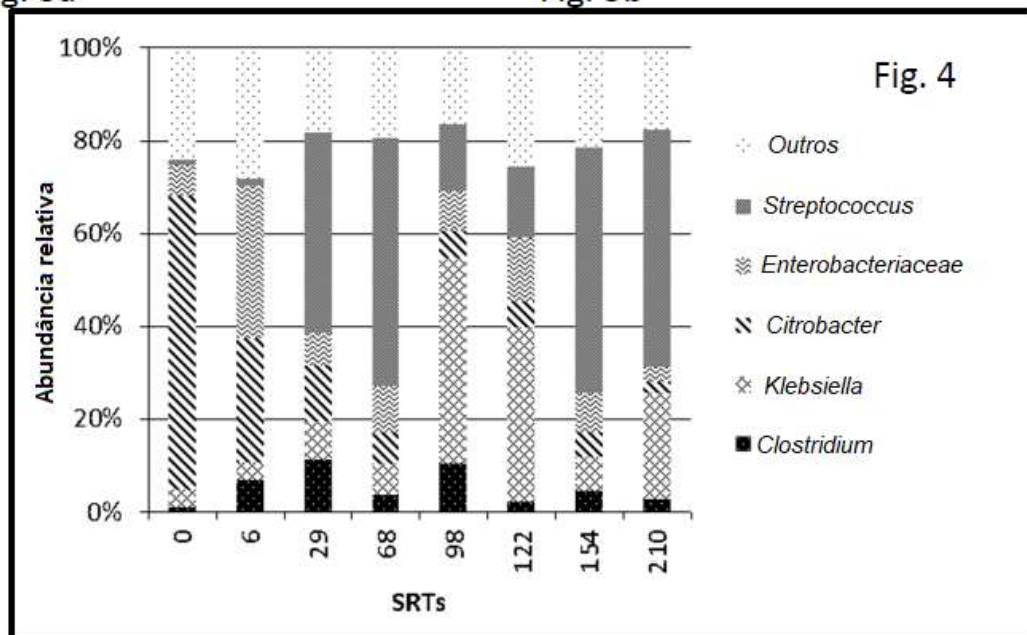


Fig. 4