



MICHEL PAULINO LUZ

**PRODUÇÃO DE BIOAROMAS PELA
FERMENTAÇÃO DE PERMEADO DE SORO DE
QUEIJO POR *PROPIONIBACTERIUM
FREUDENREICHII* PS-1**

**LAVRAS - MG
2010**

MICHEL PAULINO LUZ

**PRODUÇÃO DE BIOAROMAS PELA FERMENTAÇÃO DE
PERMEADO DE SORO DE QUEIJO POR *PROPIONIBACTERIUM
FREUDENREICHII* PS-1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Luís Roberto Batista

Co-Orientador
Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

**LAVRAS - MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Luz, Michel Paulino.

Produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 / Michel Paulino Luz. – Lavras: UFLA, 2010.

103 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia industrial. 3. Bactérias propiônicas. 4. Aroma. 5. Fermentação propiônica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.024

MICHEL PAULINO LUZ

**PRODUÇÃO DE BIOAROMAS PELA FERMENTAÇÃO DE
PERMEADO DE SORO DE QUEIJO POR *PROPIONIBACTERIUM
FREUDENREICHII* PS-1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de maio de 2010

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves UFLA

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista UFLA

Dr. Luis Roberto Batista
Orientador

**LAVRAS - MG
2010**

*A Deus e a Jesus Cristo por me amarem,
glorificando e abençoando de maneira
tremenda meus passos nos caminhos da
vida.*

OFEREÇO

*Aos meus pais, Rui e Elaine, por todo
amor, dedicação, afeto e luta, sem
nunca desistirem, para que as minhas
vitórias fossem a deles. Amo vocês.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão, Leonardo, por ser um exemplo de fé, luta e amor.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos, por proporcionar mais um passo em minha carreira profissional.

Aos Profs. Luis Roberto Batista e José Guilherme L. F. Alves, pelos ensinamentos, paciência, orientação, sempre acreditando no meu trabalho.

A Profa. Soraia Borges, pelo crédito em minha capacidade de desenvolver este projeto e por toda ajuda nos momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus familiares, tios e tias, primos e primas, em especial à minha madrinha Josefina, por todo apoio, compreensão e carinho.

Aos meus estimados parentes, que nos deixaram, em especial, minha Vó Lavínia, meu Padrinho Fernando, meu Tio André, minha Tia Sandra e minha Tia-Avó Eva, por serem exemplos de caráter e amor em vida. Agradeço-lhes com todo meu amor e saudade.

À Elisa, por me proporcionar momentos únicos e inesquecíveis, pelo amor e carinho. Companheira incrível! Estendo a toda sua família, em especial, ao Augusto, Icléa e Cristiane, todo meu afeto e meus agradecimentos.

Aos meus amigos de faculdade, Diguinho, Thales, Luísa, Marali. A todos, sem exceção, deixo o meu muitíssimo obrigado.

Aos meus amigos que a vida me presenteou, em especial ao Renato e aos atleticanos, agradeço pelas bagunças, conselhos, momentos impagáveis proporcionados por todos vocês.

Aos meus amigos do Kyokushin, em especial ao Sensei Peterson, por não me deixarem esquecer a verdadeira virtude da humildade.

Ao pessoal do laboratório (Joyce, Gabriel, Thaís, Fabiana, Elis, Daiane, todos e todos), valeu demais por me apoiarem e colaborarem com este trabalho.

À FAPEMIG, pela parceria neste projeto.

Às funcionárias dos Laboratórios, Creuzinha e Tina, por todo apoio e comprometimento com este projeto. Estendo às meninas da limpeza, em especial à Denise, por todo carinho que sempre tiveram comigo.

À Cidinha e ao Whasley, do Departamento de Biologia, por me auxiliarem nas análises cromatográficas.

Ao estabelecimento Polenghi (São Vicente de Minas, MG) pela colaboração na coleta do permeado para execução dos experimentos.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O aroma e sabor são atributos sensoriais de extrema importância no consumo dos alimentos. A tendência atual dos consumidores de estarem mais preocupados com a saúde e mais conscientes dos riscos em consumir substâncias sintéticas leva ao estímulo de pesquisas, voltadas para produção biotecnológica de aromas, denominados bioaromas, considerando processos fermentativos por microrganismos em diferentes substratos. Substratos líquidos e poluentes, como soro ou soro ultrafiltrado, também, podem ser aproveitados para produção de bioaromas, produtos de maior valor agregado, minimizando, assim, o impacto ambiental. A fermentação do soro ultrafiltrado por células de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 livres dá origem a ácidos graxos de cadeia curta, principais constituintes do aroma de queijo suíço, podendo agregar maior valor ao permeado ultrafiltrado. Neste trabalho, o bioaroma de queijo, contendo ácidos orgânicos de cadeia curta, principalmente, ácido acético e propiônico, foi produzido via processo fermentativo em batelada, utilizando células livres de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, empregando permeado de soro lácteo como matéria-prima. Os efeitos do teor de sólidos solúveis (°Brix) e temperatura (°C) do meio foram avaliados com respeito à produção de bioaroma. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), com 2 fatores e totalizando 11 ensaios. Os ajustes dos teores de sólidos solúveis foram realizados por meio da adição de lactose. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers, incubados em estufa com temperatura controlada por 144 horas. O pH do meio de fermentação foi ajustado para $7,0 \pm 0,20$ com NaOH 0,2N. As análises dos ácidos láctico, acético e propiônico foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O melhor resultado obtido para ácido acético, 0,870 g/L, foi utilizando concentrações de 10°Brix e temperatura de 30°C. Para a produção de ácido propiônico, o melhor resultado foi obtido com concentrações de 10°Brix e temperatura de 34,2°C, com valor de 6,402 g/L. No rendimento do ácido acético e propiônico, os melhores resultados foram 0,445 g ác. acético/g ác. láctico e 2,724 g ác. propiônico/g ác. láctico, respectivamente. Concluindo, as melhores condições para formação de ácido propiônico e ácido acético, neste trabalho, foram com teor de sólidos solúveis de 10°Brix e temperatura entre 30 e 34°C.

Palavras-chave: Bioaroma. Permeado de soro de queijo. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Ácidos graxos de cadeia curta.

ABSTRACT

The aroma and flavor sensory attributes are extremely important in food intake. The current trend of consumers being more health-conscious and more aware of the risks in consuming synthetic substances, lead to the stimulation of research for the biotechnological production of flavorings, called bioaromas considering fermentation processes of microorganisms on different substrates. Substrates and liquid pollutants, such as whey or whey ultrafiltrate, can also be used to produce bioaromas, products with higher added value, thus minimizing the environmental impact. The whey ultrafiltrate fermentation by free cells of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 gives rise to short-chain fatty acids, major constituents of the aroma of Swiss cheese, can add more value to permeate ultrafiltrate. In this work, the bioaroma cheese, containing short-chain organic acids, mainly acetic and propionic acid, were produced via fermentation process in batch, using free cells of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, using whey permeate as feedstock. The effects of soluble solids (°Brix) and temperature (°C) of the medium were measured with respect to the production of bioaroma. Was conducted a rotational central composite design (RCCD) with two factors and a total of 11 trials. Adjustments of the soluble solids were performed by the addition of lactose. The fermentations were conducted in flasks that were incubated with controlled temperature for 144 hours. The pH of the fermentation medium was adjusted to $7,0 \pm 0,20$ with NaOH 0,2 N. The analysis of lactic, acetic and propionic acid, were performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The best result obtained for acetic acid, 0,870 g/L was using concentrations of 10°Brix and 30°C. For the production of propionic acid, the best result was obtained with concentrations of 10°Brix and temperature of 34,2°C, with a value of 6,402 g/L. About the yield of acetic and propionic acid, the best results were obtained using concentrations of 5°Brix and temperature of 33°C, and value of 0,445 g acetic acid/g lactic acid and 2,724 g propionic acid/g lactic acid, respectively. In conclusion, the best conditions for the formation of propionic acid and acetic acid, in this study, was to soluble solids content of 10°Brix and temperature between 30 and 34°C.

Keywords: Bioaroma. Chesse whey permeate. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Short-chain fatty acids.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Aromas	15
2.1.1	Obtenção de aromas	17
2.2	Bactérias propiônicas	22
2.3	Fermentação propiônica	25
2.3.1	Características dos ácidos graxos de cadeia curta	26
2.3.1.1	Ácido propiônico	27
2.3.1.2	Ácido acético	28
2.3.1.3	Ácido láctico	29
2.4	Soro de leite e permeado de soro	29
2.5	Ultrafiltração	32
2.6	Planejamento experimental	33
	REFERÊNCIAS	35
	CAPÍTULO 2 Influência da proporção de inóculo de <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1 na produção de ácidos orgânicos	44
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAIS E MÉTODOS	48
2.1	Matéria-prima e microrganismo	48
2.2	Permeado de soro	48
2.3	Preparação do permeado	48
2.4	Obtenção da cultura e preparo do pré-inóculo	48
2.5	Preparo do inóculo	49
2.6	Estudo cinético	49
2.7	Métodos analíticos	50
2.7.1	Acidez total	50
2.7.2	pH	50
2.7.3	Organismos viáveis	50
2.7.4	Determinação da lactose	51
2.7.5	Determinação de teor de gordura	51
2.7.6	Determinação de proteínas	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

	CAPÍTULO 3 Avaliação dos efeitos da temperatura e do teor de sólidos solúveis sobre a produção de ácido acético e propiônico por <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1	60
1	INTRODUÇÃO	63
2	MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1	Matéria-prima e microrganismo	65
2.2	Permeado de soro	65
2.2.1	Preparação do permeado	65
2.2.2	Teor de sólidos solúveis	66
2.3	Meios de cultura e condições de crescimento	66
2.4	Preparo do inóculo	66
2.5	Fermentação do permeado	67
2.6	Planejamento experimental	67
2.7	Estudo cinético	68
2.8	Métodos analíticos	68
2.8.1	Pureza da cultura	69
2.8.2	Organismos viáveis	69
2.8.3	Determinação dos ácidos carboxílicos (acético, propiônico e láctico) 69	
2.8.4	Determinação da lactose	70
2.8.5	pH	70
2.8.6	Acidez titulável	71
2.8.7	Determinação de teor de gordura	71
2.8.8	Determinação de sólidos solúveis totais	71
2.8.9	Determinação de cinzas	72
2.8.10	Determinação de proteínas	72
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
3.1	Análises de caracterização do permeado de soro	73
3.2	Estudo cinético	74
3.2.1	Sistema fermentativo	74
3.3	Parâmetros cinéticos	80
3.3.1	Produção de ácido acético	82
3.3.2	Produção de ácido propiônico	87
3.3.3	Rendimento do ácido acético	90
3.3.4	Rendimento do ácido propiônico	94
4	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES	102

CAPÍTULO 1

**Produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo
por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**

1 INTRODUÇÃO

O aroma e sabor são atributos sensoriais de extrema importância no consumo dos alimentos, pois, se não agradarem ao paladar dos consumidores, os produtos são rejeitados e, conseqüentemente, há prejuízos financeiros para as empresas e comércio em geral. Em decorrência do processamento dos alimentos, desde a colheita até o produto final e armazenamento, os aromas são perdidos, razão pela qual eles devem ser suplementados. Em 2004, investimentos em pesquisa nacional de aromas movimentaram US\$135 milhões, registrando um crescimento na ordem de 5% ao ano e uma tendência em processos tecnológicos que visam imitar aromas naturais (PACHIONE, 2004), acompanhando a tendência mundial dos países desenvolvidos como a Alemanha (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007). Tais mudanças se devem ao fato de que os consumidores atuais estão mais preocupados com a saúde e conscientes dos riscos em consumir substâncias sintéticas.

Estes fatos levaram ao estímulo de pesquisas, voltadas para produção biotecnológica de aromas, denominados bioaromas, considerando processos fermentativos por microrganismos em diferentes substratos, sob condições mais amenas que as utilizadas para aromas sintéticos, além da especificidade dos sistemas enzimáticos, permitindo obtenção de aromas específicos (JANSSENS et al., 1992; SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005).

Substratos sólidos tais como cascas de café, frutas, bagaço de cana, farelo de trigo, algodão, canola, girassol, soja, dentre outros, muitas vezes poluentes e sem valor comercial, podem servir para o crescimento de microrganismos e produção de compostos aromáticos de alto valor comercial e grande utilização na indústria alimentícia, por meio da técnica da fermentação no estado sólido (CHRISTEN; MEZA; REVAH, 1997; MEDEIROS et al., 2003).

Substratos líquidos e poluentes, como soro ou soro ultrafiltrado, derivados de processamento de produtos lácteos e separação de proteínas, respectivamente, também, podem ser aproveitados para produção de bioaromas, produtos de maior valor agregado, minimizando, assim, o impacto ambiental, causado pela alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) destes subprodutos, (ATRA et al., 2005; BRONSTEIN; ALEGRE, 1998).

O soro ultrafiltrado é rico em lactose, sais minerais e vitaminas, e a fermentação da lactose por células de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, aprisionadas em alginato de cálcio (TEIXEIRA, 2004), ou livres (SOUZA, 2007), deram origem a ácidos graxos de cadeia curta, principais constituintes do aroma de queijo suíço, podendo ser uma interessante e valiosa aplicação em produtos diversos, agregando maior valor ao permeado ultrafiltrado.

A oportunidade de utilizar um subproduto da indústria de laticínios, como meio de cultura para processos fermentativos, a necessidade das indústrias alimentícias de produtos estáveis em suas formulações e o crescente interesse dos consumidores por produtos orgânicos naturais levaram este pesquisador à elaboração deste projeto.

Além disso, como o setor de laticínios é de grande importância no estado de Minas Gerais, gerando um grande volume de soro, o aproveitamento deste subproduto de alta demanda biológica de oxigênio (DBO), na produção de bioaroma, seria uma alternativa para gerar divisas e, também, de minimizar os impactos ambientais.

Tem como objetivo, aperfeiçoar a produção de bioaroma de queijo suíço, obtido por processo fermentativo, conduzido em batelada por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, estudando a influência da concentração de inóculo, do teor de sólidos totais do meio de fermentação e da temperatura sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e láctico),

desenvolvendo um produto de uso potencial na Indústria de Alimentos (indústria de aditivos, panificação, laticínios).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aromas

No Brasil (1999), segundo a Resolução nº 104 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos, e podem ser classificados em: naturais ou sintéticos.

Aromas naturais são obtidos, exclusivamente, mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, com base em matérias primas aromatizantes ou aromas naturais. Entende-se por matérias-primas aromatizantes ou aromas naturais os produtos de origem animal ou vegetal, normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento enzimático) (TEIXEIRA, 2004).

Aroma artificial é aquele em cuja elaboração foi utilizada substância aromatizante artificial, quimicamente definida, obtida por síntese ou outro processo químico adequado e que ainda não foi encontrado na natureza, adicionada ou não de matéria-prima aromatizante natural (tais como ervas, frutas, especiarias), produto aromatizante natural (preparação de composição complexa, como infusões, óleos, resinas, extratos vegetais) ou de substância idêntica à natural, onde, substância aromatizante “idêntica à natural”, quimicamente definida, dotada de propriedades organolépticas, obtida por síntese ou outro processo químico adequado e que apresenta a estrutura idêntica à da substância natural, tais como vanilina sintética, mentol sintético, etc (FABRE et al., 1995).

Compostos aromatizantes pertencem a diversas funções orgânicas, mas, em geral, possuem heteroátomos (O, N, S) e massa molar relativamente baixa (40-250 g/mol). Frequentemente apresentam mais de um grupo funcional, sendo os mais comuns os álcoois, éteres, cetonas, aldeídos, ésteres, isoprenoides, fenóis, outros compostos contendo anéis aromáticos ou anéis com N ou O como heteroátomo. Além das características odoríferas, alguns compostos possuem outras características: antimicrobianos, inibidores específicos do crescimento de espécies competidoras, repelentes de predadores, atratores de insetos, estimulantes de crescimento (CARVALHO, 1999).

Aromas são extremamente importantes para os alimentos (café, frutas, produtos de panificação). Muito de nossa dieta pode ser não atrativa por deficiência de um sabor intrínseco. Se o aroma e o sabor de um alimento são atrativos ao paladar, então, este é ingerido melhor. O aroma de qualquer produto alimentício dependerá de todos os ingredientes usados em sua preparação e tipo de processamento envolvido (HEATH, 1978 citado por TEIXEIRA, 2004).

Nos últimos anos, a produção biotecnológica de compostos de aroma vem sendo estimulada pela crescente demanda do mercado consumidor por produtos rotulados como “naturais” e “saudáveis” (DEMYTTENAERE; KIMPE, 2001).

Isso, aliado ao interesse por aromas naturais, em vez de aromas sintéticos, levou a um aumento de investigações focadas em produção biotecnológica dos denominados “bioaromas” (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007).

Alguns desses processos estão sendo explorados comercialmente. Quase 80% dos aromas e fragrâncias utilizadas em nível mundial são produzidas quimicamente. No entanto, 70% de todos os sabores dos alimentos utilizados na Alemanha eram naturais (KRINGS; BERGER, 1998).

2.1.1 Obtenção de aromas

A maior parte dos aromas existentes no mercado é produzida via síntese química. Com isso, o constante crescimento do mercado de aromas força os fornecedores a procurarem por fontes alternativas (KRINGS; BERGER, 1998).

As fontes convencionais de síntese química são ainda viáveis, mas a geração de compostos de aromas de origem biológica, conhecidos como naturais ou bioaromas, está sendo mais atrativa (KRINGS; BERGER, 1998). Baseia-se na síntese de substâncias aromáticas por bioprodução, a qual se dá por meio de processo fermentativo, de modo que a cultura microbiana pode ser melhorada pela otimização das condições de cultivo (FABRE et al., 1995).

As qualidades aromáticas de produtos sintéticos nem sempre se igualam às de produtos naturais. Como alguns aromas são constituídos de uma série de substâncias complexas, em dosagens determinadas, às vezes, as únicas formas de produzir um aroma “convicente” são usando fontes naturais ou microrganismos (COSTELLI, 2005).

Os processos microbiológicos parecem ser os mais promissores para a produção de aromas puros ou misturas complexas. Muitos microrganismos são capazes de produzir moléculas de aroma mediante biossíntese, muitas vezes chamada de síntese *de novo*, que significa a fermentação, iniciando-se de nutrientes simples, tais como açúcares e aminoácidos. Os microrganismos, também, podem catalisar conversões específicas de precursores ou intermediários, um processo chamado de bioconversão, ou biotransformação de precursores (JANSSENS et al., 1992).

O primeiro passo no desenvolvimento de processos microbiológicos para síntese de aromas é identificar uma ou mais linhagens que produzam os metabólitos desejáveis e em quantidades desejadas. Os produtos são formados

por vários passos anabólicos (e talvez catabólicos) catalisados por enzimas (WHITEHEAD; OHLEYER, 1998).

As linhagens podem ser obtidas de ecossistemas naturais, de coleções de culturas microbianas, ou de fermentações tradicionais (BELIN; BENSOUSSAN; SERRANO-CARREON, 1992).

Sharpf et al. (1986) citam alguns dos fatores que contribuem para que as pesquisas em produção de aroma por microrganismos se resumam, principalmente, no conhecimento das vias metabólicas envolvidas. Tais fatores são representados por dificuldades técnicas inerentes ao processo de produção, que são baixa produtividade, toxicidade do produto, tempo de fermentação, recuperação do produto e mistura de compostos.

Um alimento bastante aromatizado artificialmente é o queijo (MAISTRO; DAMACENA; FREIRE, 2002). O aroma de queijo é o resultado de uma mistura complexa de vários componentes voláteis e não-voláteis. Os componentes voláteis têm sua origem, principalmente da degradação enzimática de carboidratos, proteínas e lipídeos de queijo pelos microrganismos. Para controlar ou modificar o aroma de queijo, é necessário que se entenda a microbiota do queijo na formação dos componentes do aroma (THIERRY et al., 2004).

As bactérias propiônicas são essenciais para o desenvolvimento das características do aroma (THIERRY et al., 2004). Crescem em muitas variedades de queijos durante a maturação e são microrganismos característicos associados com queijo tipo-suíço tais como Emmental, Gruyère, Appenzel e Comte (BERESFORD et al., 2001).

Propionibactéria é conhecida por fermentar a lactose, formando ácido acético, ácido propiônico, succínico e lático e, também, por promover a formação de ácidos graxos e ácido isovalérico, o qual é resultante da lipólise e

do catabolismo da leucina/isoleucina. Todavia, sua habilidade de formar “flavours” ainda não foi confirmada (THIERRY et al., 2004).

A utilização de soro lácteo, como meio de cultura, tem sido bastante estudada há bastante tempo (MINAS GERAIS, 1998). Sua composição e seu alto teor em lactose, açúcar fermentescível, fazem de soro líquido ou concentrado, um substrato de fermentação bastante interessante. Acrescentando-se a estes fatores, normalmente o soro é disponível em grande quantidade a custo relativamente baixo, sendo uma de suas principais utilizações, a produção de produtos oriundos da fermentação por bactérias lácticas e propiônicas, tais como ácido láctico e lactatos, beta-galactosidase, ácido propiônico e propionatos, etanol, vitaminas, principalmente B₁₂, bebidas fermentadas, alcoólicas ou não (MINAS GERAIS, 1998).

Na Figura 1, são apresentados os ciclos bioquímicos fermentativos da glicose até os principais produtos da fermentação (WOOD, 1981).

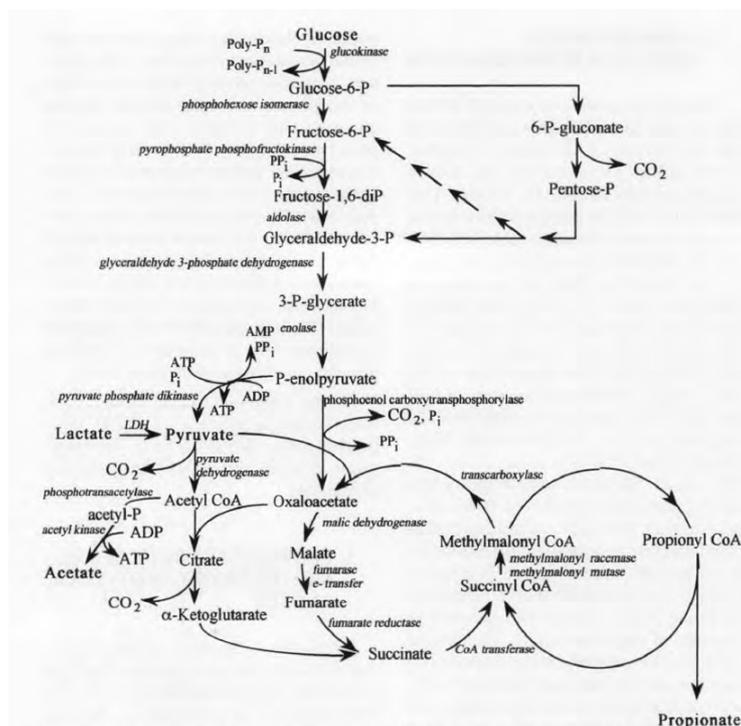


Figura 1 Via bioquímica da fermentação de glicose por espécies de *Propionibacterium*.
Fonte WOOD (1981).

A lactose, glicose e lactato, substratos utilizados pelas bactérias propiônicas, são convertidos a ácido propiônico por meio do ciclo do ácido dicarboxílico. Mediante uma reação de transcarboxilação, eles podem converter piruvato a oxaloacetato, que, então, é convertido a succinato pelas enzimas do ciclo do ácido dicarboxílico. Succinato é convertido por intermediários da metilmalonil coenzima A (CoA) a propionato. O grupo carboxílico removido da metilmalonil-CoA é transferido a piruvato para formar oxaloacetato, fazendo o caminho cíclico (HUANG et al., 2002). Ácido acético e CO₂ são formados baseando-se piruvato via piruvato desidrogenase (YE et al., 1996).

Tanto a biotina como a vitamina B₁₂ estão envolvidas nestas reações como cofatores. Diferentemente da biotina, que precisa ser adicionada ao meio, para a maioria das linhagens, a vitamina B₁₂ pode ser produzida por estes microrganismos em tais quantidades que algumas linhagens são usadas para produzir esta vitamina comercialmente (TEIXEIRA, 2004).

As maiores desvantagens da fermentação propiônica são o lento crescimento da bactéria, forte produção de inibidores e a dificuldade de recuperação do produto (HUANG et al., 2002).

Esforços são feitos para eliminar a produção de inibidores e para melhorar a produtividade da fermentação. Cepas tolerantes a ácido propiônico, reatores com células imobilizadas e reatores com reciclo de células têm sido desenvolvidos para melhorar o rendimento e a produtividade da fermentação (HUANG et al., 2002).

Teixeira (2004) visando à produção de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente, acético e propiônico, principais responsáveis pelo bioaroma de queijo, realizou um processo fermentativo, conduzido em batelada por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 aprisionada e livre, empregando permeado de soro de queijo, como matéria-prima. Os parâmetros de temperatura e tempo de fermentação, concentração de inóculo, temperatura de autoclavagem do meio de cultura e tempo de estocagem do inóculo aprisionado, foram variados nesta etapa com o objetivo de investigar os efeitos sobre a produção de ácidos orgânicos e biomassa celular comparando com os resultados com o sistema livre. O permeado de soro foi autoclavado a temperaturas de 111°C/20 min e 121°C/20 min, sendo depois deste processo, o pH do meio ajustado a 7,0, com NaOH 0,2N, e sem adição de nutrientes. As temperaturas de incubação foram de 30°C±1 e 37°C±1, com tempos de fermentação de 62, 72, 113 e 144 horas.

Coral (2008) investigou a produção de ácido propiônico por oito cepas de propionibacteria. Foi estudada utilizando meio básico com melaço de cana, glicerol e lactato (BML), com fermentação em bateladas de um litro a 30 e 36°C, em biorreator e cujo crescimento ocorreu sob baixa concentração de oxigênio dissolvido e pH sem controle. Propionibacteria pode ser inibida por alguns elementos do meio, tais como sais e açúcares. Sendo assim, foram realizados ensaios para testar a melhor concentração de melaço de cana (1, 2, 5 e 10°Brix), glicerol (10, 15 e 20 g/L) e lactato de sódio (10, 20, 30 e 40 g/L), com taxas de inóculo de (1, 2 e 5% v/v), em tempos de fermentação (48, 96 e 144 horas). Este autor observou que a produção de ácido acético foi maior a 30°C (6,45±0,37 g/L), e a maior produção de ácido propiônico à 36°C foi de 17,46±0,43 g/L e 17,15±0,45 g/L à 30°C, constatando que a formação de ácido propiônico, usando lactato como fonte de carbono, não depende dos níveis de temperatura, pois, as concentrações do ácido propiônico são muito similares a 30 e 36°C para todas as propionibacterias, embora algumas cepas como a *Propionibacterium freudenreichii*, mostra sem pequenas diferenças na produção deste metabólito nas duas temperaturas.

2.2 Bactérias propiônicas

As bactérias propiônicas são Gram-positivas, imóveis, não formadoras de esporos, anaeróbicas e anaeróbicas facultativas, catalases positivas e apresentam-se em forma de bastonetes curtos ou de cocos, de acordo com o meio em que se encontram. As colônias menores podem apresentar cores amarelas, laranjadas ou vermelho escuro (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002).

Pela classificação da 9ª edição de Bergey's of Systematic Bacteriology (MOURA, 2001), as bactérias propiônicas se dividem em dois grupos, segundo os nichos ecológicos: a) bactérias propiônicas ligadas à pele e envolvidas na

patologia da acne; b) bactérias propiônicas clássicas, de interesse industrial, em especial na indústria de laticínios, que são as principais responsáveis pelas características dos queijos suíços. A textura típica de queijos suíços, olhaduras abundantes e lisas, são produzidas pela ação destas bactérias durante a maturação dos queijos. Para os queijos tipo Parmigiano, o Grana Padano e o Parmesão, essas olhaduras se constituem em graves defeitos (CARCANO et al., 1995).

Com base na homologia do ácido desoxirribonucleico (DNA) e similaridades da parede, as bactérias propiônicas lácticas são classificadas em seis espécies: *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *Shermanii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* e *P. acidopropionici*, *P. coccoides* e *P. cyclohexanicum* (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002). Elas se distinguem por seus perfis de fermentação e por suas características morfológicas e fisiológicas. A taxonomia do gênero *Propionibacterium* se encontra em plena evolução (FESSLER et al., 1998). As bactérias propiônicas cutâneas, também, são classificadas em seis espécies: *P. acnes*, *P. avidium*, *P. granulosum*, *P. lymphophilum*, *P. propionicum* e *Propioniferax innocua*. As bactérias propiônicas clássicas, em contraste com as bactérias cutâneas, não produzem indol e não liquefazem a gelatina. As bactérias propiônicas clássicas e cutâneas diferem entre si, principalmente, pelos habitats naturais típicos (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002).

As bactérias propiônicas clássicas, ao fermentarem açúcares e ácido láctico, formam ácido propiônico, ácido acético e dióxido de carbono. A produção de dióxido de carbono é crucial para a formação de olhaduras em queijo duro que envolvem a propionibactéria, tipo queijo suíço. Além disso, as bactérias propiônicas são muito importantes no desenvolvimento de aroma doce e do cheiro de nozes destes queijos. Proteínas contendo prolina e leucina, produzidos pela proteólise, e ácidos graxos produzidos pela lipólise (quebra da gordura, inclusa no meio de fermentação ou presente no soro), ao longo do

catabolismo de seus produtos, contribuem significativamente para o desenvolvimento dos “flavours” característicos destes queijos (ANASTASIOU et al., 2006).

Certas estirpes de bactérias propiônicas podem crescer no meio extrato de levedura e lactato de sódio a temperaturas entre 2,8 a 7,2°C, por um tempo de incubação de quatro meses. As bactérias propiônicas encontradas no leite podem crescer a temperaturas de 15 a 40°C, porém, a temperatura ótima de crescimento situa-se em torno de 30°C (CARCANO et al., 1995).

O pH ótimo de crescimento está na faixa de 6,5 a 7,0. O pH igual a 5,0 é o ponto crítico e em valores de pH abaixo deste, há perda de viabilidade (BERESFORD et al., 2001).

As bactérias propiônicas são pouco resistentes à presença de sal, podendo se desenvolver em presença de 6,0 % a pH 7,0 e 3% a pH 5,2, sendo o crescimento menor na periferia dos queijos em que a concentração de sal pode chegar a 3,5% em média (MOURA, 2001).

Durante o processo de fabricação dos queijos, assim como durante a passagem por meio do trato gastrointestinal humano, as bactérias propiônicas são submetidas a uma variedade de estresse biótico e abiótico. Todavia, a propionibacteria se adapta a esses “estresses biotecnológicos”, sobrevivem e crescem nos queijos, alcançando uma população final de 10^9 UFC/g (ANASTASIOU et al., 2006).

As bactérias propiônicas são utilizadas, ainda, como cultura para ensilagem e em preparações farmacológicas (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002).

2.3 Fermentação propiônica

As bactérias propiônicas catabolizam a hexoses pela via Embden-Meyerhof-Parnas ou Via dos Ácidos Dicarboxílicos. Essas bactérias podem fermentar o lactato, com produção do piruvato. Considerando o piruvato, podem formar o acetato e CO₂; e pela reação de transcarboxilação, ocorre a conversão do piruvato a oxaloacetato o qual é, posteriormente, convertido em succinato (CROW, 1986).

A fermentação pelas bactérias propiônicas pode ocorrer sobre a glicose, glicerol e alguns aminoácidos, mas o substrato preferido é o lactato. Os produtos principais desta fermentação são os ácidos propiônicos, acético e o CO₂ (FURTADO, 1991). Logo nos dois a três primeiros dias de fermentação, toda a lactose é convertida pelas bactérias lácticas, em glicose e galactose por hidrólise e, depois, em ácido láctico. Conclui-se que cada molécula de lactose é convertida em quatro moléculas de ácido láctico (MOURA, 2001).

Um estudo comparativo realizado por Himmi et al. (2000), ao compararem duas linhagens de propionibactérias (*P. acidipropionici* e *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*), utilizando meio com glicerol ou glicose, observaram a formação em todos os casos de quatro produtos finais, que consistiram do ácido propiônico como principal componente, o ácido acético como principal subproduto e outros dois metabólitos, n-propanol e ácido succínico. O acúmulo deste último componente, durante a fermentação, é prova de que a formação de ácido propiônico e acético, de ambos os substratos por essas cepas, envolve a via dos ácidos dicarboxílicos, caminho comumente seguido pelas propionibacterias (WOOD, 1981).

A fermentação propiônica pode ocorrer tanto em ácido láctico (CH₃CHOHCOOH) como em sal lactato de cálcio (CH₃CHOHCOO)₂Ca. Pelo balanço químico da fermentação, observa-se que três unidades de ácido láctico

com 270 g fornecem duas unidades de ácido propiônico com 148 g, uma unidade acético com 60g, uma unidade de gás carbônico com 44 g e uma de água com 18 g, em que uma unidade equivale a um mol de CO₂ que equivale a 22,4 litros nas condições normais de temperatura e pressão (FURTADO, 1991), de acordo com a estequiometria geral da fermentação propiônica abaixo:



2.3.1 Características dos ácidos graxos de cadeia curta

O desenvolvimento do aroma de queijo requer o conhecimento da respectiva contribuição de cada microrganismo da microbiota. Componentes voláteis, produzidos por *Propionibacterium freundenreichii*, estão em quantidade de 57, de 69 voláteis identificados, dentre estes os ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, propiônico, butanoico, hexanoico e isovalérico) e ésteres (principalmente os de ácido acético e propiônico) podem ser enumerados. Ácidos graxos de cadeia curta e ésteres são os compostos aromáticos de queijo que são produzidos por *Propionibacterium freundenreichii* (THIERRY et al., 2004).

Os principais ácidos orgânicos encontrados em queijo são os ácidos láctico, acético e propiônico, cujos pK_as são 3,86, 4,75 e 4,87. Destes, tem-se o ácido láctico como o inibidor menos efetivo e o ácido propiônico o inibidor mais efetivo, ao pH do queijo a uma mesma concentração (BERESFORD et al., 2001).

Ácidos carboxílicos, incluindo o acético, propiônico e butírico, são os ácidos orgânicos presentes em maior quantidade. São usados para vários propósitos e produzidos, principalmente, por processos petroquímicos que

causam poluição e usam fontes não renováveis como matéria-prima (GOSWAMI; SRIVASTAVA, 2000).

2.3.1.1 Ácido propiônico

O ácido propiônico é um ácido carboxílico de odor pungente, aroma e sabor suave de queijo, podendo ser usado como aromatizante (HEATH, 1978).

Ele é usado como ingredientes em termoplásticos, herbicidas, perfumes, drogas, antiartrite, aromas e solventes. O ácido propiônico é, também, um importante inibidor de fungos (PAIK; GLATZ, 1994).

Os sais de sódio, potássio e cálcio do ácido propiônico são listados como conservantes da categoria conhecida como (GRAS - Generally Recognized As Safe) dos aditivos alimentícios (GOSWAMI; SRIVASTAVA, 2000).

A fermentação de soro e permeado de soro (de leite ou de queijoa) é um processo ideal para a produção de ácidos carboxílicos, porque diminui a contaminação do ambiente e usa fontes renováveis (HUANG et al., 2002).

Recentemente, o interesse na produção de ácido propiônico baseando-se fermentação da lactose, presente no soro de leite, usando *Propionibacterium*, tem aumentado. Soro lácteo ou soro de queijos, fermentado por *Propionibacterium freudenreichii*, tem se mostrado como agente fungistático natural, quando incorporado em pães e outros produtos de confeitaria, substituindo os conservantes químicos (HUANG et al., 2002).

2.3.1.2 Ácido acético

É conhecido por ser um ácido fraco, corrosivo, com vapores que causam irritação nos olhos, ardor no nariz e garganta e congestão pulmonar (WIKIPEDIA, 2010).

Embora o ácido acético seja produzido em grandes quantidades pelos processos petroquímicos e utilizado para diversas aplicações (HUANG et al., 2002), estima-se que 1,9 milhões de litros de vinagre, contendo 10% de ácido acético (aproximadamente 190.000 toneladas de ácido acético) sejam produzidas anualmente por meio de processos fermentativos (EBNER; SELLMER; FOLLMANN, 1996). O vinagre, assim obtido, é utilizado, principalmente, como condimento de cozinha ou para a fabricação de molhos, ketchup e maionese (ORY; ROMERO; CANTERO, 2002).

É o ácido orgânico, frequentemente utilizado como matéria-prima para se preparar outros produtos como ésteres. Outra importante aplicação do ácido acético é como solvente para muitos processos industriais, como na fabricação de acetato de celulose e de produtos farmacêuticos (SHI et al., 2005).

Recentemente, muitos pesquisadores têm se esforçado para determinar porque ácidos orgânicos e seus sais funcionam como inibidores de crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (JENSEN et al., 2003).

A utilização de microrganismos, para a produção de ácido acético, em virtude de seu atributo primário e do baixo custo de produção, tornou-se a forma mais viável. Todavia, o principal obstáculo para o desenvolvimento desta tecnologia é a dificuldade na separação do ácido acético do sistema aeróbio ou dos resíduos nos processos biológicos (SHI et al., 2005).

2.3.1.3 Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico não volátil, sem odor e de sabor suave. Este ácido está presente em muitos alimentos, seja naturalmente ou como produto de fermentação *in situ*, e é um dos principais intermediários do metabolismo em diversos organismos (DATTA et al., 1995). Pode ser obtido por fermentação ou síntese química, o ácido láctico tem uma história antiga de uso como acidulante e flavorizante na produção de diversos alimentos (CHOTANI et al., 2000), e como intermediário na síntese de derivados empregados pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (LIU, 2003).

Em decorrência da acumulação de ácidos orgânicos, logo após a fabricação do queijo, a massa tem seu pH entre 4,5 e 5,3. Tais valores baixos de pH não deixam que as espécies sensíveis a ácidos sobrevivam. A forma não dissociada dos ácidos orgânicos parece ser o real inibidor (BERESFORD et al., 2001).

2.4 Soro de leite e permeado de soro

Em termos de volume e em função das técnicas, utilizadas na produção de queijo, pode-se produzir entre nove a doze litros de soro, com média de dez litros para cada quilo de queijo produzido (RICHARDS, 1997).

Siqueira (2002), ao caracterizarem físico-quimicamente amostras de quatro tipos de soro de queijo (Prato, Minas frescal, Minas padrão e Mussarela) que foram obtidos de oito laticínios do estado de Minas Gerais, no período de abril a maio de 2000, obtiveram tipos de valores de pH (6,16 a 6,35), acidez titulável (11,43 a 12,21°D), teores de umidade (93,32 a 94,24 g/100 g), extrato seco total (5,36 a 6,68 g/100 g), gordura (0,65 a 0,80 g/100 g), extrato seco

desengordurado (5,11 a 5,93 g/100 g), proteína (1,24 a 1,48 g/100 g) e lactose (2,61 a 2,99 g/100 mL).

Dos componentes presentes no soro, a lactose e proteínas solúveis são os mais importantes. As proteínas possuem alto valor nutricional, pois, contêm todos os aminoácidos essenciais (UNITES STATES DAIRY EXPORT COUNCIL, USDEC, 1997; FERREIRA, 1997) e a lactose por ser fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos (TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000), e como componente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (SISO, 1996; COSTA, 1995).

O soro, todavia, consiste em solutos de baixo peso molecular como a lactose, sais minerais e outros componentes minoritários (TOLKACH; KULOZIK, 2005).

A lactose é a principal fonte de energia do soro, representando ao redor de 70% da matéria seca. Apesar de apresentar baixo teor de proteína (0,7%), o valor nutricional do soro, em relação à composição de aminoácidos essenciais, é 80% superior ao da proteína do farelo de soja (MC DONOUGH, 1997).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, ABIQ (1995), o Brasil produz 900 mil toneladas por ano de queijo. Deduz-se portanto, que são gerados, em média, aproximadamente, 7,2 milhões de toneladas anuais de soro (aproximadamente 7,0 bilhões de litros). Na alimentação humana o soro pode ser utilizado na forma líquida, condensada ou em pó e a forma em pó é, geralmente, preferida por apresentar maior tempo de armazenamento, podendo ser modificado e/ou misturado com outros produtos servindo a propósitos específicos (RUBEZ, 1998).

Na Comunidade Econômica Europeia, aproximadamente 45% do soro gerado têm sido utilizados na forma líquida, 30% na forma de soro de leite em pó, 15% como lactose e derivados desta e 10% usados na produção de proteína

concentrada (SISO, 1996). Os Estados Unidos da América são o maior produtor mundial de soro em pó e derivados (DALLAS, 1999).

Embora ainda haja casos de descarte de soro em cursos d'água, a tendência é que cada vez mais as indústrias apliquem tecnologias que permitam o processamento de grandes volumes de soro em produtos que possam ser usados em uma grande variedade de alimentos e aplicações industriais (TEIXEIRA, 2004).

O maior desenvolvimento de tecnologia de separação sólido-líquido tem sido utilizado pelas indústrias de laticínios para a recuperação das proteínas. Entre estas técnicas podem ser citadas a filtração em gel, a adsorção em suporte insolúvel, a precipitação pelo calor, a precipitação por agentes complexantes e a ultrafiltração em membrana (ATRA et al., 2005).

Na fermentação do soro, dependendo dos microrganismos utilizados, são produzidos compostos diferentes, uma vez que se utiliza um processo seguro que converta a lactose na substância desejada e que este seja viável economicamente (JAN et al., 2002).

A solução diluída de lactose, minerais e nitrogênio não-proteico que permeia a membrana é chamado de “permeado”. A solução de proteínas e gorduras que não permeia a membrana é chamada “retentado”. O grau de concentração é limitado pelo aumento da viscosidade da retenção (USDEC, 1997).

O permeado de soro, constituído basicamente de água, lactose e minerais, é um problema crítico para transformações biológicas, mesmo com seus baixos conteúdos de carbono e nitrogênio. Tem sido proposto o uso de permeado de soro com o meio de cultura de baixo custo para transformações biológicas (COLOMBAN; ROGER; BOYAVAL, 1993), como a produção de bioaromas.

Uma das alternativas é sua utilização na fermentação por bactérias propiônicas, produzindo um ingrediente natural para produtos de panificação (YANG; SILVA, 1995).

2.5 Ultrafiltração

A ultrafiltração é uma tecnologia que tem sido utilizada nas indústrias de laticínios. Torna possível a melhoria da qualidade de tradicionais derivados do leite, para gerar novos alimentos que podem ser utilizados como produtos para a nutrição humana e como ingredientes à base de leite para ser usado em toda indústria de alimentos (ATRA et al., 2005).

Ultrafiltração pode ser definida como processo de pressão dirigida na membrana para separação de substâncias que tenham peso molecular entre 10^3 e 10^6 Da (como as proteínas). Os solventes e certos componentes solúveis passam por meio da membrana e são coletados como permeado. Dependendo das características da membrana aplicada, alguns componentes da solução são retidos e concentrados como fração retentada (ATRA et al., 2005).

A ultrafiltração do soro separa as proteínas, que ficam retidas no concentrado, da lactose e sais, que formam o permeado, o qual pode ser utilizado como meio de fermentação, pois, além de ter um grande teor de lactose, contém minerais e vitaminas (BRONSTEIN; MONTE ALEGRE, 1998).

O leite é um alimento complexo para separação por membranas, em virtude da distribuição de tamanho de partículas que variam de 1 nm a 20 μ m e sua alta concentração de componentes dispersos. O processo de separação por membrana para o leite apresenta baixa capacidade de separação em consequência do declínio do fluxo de filtração e da alta demanda de energia que é requerida para controlar o “fouling” (BRANS et al., 2004). “Fouling” é o resultado do aumento da concentração de solutos na superfície da membrana, do

entupimento de poros e, também, da adsorção de moléculas no material da membrana. Todos estes fatores contribuem para aumentar a resistência à transferência de massa por intermédio da membrana, quer seja pela redução da porosidade (entupimento, adsorção), quer seja pela polarização de concentração na superfície da membrana, em razão do acúmulo de solutos (VLADISAVLJEVI; VUKOSAVLJEVI; BUKVI, 2003). O processamento de soro representa um dos primeiros campos de aplicação de separação por membranas na indústria de laticínios e esta foi uma das pioneiras no desenvolvimento de equipamentos e técnicas de ultrafiltração (SOUZA, 2007).

Outro aspecto que não deve ser negligenciado é o aproveitamento da lactose que passa para o permeado resultante da ultrafiltração. Neste caso, novas tecnologias têm sido desenvolvidas (nanofiltração, osmose reversa) para concentração da lactose, que é usada na indústria de doces (REKTOR; VATAI, 2004).

2.6 Planejamento experimental

Consiste em um grupo de técnicas que um mínimo de ensaios pode produzir um máximo de informação, por meio de um valioso instrumento para redução de custos e tempo com o projeto. Estas técnicas, segundo Khuri e Cornell (1987), compreendem: montagem de planejamento com as variáveis e respectivos níveis, sob estudo e definição das respostas; determinação de um modelo matemático que melhor se ajuste aos dados experimentais, acompanhados por testes de hipóteses concernentes aos parâmetros do modelo; e, determinação dos níveis ótimos das variáveis que produzem o máximo ou mínimo valor na resposta.

Quando um pesquisador necessita desenvolver ou melhorar um processo, ou uma formulação de um produto, ele precisa planejar seus

experimentos para poder avaliar os efeitos de suas variáveis independentes ou fatores têm sobre a(s) resposta(s). A resolução deste problema pode ser feita, utilizando um planejamento experimental fatorial com um número menor de medidas e explorando todo o espaço experimental (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

REFERÊNCIAS

ANASTASIOU, R. et al. Changes in protein synthesis during thermal adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 301-314, May 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. Controle da poluição em indústria de queijo. **Leite e derivados**, São Paulo, n. 21, p. 64-65, mar./abr. 1995.

ATRA, R. et al. Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 67, n. 3, p. 325-332, Apr. 2005.

BELIN, J. M.; BENSOUSSAN, M.; SERRANO-CARREON, L. Microbial biosynthesis for the production of food flavours: review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 3, p.11-14, Jan. 1992.

BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4/7, p. 259-274, July 2001.

BRANS, G. et al. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 243, n. 1/2, p. 263-272, Nov. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº104, de 14 de maio de 1999. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes / aromas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 73, 17 maio 1999. Seção 1. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/104_99.htm>. Acesso em: 03 maio 2010.

BRONSTEIN, V.; MONTE ALEGRE, R. Estudo dos parâmetros da ultrafiltração de permeado de soro de queijo fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 93-9, jan./abr. 1998.

CARCANO, M. et al. Propionibacteria in Italian hard cheese. **Le Lait**, Paris, v. 4/5, n. 75, p. 415-426, May 1995.

CARVALHO, J. C. **Produção de diacetil e acetoína**: desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação dos fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetlactis*. 1999. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

CHOTANI, G. et al. The commercial production of chemicals using pathway engineering. **Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1543, n. 2, p. 434-455, Dec. 2000.

CHRISTEN, P.; MEZA, J. C.; REVAH, S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 8, p. 911-919, Aug. 1997.

COLOMBAN, A.; ROGER, L.; BOYAVAL, P. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 5, n. 42, p. 1091-1098, Nov. 1993.

CORAL, J. **Propionic acid production by *Propionibacterium sp.* using low-cost carbon sources in submerged fermentation**. 2008. 34 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COSTA, R. C. **Obtenção de lactose a partir de permeado de soro de queijo e permeado de leite.** 1995. 75 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

COSTELLI, M. C. **Cultivo de *Bacillus polymyxa* para a produção de acetoína: influência do pH e do tempo de cultivo do inóculo.** 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CROW, V. L. Utilization of lactate isomers by propionibacterium freudenreichii subsp. shermani: regulatory role for intracellular pyruvat. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, n. 2, p. 352-358, Aug. 1986.

DALLAS, P. O uso de derivados de soro em aplicações de produtos de consumo. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 8, n. 46, p. 48-50, maio/jun. 1999.

DATTA, R. et al. Technologic and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 2/3, p. 221-231, Feb. 1995.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi: study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 11, n. 4/6, p. 265-270, Jan. 2001.

EBNER, H.; SELLMER, S.; FOLLMANN, H. Acetic acid. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**. 2. ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft GmbH & Co, 1996. v. 6, chap. 12, p. 381-401.

FABRE, C. E. et al. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 17, n. 11, p. 1207-1212, Nov. 1995.

FERREIRA, C. L. de L. F. Relevância da utilização de soro e leite na indústria de laticínios. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 11, p. 39-40, set./out. 1997.

FESSLER, D. et al. Rapid identification of dairy propionibacterium species by restriction analysis of the insertion within the 23S rRNA gene. **Le Lait**, Paris, v. 78, n. 2, p. 203-216, 1998.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991. 304 p.

GOSWAMI, V.; SRIVASTAVA, A. K. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropioii*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 121-128, Jan. 2000.

HEATH, H. B. **Flavor technology**: profiles, products and applications. Connecticut: Westport Avi, 1978. chap. 7, p. 359-366.

HIMMI, E. H. et al. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin v. 53, n. 4, p. 435-440, Apr. 2000.

HUANG, Y. L. et al. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, n. 1, p. 51-59, Mar. 2002.

JAN, G. et al. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. **Cell Death and Differentiation**, United Kingdom, v. 9, n. 2, p. 179-188, Feb. 2002.

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms: review. **Process Biochemistry**, London, v. 27, n. 4, p. 195-215, July 1992.

JENSEN, J. M. et al. Effects of lactic and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. **Meat Science**, Barking, v. 63, n. 4, p. 50-508, Apr. 2003.

KIATPAPAN, P.; MUROOKA, Y. Genetic manipulation system in propionibacteria: review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 93, n. 1, p. 1-8, Jan. 2002.

KHURI, A. I.; CORNELL, A. **Response surfaces: designs and analyses**. New York: M. Dekker, 1987. 405 p.

KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of flavours and fragrances. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p. 1-8, Jan. 1998.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 115-131, June 2003.

MAISTRO, L. C.; DAMACENA, K.; FREIRE, M. I. Aromatização de queijos: um avanço da biotecnologia. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 37, p. 54-55, jan./fev. 2002.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 382-387, mar./abr. 2007.

MC DONOUGH, F. E. Whey solids utilization and salvage system. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 11, n. 1, p. 8-11, 1997.

MEDEIROS, A. B. P. et al. Coffee residues as substrates for aroma productions by *Ceratocystis Fimbriata* in solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 245-248, July/Sept. 2003.

MINAS GERAIS. Minas Ambiente. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Pesquisa tecnológica para controle ambiental em pequenos e médios laticínios de Minas Gerais**: estado da arte. Belo Horizonte, 1998. v. 1, 27 p.

MOURA, C. J. de M. **Controle de bactérias propiônicas em queijo tipo parmesão**: utilização de nitrato de sódio e sal (NaCl) na massa. 2001. 57 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

ORY, I.; ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 52, n. 1, p. 31-37, Mar. 2002.

PACHIONE, R. Aromas: setor investe em novos sabores e cresce à razão de 5% ao ano. **Revista Química e Derivados**, São Paulo, n. 424, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.quimica.com.br/revista/qd424/aromas1.htm>>. Acesso em: 12 jul. 2010.

PAIK, H. D.; GLATZ, B. A. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 22-27, Oct. 1994.

REKTOR, A.; VATAI, G. Membrane filtration of mozzarella whey. **Desalination**, Amsterdam, v. 162, p. 279-286, Mar. 2004.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional do soro láctico. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 2, n. 9, p. 67-69, maio/jun. 1997.

RODRIGUES, M. A.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

RUBEZ, J. O setor lácteo no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DO SETOR LÁCTEO, 1., 1998, Bueno Aires. **Anais...** Bueno Aires: Sociedade Rural Argentina, 1998. 12 p.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNER, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 193-198, Apr. 2005.

SHARPF, L. G. et al. Generation of flavor and odor compounds through fermentation process. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed). **Biogenesis of aromas**. Washington: American Chemistry Society, 1986. chap. 6, p. 323-346. (Symposium series, n. 317).

SHI, Y. et al. The recovery of acetic acid with sulfur dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 207-210, Feb. 2005.

SIQUEIRA, I. M. de C. Caracterização físico-química de quatro tipos de soro de queijo. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: RILCT, 2002. v. 57, p. 225-225.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, n. 1, p. 1-11, July 1996.

SOUZA, A. S. **Estudo do processo de microencapsulação por “sprayer-drier” de bioaroma produzido por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

TEIXEIRA, M. I. **Microencapsulação de aroma de queijo proveniente da fermentação do permeado de soro por *propionibacterium freudenreichii* aprisionada em alginato de cálcio**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, 2004.

THIERRY, A. et al. Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freundenreichii* Emmental cheese. **Food Chemistry**, London, v. 87, n. 3, p. 439-446, Sept. 2004.

TIMOFIECSYK, F. do R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos em indústria de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 221-235, jul./dez. 2000.

TOLKACH A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropetide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 67, n. 1/2, p. 13-20, Mar. 2005.

UNITES STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. **Manual de referência para produtos de soro dos Estados Unidos**. Arlington, 1997. 135 p.

VLADISAVLJEVI, G. T.; VUKOSAVLJEVI, P.; BUKVI, B. Permeate flux and fouling resistance in ultrafiltration of depectinized apple juice using ceramic membranes. **Journal of Food Engineering**, Essex, 60, n. 3, p. 241-247, Dec. 2003.

WHITEHEAD, I. M.; OHLEYER, E. P. Procédé de production microbiologique d'acides carboxyliques. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 2, p. 57-68, Feb. 1998.

WIKIPEDIA. **Ácido etanóico**. Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_etanoico>. Acesso em: 08 jan. 2010.

WOOD, H. G. Metabolic cycles in the fermentation by propionic acid bacteria. **Current Topics in Cellular Regulation**, New York, v. 18, p. 255-287, 1981.

YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, Nov. 1995.

YE, K. et al. Efficient production of vitamin B₁₂ from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved concentration. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 82, n. 5, p. 484-491, 1996.

CAPÍTULO 2

Influência da proporção de inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 na produção de ácidos orgânicos

RESUMO

A produção de bioaromas tem sido bastante estudada nos últimos anos em virtude do crescente interesse dos consumidores por produtos naturais. Para viabilizar sua produção, devem ser utilizados resíduos da indústria de alimentos, como por exemplo, o soro de queijo. Neste estudo foi avaliado o efeito da proporção de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 na fermentação de permeado de soro de queijo. Os experimentos foram conduzidos, usando-se permeado de soro filtrado, com proporções de 10 e 20% v/v de inóculo incubados a 30°C/6 dias. Foram determinados acidez total, pH e número total de células durante a fermentação. Para meio com 10% de inóculo, a acidez total aumentou de 0,1224 a 0,9491 g ác. totais/100 mL de amostra, a concentração celular aumentou de um ciclo logarítmico, após 48 horas e depois voltou para concentração próxima à do inóculo (entre 10^5 e 10^6 UFC/mL), enquanto que o pH diminuiu de 6,13 para 4,26. Para o meio com 20% v/v de inóculo, a acidez total aumentou de 0,1299 para 1,029 g ác. totais/100 mL de amostra e a concentração celular e pH apresentaram comportamentos semelhantes ao do primeiro tratamento. Pôde-se concluir que não houve efeito estatisticamente significativo da proporção de inóculo sobre parâmetros da fermentação.

Palavras-chave: Fermentação propiônica. Permeado de soro. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Proporção de inóculo.

ABSTRACT

The production of bioaromas has been extensively studied in recent years because of growing consumer interest in natural products. To make its production should be used waste in the food industry, for example, cheese whey. This study evaluated the effect of proportion of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 in the fermentation of chesse whey permeate. The experiments were conducted, using chesse whey permeate, filtered with 10 and 20% v/v inoculum incubated at 30°C/6 days. It was determined total acidity, pH and total number of cells during fermentation. For medium with 10% inoculums, the total acidity increased 0.1224 to 0.9491 g ac. total/100 mL de samples, cell concentration increased from one log cycle after 48 hours and then returned to close to the inoculum concentration (between 10^5 and 10^6 CFU/mL), while pH decreased from 6.13 to 4.26. For the medium with 20% v/v inoculum, the total acidity increased from 0.1299 to 1.029 g ac. totais/100 mL sample and cell concentration and pH showed similar to the first treatment. It was concluded that there was no statistically significant effect on the proportion of inoculum on fermentation parameters.

Keywords: Propionic fermentation. Chesse whey permeate. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Inoculum proportion.

1 INTRODUÇÃO

O soro é um subproduto da indústria laticinista, obtido pela coagulação do leite e redução do pH. Pode ser caracterizado como um líquido amarelo-esverdeado de sabor ácido ou doce, dependendo do tipo de coagulação a que o leite foi submetido. O soro de leite é constituído, basicamente, de água (93%) e somente 7% de matéria seca, da qual 71% de lactose, 10% proteína bruta (PB), 12% de gordura e 11% de minerais. O valor energético do soro é estimado em 80% de nutrientes digestíveis totais (NDT), na matéria seca (LIZIEIRE; CAMPOS, 2001).

A utilização de tecnologias limpas vem substituir o já ultrapassado conceito de controle da poluição, exigindo mudanças nos processos e produtos de forma a evitar a geração de resíduos. O princípio da tecnologia limpa tem como objetivo a satisfação das necessidades da sociedade por produtos que sejam fabricados com materiais e processos que não ofereçam risco à biodiversidade do planeta. Desta maneira, existe uma crescente preocupação para a redução do lançamento de resíduos industriais ao meio ambiente e economia no uso de materiais, água e energia (TRINDADE, 2002).

A fermentação da lactose por células de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 aprisionadas em alginato de cálcio (TEIXEIRA, 2004), ou livres (SOUZA, 2007), dão origem a ácidos graxos de cadeia curta, principais constituintes do aroma de queijo suíço, podendo ser uma interessante e valiosa aplicação em diversos produtos alimentícios, agregando maior valor ao permeado ultrafiltrado.

E este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da proporção de inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 na fermentação do permeado de soro.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima e microrganismo

O Soro ultrafiltrado (permeado de soro) foi doado pela empresa POLENGHI, situada em São Vicente de Minas, Minas Gerais.

O microrganismo, *Propionibacterium freudenreichi* PS-1, foi doado pela empresa Christian Hansen Indústria e Comércio.

2.2 Permeado de soro

O permeado de soro foi colocado em recipientes de plástico e transportado para o DCA-UFLA, onde foi imediatamente congelado, sendo posteriormente utilizado nos experimentos.

2.3 Preparação do permeado

Inicialmente foram feitas análises de acidez titulável, proteínas e pH (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC, 1998), além de lactose (Método de Antrona) (DISCHE, 1962) e gordura (butirômetro de Geber) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005), para a caracterização do permeado. Para a fermentação, o permeado de soro foi filtrado com papel filtro a vácuo para a retirada das micelas e homogeneização da matéria prima.

2.4 Obtenção da cultura e preparo do pré-inóculo

O microrganismo (*Propionibacterium freudenreichii* PS-1) liofilizado foi ativado em tubos de ensaio com o meio caldo lactato (MARCOUX et al.,

1992), o qual continha 1% de extrato de levedura (MERCK), 1% de peptona de carne (MERCK), 0,025% de K_2HPO_4 (MERCK) e 1% de lactato de sódio (MERCK), em temperatura de 30°C, por 3 dias em estufa microbiológica. A propagação foi feita em placas de Petri com meio ágar lactato, da mesma composição do caldo lactato, adicionado de 2% agar-agar (MERCK) e incubação a 30°C por 5 dias.

2.5 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo dos experimentos, três colônias, após confirmação de pureza (teste de catalase, morfologia e coloração de Gram), foram transferidas para tubos com 10 mL de caldo lactato e incubados a 30°C por 3 dias, em estufa microbiológica, sem agitação. Em seguida, o meio crescido foi transferido para cinco erlenmeyers com 100 mL de caldo lactato fresco cada (2% v/v de inóculo), que foram incubados a 30°C por 3 dias, em estufa microbiológica, sem agitação. Em seguida, transferiu-se o inóculo em concentração de 10% v/v para dois erlenmeyers e 20% v/v para dois erlenmeyers com 300 mL de permeado de soro filtrado esterilizados a 120°C/20 minutos.

2.6 Estudo cinético

Após inoculação, foram retiradas amostras nos tempos 0, 24, 48, 96, 120 e 144 horas, foram coletados 10 mL do permeado em tubos de centrífuga e 1 mL em eppendorfs, para cada amostra. O volume de 10 mL foi centrifugado a 1428 g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de ensaio com rosca e, posteriormente, congelado para análises de acidez total e pH. Para as amostras em eppendorfs, foram realizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-4} , e alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-2} e 10^{-4} foram plaqueadas em duplicatas, pela técnica

de *pour-plate* em meio ágar lactato e incubadas em estufa microbiológica a 30°C por 5 dias, sendo posteriormente feita a contagem.

2.7 Métodos analíticos

As análises listadas abaixo, com exceção da análise de ácidos carboxílicos, foram realizadas nos laboratórios de Laticínios, Bioquímica de Alimentos e Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA.

2.7.1 Acidez total

A acidez total foi determinada por titulometria, com hidróxido de sódio 0,1 N, segundo a metodologia da AOAC (1998). O método de determinação de acidez total consiste na neutralização dos ácidos totais presentes na amostra, pela base. A acidez total é expressa em percentual de ácidos totais (ácido propiônico, acético e láctico) (m/v), ou seja, g de ác. totais/100 mL da amostra.

2.7.2 pH

O pH foi determinado pela leitura direta do sobrenadante em potenciômetro digital de banca modelo FT-4011. A determinação foi feita segundo a metodologia da AOAC (1998).

2.7.3 Organismos viáveis

Para determinar o número de organismos viáveis, utilizou-se o método de plaqueamento por incorporação em ágar (*pour-plate*) e contagem de colônias.

O número de organismos viáveis foi determinado pela técnica de contagem total de células nas placas com diluição 10^{-4} . Como as placas apresentaram mais de 250 colônias, o resultado foi apresentado como contagem estimada (est) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001).

2.7.4 Determinação da lactose

As análises de lactose foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UFLA/DCA. A quantificação da lactose foi feita pelo método de Antrona, (DISCHE, 1962) que consiste na adição de 1 mL de amostra previamente diluída em 5 mL de reagente de antrona, seguido de aquecimento em banho-maria a 100 °C, durante 10 minutos. Depois de resfriado em banho de gelo foi feita leitura em espectrofotômetro (Cary 50 Probe UV-Visible) a 620 nm. A quantificação da concentração de lactose deu-se por comparação com curva padrão de lactose.

2.7.5 Determinação de teor de gordura

O método baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido dissolve as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, em decorrência da liberação de calor proveniente da reação, que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool isoamílico). A leitura é feita em escala graduada do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

2.7.6 Determinação de proteínas

Foi determinada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1998) que determina o N total da amostra que ao ser multiplicado pelo fator 6,25, mostra o valor em percentagem da proteína bruta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão representados os resultados referentes à caracterização do permeado de soro, antes da filtração, esterilização e fermentação. Foram feitas triplicatas e os resultados expressos em médias.

Tabela 1 Caracterização inicial do permeado de soro

Parâmetro	Média	Desvio Padrão
Acidez	0,90 g/L	0,05
pH	6,69	0,09
Proteínas	1,90 g	0,10
Gorduras	0,00%	0,00
Lactose	2,16%	0,00

O monitoramento da acidez total, pH e contagem de células, durante as 120 horas de avaliação do processo fermentativo, está representado nos Gráficos 1, 2 e 3, respectivamente.

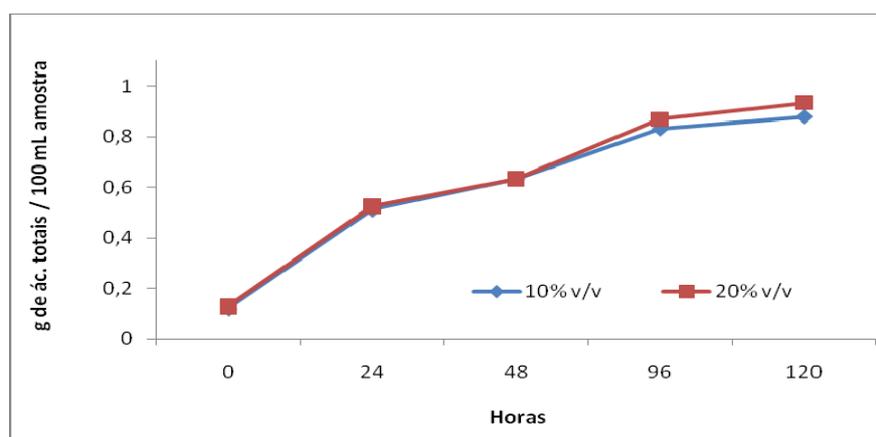


Gráfico 1 Resultados da acidez total (g de ác. totais/100 mL da amostra), para meios com permeado de soro com proporção de 10 e 20% v/v de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 como inóculo.

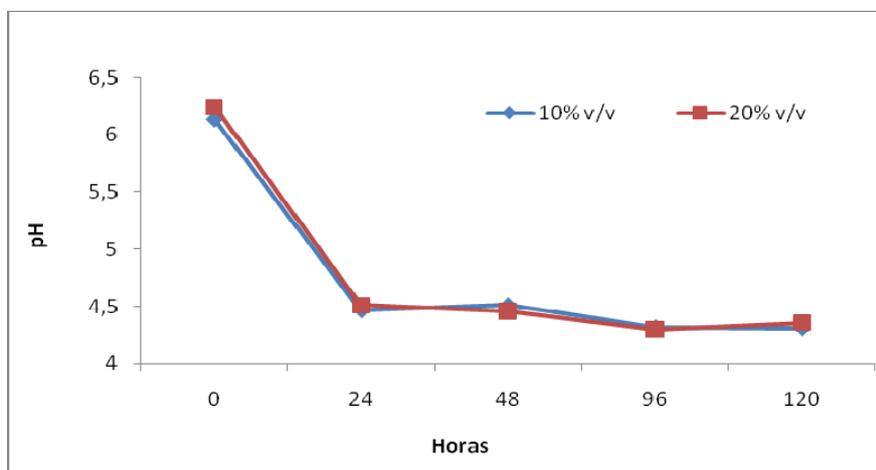


Gráfico 2 Resultados de pH, para os estudos cinéticos em meios com permeado de soro com proporção de 10 e 20% v/v de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 como inóculo.

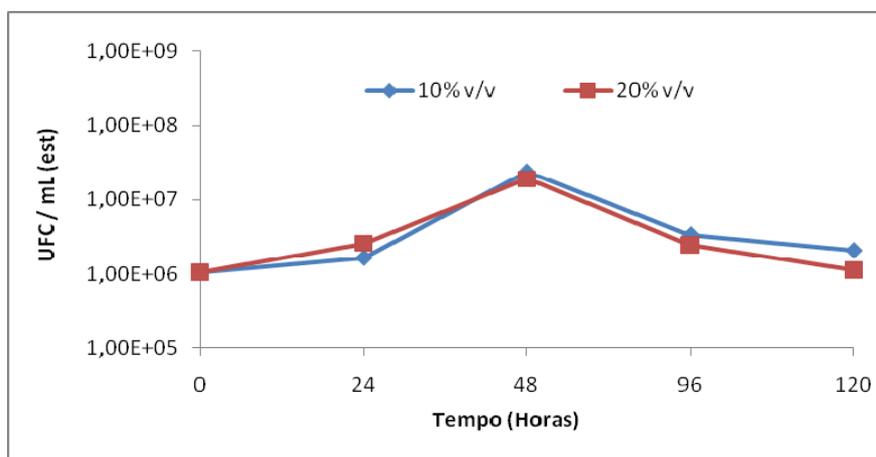


Gráfico 3 Contagem de células (UFC/mL (est)) para meios com permeado de soro com proporção de 10% e 20% v/v de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 como inóculo.

Pelos Gráficos 1 e 2, verificou-se que a fermentação foi estabelecida em cerca de 120 horas, uma vez que os valores de acidez total e pH não apresentaram mais variação. Tendo em vista a acidez total para ambas as concentrações celulares de 10% e 20% v/v, observou-se que um maior aumento ocorreu nas 24 horas iniciais (0,1224 a 0,5120 g ac.totais/100 mL de amostra, para 10% v/v; e 0,1299 a 0,5245 g ac.totais/100 ml de amostra, para 20% v/v). Isso, também, pode ser verificado pelo maior decréscimo de pH neste mesmo período (6,13 a 4,47 para concentração de 10% v/v; e 6,24 a 4,51 para concentração de 20% v/v). Portanto, o decréscimo de pH acompanhou a produção de ácidos totais.

Com relação à fermentação, o parâmetro mais importante para o cultivo de bactérias lácticas é o pH do meio de fermentação (KASCAK; KOMINEK; ROEHR, 1996). De acordo com Anderson et al. (1986), *Propionibacterium shermanii* cresce vagorosamente comparada com outras bactérias e preferem pH neutro e temperaturas mesofílicas. O pH ótimo de crescimento está na faixa de 6,5 a 7,0. O pH igual a 5,0 é o ponto crítico e em valores de pH abaixo deste, há perda de viabilidade (BERESFORD et al., 2001).

Em relação à contagem celular, nas duas concentrações, o maior aumento de células ocorreu no período de 24 a 48 horas, após o início da fermentação, tendo uma elevação próxima de um ciclo log, mas houve diminuição no período de 48 a 120 h, voltando-se, praticamente, à mesma concentração inicial ao final de 120 horas. Hendricks, Korus e Heimsch (1986) observaram que, em culturas de *Propionibacterium freudenreichii*, a síntese de ácido propiônico ocorreu na fase estacionária de crescimento. O ácido propiônico tem demonstrado ter um forte efeito inibitório sobre o organismo, com a formação de ácido não-dissociado, sendo este responsável pela maior parte do efeito inibitório (CARRODO; CRESPO; MOURA, 1988).

De acordo com o teste de Tukey (Tabela 1A) (APÊNDICE A), não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a acidez total, contagem de células e pH, em relação aos tratamentos utilizados (concentrações de 10% e 20% v/v), escolhendo-se, deste modo, a concentração de inóculo de 10% v/v para produção do bioaroma.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados, as proporções de inóculo nos níveis estudados não afetaram, significativamente, a produção dos ácidos totais, indicando que a concentração de 10% v/v é adequada para iniciar a fermentação de permeado de soro.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, T. M. et al. Inhibitory effect of autoclaving whey-based medium on propionic acid production by *propionibacterium shermanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 2, p. 427-428, Feb. 1986.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1998. 1141 p.

BERESFORD, T. P. et al. Recente advances in chesse microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4/7, p. 259-274, July 2001.

CARRODO, M. J.; CRESPO, J. P. S. S. G.; MOURA, M. J. Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium acidipropionici*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 17, n. 1/3, p. 295-312, Apr. 1988.

DISCHE, Z. General color reaction. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. chap. 24, p. 477-512.

HENDRICKS, B.; KORUS, R. A.; HEIMSCH, R. C. Propionic acid production by bacterial fermentation. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, v. 15, p. 241-245, Feb. 1986.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicoquímicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2005. 1018 p.

KASCAK, J. S.; KOMINEK, J.; ROEHR, M. Lactic acid. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**. 2. ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft GmbH & Co, 1996. v. 6, chap. 8, p. 293-306.

LIZIEIRI, R. S.; CAMPOS, O. F. **Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite**: instrução técnica para os produtos de leite. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de leite, 2001. Folder.

MARCOUX, V. et al. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 14, n. 2, p. 95-99, 1992.

SOUZA, A. S. **Estudo do processo de microencapsulação por “sprayer-drier” de bioaroma produzido por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L. E.; HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap. 6, p. 53-67.

TEIXEIRA, M. I. **Microencapsulação de aroma de queijo proveniente da fermentação do permeado de soro por *propionibacterium freudenreichii* aprisionada em alginato de cálcio**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

TRINDADE, M. C. **Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do sor de queijo pela técnica de membranas líquidas surfetactantes**. 2002. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

CAPÍTULO 3

Avaliação dos efeitos da temperatura e do teor de sólidos solúveis sobre a produção de ácido acético e propiônico por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1

RESUMO

O soro de leite é o subproduto principal da indústria de laticínios. Em função de seu elevado poder poluente, em virtude de seu alto DBO e da dificuldade de sua eliminação, pesquisas têm sido desenvolvidas, a fim de que se busquem alternativas para o aproveitamento dos componentes do soro, como a lactose e do permeado de soro. Ao longo dos anos, os rendimentos e produtividade dos processos têm sido continuamente melhorados (uso de novas configurações de biorreatores, de meios de cultura mais adequados e da seleção de células mais produtivas, desenvolvimentos nas áreas de informática e biologia molecular). A fermentação da lactose pela bactéria láctica *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii* dá origem a ácidos graxos de cadeia curta, dentre os principais, acético e propiônico, que são responsáveis pelo aroma de queijo suíço. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a influência da temperatura e teor de sólidos solúveis na produção de ácidos, acético e propiônico, produzidos por processo fermentativo em batelada, utilizando células livres de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Foram utilizados para todos os ensaios concentração de inóculo de 10% v/v. Os experimentos foram conduzidos, variando os teores de sólidos solúveis em 2,95 a 17,05°Brix, e temperaturas de 25,8 a 34,2°C no processo fermentativo, por 144 horas, totalizando 11 ensaios. O melhor resultado obtido para ácido acético foi utilizando concentrações de 10°Brix e temperatura de 30°C, obtendo-se valor de 0,870 g ác. acét./L. Para a produção de ácido propiônico, o ensaio de melhor resultado, foi obtido utilizando 10°Brix e temperatura de 34,2°C, com valor de 6,402 g ác. prop./L. Em relação ao rendimento do ácido acético e propiônico, os melhores resultados foram obtidos, utilizando 5°Brix e temperatura de 33°C, com valores de 0,445 g ác. acét./g ác. láctico e 2,724 g ác. prop./g ác. láctico, respectivamente. Concluindo, as melhores condições para formação de ácido propiônico e ácido acético neste trabalho foram com teor de sólidos solúveis de 10°Brix no meio de fermentação e temperatura entre 30 e 34°C.

Palavras-chave: Ácido acético. Ácido propiônico. Temperatura. Sólidos solúveis.

ABSTRACT

Whey is the main byproduct of the dairy product industry. Due to its high polluting power, because of its high BOD and the difficulty of their removal, research has been undertaken in order in search for alternatives to the use of serum components, such as lactose and whey permeate. Over the years, the income and productivity of the processes have been continuously improved (use of new configurations of bioreactors, culture media and most appropriate selection of cells more productive, developments in computer science and molecular biology). The fermentation of lactose by lactic bacterium *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* gives rise to short-chain fatty acids, among the main, acetic and propionic, which are responsible for the aroma of Swiss cheese. Aroma and flavor are important points to evaluate by consumers who want to come from a quality product. This work was to study the influence of temperature and soluble solids in the production of acids, acetic and propionic, produced by fermentation in batch, using free cells of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Were used for all assays of inoculum concentration of 10% v/v. The experiments were conducted with varying levels of soluble solids from 2,95 to 17,05°Brix and temperatures from 25,8 to 34,2°C in the fermentation process, for 144 hours, totaling 11 trials. The best result obtained for acetic acid concentrations was using 10°Brix and 30°C, obtaining value of 0.870 g ac. acetic/L. For the production of propionic acid, the best test result was obtained using 10°Brix and temperature of 34,2°C, with a value of 6.402 g ac. prop./L. Regarding the yield of acetic and propionic acid, the best results were obtained, using 5°Brix and temperature of 33°C, with values of 0.445 g ac. acetic/g ac. latic and 2.724 g ac. prop./g ac. latic, respectively. In conclusion, the best conditions for the formation of propionic acid and acetic acid in this study was to soluble solids level content of 10°Brix in the fermentation medium and temperature between 30 and 34°C.

Keywords: Acetic acid. Propionic acid. Temperature. Soluble solids.

1 INTRODUÇÃO

Apesar do ser humano se beneficiar da ação de microrganismos há milhares de anos antes de Cristo, principalmente na produção de alimentos e bebidas, foi somente por volta de 1857 que Louis Pasteur demonstrou o papel destes seres microscópicos nos chamados processos fermentativos. Importantes desenvolvimentos nas áreas de engenharia, bioquímica e microbiologia (transferência de oxigênio, ampliação de escala e elaboração de meios de cultura, entre outros) têm permitido a implementação de processos fermentativos em escala industrial para a produção de vários produtos de interesse comercial (enzimas, antibióticos, solventes orgânicos, vitaminas e aminoácidos, entre outros) (CARVALHO et al., 2005).

O soro de queijo ou soro de leite é o líquido resultante da coagulação do leite durante a elaboração do queijo. O potencial poluidor deste subproduto (DBO = 30000 – 50000 ppm) é aproximadamente 100 vezes maior que o do esgoto doméstico. Porém, pelo alto custo de implantação, a instalação de uma planta de tratamento biológico de soro, muitas vezes torna-se inviável para a maioria das indústrias de laticínios. Conseqüentemente, grande parte do soro de queijo produzido em diversas partes do mundo, ainda, é incorporada às águas residuais dos laticínios, sendo a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor (MARWAHA; KENNEDY, 1988).

Para atender às legislações ambientais, as indústrias têm buscado alternativas para seu aproveitamento em vez do descarte. As proteínas contidas no soro, por exemplo, podem ser separadas por ultrafiltração e utilizadas como suplemento alimentar ou como matéria-prima para a fabricação de produtos nutricionais. Entretanto, a recuperação das proteínas pouco contribui para a diminuição da carga poluente do soro, formada, principalmente, pela lactose presente no permeado (MAWSON, 1994).

Observando-se que a lactose é responsável pela alta demanda biológica de oxigênio, diversos processos fermentativos têm sido propostos como alternativa para reduzir o problema de desperdício e disposição do soro de queijo. Tanto o soro quanto o permeado de soro (subproduto da produção de proteínas do soro) ou a lactose podem ser utilizados diretamente como substrato para o crescimento microbiano visando à obtenção de produtos de maior valor agregado, tais como: proteínas unicelulares, álcoois (etanol, butanol), ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e cítrico), vitaminas e biopolímeros (goma xantana) (YANG; SILVA, 1995).

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito da temperatura e teor de sólidos solúveis sobre a produção de ácidos acético e propiônico durante a fermentação de permeado de soro lácteo por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima e microrganismo

O soro ultrafiltrado (permeado de soro) foi doado pela empresa POLENGHI, situada em São Vicente de Minas, Minas Gerais.

O microrganismo, *Propionibacterium freudenreichi* PS-1, foi doado pela empresa Christian Hansen Indústria e Comércio.

2.2 Permeado de soro

O permeado de soro foi colocado em recipientes de plástico e transportado para o DCA-UFLA, onde foi imediatamente congelado, sendo, posteriormente, utilizado nos experimentos.

2.2.1 Preparação do permeado

O permeado de soro foi filtrado para a retirada das micelas e homogeneização da matéria-prima. O pH do permeado filtrado foi ajustado a 7,0 com NaOH 0,2 N antes da autoclavagem. Paralelamente, foram retiradas alíquotas do permeado para sua caracterização química. Foram realizadas três análises de acidez titulável, proteínas, cinzas, sólidos totais e pH (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC, 1998), lactose (método de Antrona) (DISCHE, 1962) e gordura (butirômetro de Geber) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005), para a caracterização do permeado, sendo todas as análises realizadas em triplicata.

2.2.2 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (expresso em °Brix), do permeado de soro foi ajustado (de acordo com a Tabela 1) utilizando lactose MESH 100 p.a (Alibra).

2.3 Meios de cultura e condições de crescimento

A ativação da cultura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 foi realizada em caldo lactato (MARCOUX et al., 1992), contendo 1% m/v de extrato de levedura (MERCK), 1% m/v de peptona de carne (MERCK), 0,025% m/v de K₂HPO₄ (MERCK) e 1% v/v de lactato de sódio (MERCK). A preservação da cultura foi feita em agar lactato da mesma composição do caldo lactato, adicionado de 2% de Ágar-Ágar (MERCK), coberto de glicerol previamente esterilizado e armazenado a 4°C. Meios de crescimento e manutenção da cultura foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

2.4 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo dos experimentos, uma pequena porção da cultura (10⁸ UFC/mL) foi inoculada em 10 mL de caldo lactato e incubada a 30° C, durante três dias, sem agitação. Repicagens de 1% de v/v foram feitas em erlenmeyers contendo 100 mL de caldo lactato autoclavado (121°C/15 min), e incubada a 30° C, durante três dias, antes de o inóculo ser usado nas fermentações.

Após estes seis dias, os experimentos de fermentação foram iniciados, com concentração de inóculo 10% v/v, dando início à fermentação, em erlenmeyers com 250 mL de permeado de soro esterilizado.

2.5 Fermentação do permeado

A fermentação foi conduzida em erlenmeyers, que foram incubados após inoculação em estufa microbiológica, durante 144 horas, sem agitação e usada uma concentração de inóculo de 10 % v/v, conforme determinado no capítulo 2. O pH do meio, contendo permeado de soro de queijo, foi ajustado para 7 com NaOH 0,2 N. Os meios foram autoclavados a uma temperatura de 121°C e pressão de 1kgf/cm² durante 15 minutos e resfriados naturalmente a 30°C. Em seguida, o inóculo preparado como citado no item 2.4 foi adicionado aos meios de cultura.

2.6 Planejamento experimental

Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo os ensaios realizados de acordo com o fatorial 2² completo, com 4 pontos fatoriais (níveis ±1), triplicata no ponto central (nível 0) e 4 pontos axiais (±1,41) totalizando 11 ensaios. Os fatores avaliados foram temperatura e teor de sólidos solúveis do meio de cultivo (Tabela 1), conforme metodologia preconizada por Barros Neto, Scarmino e Bruns (1996). As variáveis respostas foram os teores de ácidos carboxílicos (acético, propiônico e láctico) produzidos e os rendimentos dos ácidos propiônico e acético. Posterior à execução do experimento, procedeu-se à análise estatística por meio da metodologia de superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 1996). Foram avaliados os efeitos das variáveis dependentes sob modelos lineares e quadráticos, bem como a qualidade do ajuste do modelo e sua representação gráfica por meio de um gráfico bidimensional ou tridimensional, utilizando pacote estatístico Statistica v.8.0.

Tabela 1 Planejamento Experimental

Ensaio	X1 (^o Brix)		X2 (Temperatura)	
	Codif. (x1)	Real*	Codif. (x2)	Real
1	-1	5	-1	27
2	1	15	-1	27
3	-1	5	1	33
4	1	15	1	33
5	-1,41	2,95	0	30
6	1,41	17,05	0	30
7	0	10	-1,41	25,8
8	0	10	1,41	34,2
9	0	10	0	30
10	0	10	0	30
11	0	10	0	30

2.7 Estudo cinético

Nos tempos 0, 24, 48, 96, 120 e 144 horas, foram coletadas amostras de 10 mL do permeado fermentado em tubos de centrífuga e 1 mL em eppendorfs, para todas três repetições de cada ensaio (Tabela 1). O volume de 10 mL foi centrifugado a 3000 rpm (1428 g) por 25 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de ensaio com rosca e, posteriormente, congelado para análises de acidez total, lactose e pH. Para as amostras em eppendorfs, foram realizadas diluições de 10^{-6} a 10^{-7} , e alíquotas de 0,1 mL das diluições eram plaqueadas, pela técnica de “*spread-plate*” em meio ágar lactato e incubadas em jarras de anaerobiose, a 30°C por 5 dias.

2.8 Métodos analíticos

As análises listadas abaixo, com exceção da análise de ácidos carboxílicos, foram realizadas nos laboratórios de Laticínios, Bioquímica de

Alimentos e Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA.

2.8.1 Pureza da cultura

Anteriormente à inoculação da *P. freudenreichii* PS-1, no meio fermentativo, foram realizados testes para a confirmação da pureza da cultura, verificando a morfologia das células, usando microscópio ótico, a morfologia das colônias nas placas com o auxílio de lupa, teste da catalase e o da coloração de Gram (TEIXEIRA, 2004).

2.8.2 Organismos viáveis

Para determinar o número de organismos viáveis, durante o processo fermentativo, foi utilizado o método de plaqueamento por superfície (*spread-plate*) em meio ágar lactato e contagem de colônias. O número de organismos viáveis foi determinado pela técnica de contagem total de células nas placas de diluição 10^{-6} e 10^{-7} e com número de colônias entre 25 e 250 (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001).

2.8.3 Determinação dos ácidos carboxílicos (acético, propiônico e láctico)

As análises dos ácidos carboxílicos (ácido propiônico, ácido acético e ácido láctico), no fermentado, foram realizadas no Laboratório de Cromatografia (DBI/UFLA), utilizando High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu, modelo LC-10Ai; Shimadzu Corp., Japan), equipado com um sistema de detecção duplo, com detector UV e um detector de índice de refração (RID-10^a SPD-10Ai). Uma

coluna de exclusão iônica Shimadzu (Shim-pack SCR-101H, 7,9 mm x 30 cm), operada a uma temperatura de 50°C, foi usada para alcançar separação cromatográfica. Antes da injeção, as amostras foram filtradas em membranas GV (DURAPORE) de PVDF (fluoreto de polivinilideno), com 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro. Os ácidos hidrossolúveis foram eluídos com 100 mM de ácido perclórico numa taxa de fluxo de 0,8 mL/min. Os ácidos foram detectados via UV (absorbância de 210 nm) e RI. Os ácidos foram identificados e suas concentrações determinadas por comparação com tempos de retenção e amostras de padrões. Todas as amostras foram examinadas em triplicatas, e o coeficiente de variação foi menos de 5% em cada caso.

2.8.4 Determinação da lactose

As análises de lactose foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UFLA/DCA. A quantificação da lactose foi feita pelo método de Antrona, (DISCHE, 1962) que consiste na adição de 1 mL de amostra, previamente diluída em 5 mL de reagente de antrona, seguido de aquecimento em banho-maria a 100 °C, durante 10 minutos. Depois de resfriado em banho de gelo foi feita leitura em espectrofotômetro (Cary 50 Probe UV-Visible) a 620 nm. A quantificação da concentração de lactose deu-se por comparação com curva padrão de lactose.

2.8.5 pH

O pH foi determinado pela leitura direta do sobrenadante em potenciômetro digital de bancada modelo FT-4011 calibrado previamente com solução-tampão de pH 4,0 e 7,0 (AOAC, 1998).

2.8.6 Acidez titulável

A acidez total foi determinada por titulometria, com hidróxido de sódio 0,1 N, segundo a metodologia da AOAC (1998). O método de determinação de acidez total consiste na neutralização dos ácidos totais presentes na amostra, pela base. A acidez total é expressa em percentual de ácido láctico (ácido propiônico, acético e láctico) (m/v ou m/m), ou seja, g de ác. láctico/100 mL da amostra.

2.8.7 Determinação de teor de gordura

O método baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido dissolve as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, em decorrência liberação de calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool isoamílico). A leitura é feita em escala graduada do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

2.8.8 Determinação de sólidos solúveis totais

Foi determinado pelo método gravimétrico, onde a secagem da amostra foi conduzida em estufa (6 a 18 horas, a 55°C ou até peso constante) (AOAC, 1998) e pela leitura direta em refratômetro portátil para açúcar RT 30-ATC Instrutherm, para comparação dos resultados.

2.8.9 Determinação de cinzas

Após a dessecação, a amostra foi submetida à incineração (aproximadamente 550°C). Dessa forma a fração orgânica da amostra volatiliza-se, sob a forma de dióxido de carbono e água, permanecendo as cinzas no recipiente, que são uma estimativa do teor de minerais da amostra (AOAC, 1998).

2.8.10 Determinação de proteínas

Foi determinada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1998) que origina o N total da amostra o qual, ao ser multiplicado pelo fator 6,25, mostra o valor em percentagem da proteína bruta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Análises de caracterização do permeado de soro

Os resultados com os valores médios das análises de caracterização do permeado de soro, após filtração a vácuo, são encontrados na Tabela 2.

Tabela 2 Composição média do permeado de soro não fermentado

Componente	Composição Média
Lactose	3,43%
Proteína	0,013%
pH	6,17
Acidez Titulável	0,9 g/L
Sólidos Totais	4,09%
°Brix	4
Cinzas	0,182%
Gordura	0,00%

Teixeira (2004) caracterizou amostras de permeado de soro de queijo mussarela, obtendo valores de 4,02%, 0,063%; 6,20; 11°D; 5,08%; 0,38% e 0,39%, para lactose, proteína, pH, acidez, sólidos totais, cinzas e gordura, respectivamente.

Cunha et al. (2002), ao realizarem a caracterização de permeado de leite desnatado pasteurizado, teve como resultados para lactose, proteína, sólidos totais, cinzas e gordura, valores de 4,5%; 0,36%, 5,30%; 0,44% e 0,0%.

Domingues, Lima e Teixeira. (1999), em seu trabalho, obtiveram como resultados, para as análises de lactose, proteína, sólidos totais, cinzas e gordura,

na caracterização de soro de queijo, valores iguais a 4,66%; 0,02%; 5,4%; 0,50% e 0,0%.

Considerando que o permeado de soro pode ser proveniente de vários processos (tipo de queijo), utilizando diferentes tipos de leite (desnatado ou integral), os resultados não variaram muito, independentes do tipo de permeado obtido e caracterizado, ou seja, de maneira geral, o permeado de soro lácteo, apresenta teor de lactose entre 3 – 5%, sólidos totais entre 4 – 5,5%, cinzas entre 0,15 – 0,50% e gorduras com valor máximo de 0,4%. O teor de proteína apresentou maior variação, de valores entre 0,01 – 0,4%. Com relação a sólidos totais, as duas metodologias utilizadas apresentaram resultados semelhantes. Com relação à quantidade de ácidos totais presente, é equivalente a uma concentração de 0,9 g/L.

3.2 Estudo cinético

Na fermentação de permeado de soro, para a produção de bioaromas por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, parâmetros ambientais foram variados com o objetivo de avaliar seus efeitos sobre a produção de ácidos orgânicos por células livres em permeado de soro suplementado.

Os resultados expressos são resultantes da média de triplicatas para cada amostra e tempo.

3.2.1 Sistema fermentativo

Depois de 144 horas de fermentação, para cada ensaio, foi calculada a produção de ácidos (produção no tempo final – produção no tempo inicial) de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 Produção de ácidos totais para cada ensaio (Tabela 1)

Ensaio	°Brix	Temperatura (°C)	Produção de Ácidos Totais (g ác.lático/100 mL amostra)
1	5	27	0,5700
2	15	27	0,5775
3	5	33	0,4950
4	15	33	0,6600
5	2,95	30	0,6375
6	17,05	30	0,6225
7	10	25,8	0,4875
8	10	34,2	0,6150
9	10	30	0,6850
10	10	30	0,6970
11	10	30	0,6880

De acordo com os dados, a maior produção de ácidos ocorreu nos ensaios 9, 10 e 11, que correspondem a um teor de sólidos solúveis de 10°Brix e temperatura de fermentação de 30°C.

Teixeira (2004) observou que a produção de ácidos orgânicos no sistema de aprisionamento de células foi equivalente ao sistema livre, quando o inóculo em ambos os sistemas foram correspondentes.

No Gráfico 1, é apresentado o comportamento do pH do meio de fermentação durante cada ensaio. O pH inicial era de $7,00 \pm 0,10$.

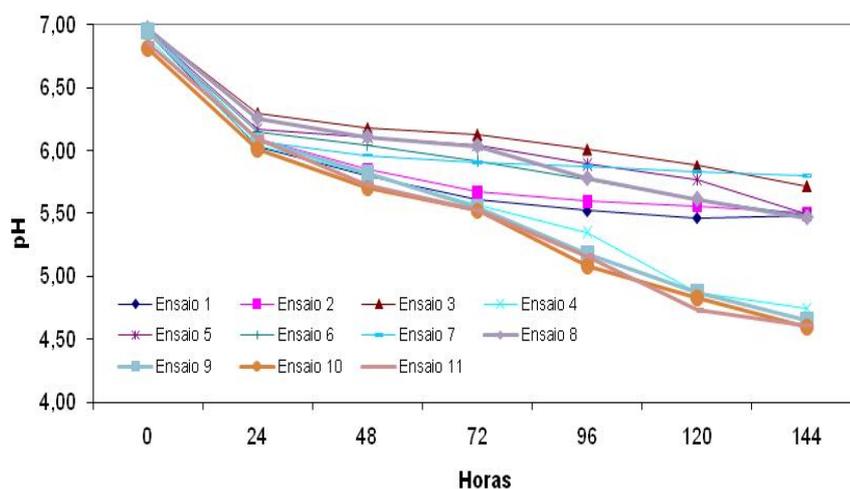


Gráfico 1 Variação de pH do meio fermentado ao longo do tempo de fermentação

No Gráfico 1, pode ser observado que os menores valores de pH ocorreram nos ensaios 9, 10 e 11, com parâmetros de concentração do meio e temperatura de 10°Brix e 30°C, e no ensaio 4, com 15°Brix e 33°C, respectivamente.

Em todos os ensaios o decréscimo de pH acompanhou a produção dos ácidos orgânicos.

Lewis e Yang (1992), ao promoverem a fermentação soro, tendo a lactose como substrato, observaram que a taxa de crescimento específico do microrganismo *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, diminuía à medida que o pH do meio, também, diminuía, tendo seu pH ótimo com valor aproximado a 7,0.

Para o consumo de lactose, foi calculada a percentagem deste consumo [(concentração inicial - concentração final /concentração inicial) x 100)] de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4 Consumo de lactose (em %) durante o processo fermentativo

Ensaio	°Brix	Temperatura (°C)	% Consumo de Lactose
1	5	27	43,06
2	15	27	37,18
3	5	33	56,22
4	15	33	36,46
5	2,95	30	53,72
6	17,05	30	57,04
7	10	25,8	54,90
8	10	34,2	52,65
9	10	30	48,12
10	10	30	46,98
11	10	30	46,41

O consumo de lactose, ao final das fermentações, variou de 36,46% a 57,04%, tendo um consumo médio para os ensaios de 50,87% da concentração inicial de lactose. O maior consumo de lactose ocorreu no ensaio 6 (17,05°Brix/30°C).

Quando se comparam os ensaios, com temperatura de fermentação de 30°C, sendo eles, 5, 6 e 9 a 11, observa-se que a maior produção de ácidos totais ocorreu quando a concentração estava em 10°Brix (Tabela 3). Neste mesmo ensaio (9 a 11), o decréscimo de pH foi o mais acentuado e o consumo de lactose médio foi de 47,17%.

Teixeira (2004), ao promover a fermentação de permeado de soro a 30°C, utilizando *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, observou que, ao final das fermentações, houve um consumo de lactose 50%, com exceção das bateladas em queda houve maiores produções de ácido lático no início da fermentação e logo após seu consumo.

No Gráfico 2, é ilustrado o crescimento celular, durante o processo de fermentação do permeado de soro, considerando os tempos 0, 72 e 144 horas.

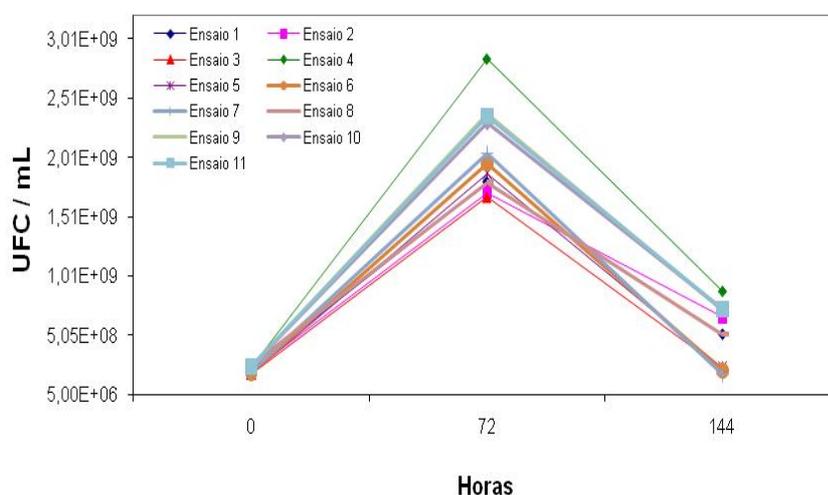


Gráfico 2 Crescimento celular da *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, de acordo com ensaio da Tabela 1

Nota-se ao longo do experimento, que a concentração inicial de inóculo, para todos os ensaios, foi equivalente, variando de $1,73 \times 10^8$ a $2,39 \times 10^8$ UFC/mL. No tempo 72 horas, em todos os ensaios, a contagem era de um ciclo log a mais em relação à contagem inicial, mas no final, as concentrações de inóculo caíram e atingiram valores próximos ao do inóculo. Foi calculado o fator de crescimento ((relação entre concentração final (Xf) e inicial (Xo)) e seus valores estão apresentados na Tabela 5. Verifica-se pouca variação entre a

concentração final e inicial, chegando-se a valores para o fator de crescimento entre 0,992 a 1,069, mostrando pouca variação na concentração de inóculo inicial e final da fermentação.

Tabela 5 Fator de crescimento celular, durante a fermentação, considerando o tempo 0 e 144 horas

Ensaio	°Brix	Temperatura (°C)	Fator de crescimento celular (X_f/X_o)
1	5	27	1,061
2	15	27	1,044
3	5	33	1,069
4	15	33	1,057
5	2,95	30	1,016
6	17,05	30	1,006
7	10	25,8	1,012
8	10	34,2	0,992
9	10	30	1,037
10	10	30	1,037
11	10	30	1,037

A queda de número de microrganismos, pós 72 horas de fermentação, pode ser em virtude do fato de que ácido propiônico é conhecido por inibir a fermentação propiônica. Lewis e Yang (1992) observaram que, em todos os valores de pH estudados, o coeficiente de crescimento da bactéria propiônica cai drasticamente com um aumento da concentração de propionato.

Ao fermentar permeado de soro de queijo por 72 horas, Teixeira (2004) observou que houve crescimento decimal, tanto para células livres (9,29 a 10,31 n° log.mL⁻¹), quanto para células aprisionadas (10,10 a 11,40 n° log.mL⁻¹), para um valor próximo de 4°Brix para o permeado, a uma temperatura de 30°C. Contudo, no final do processo, observa-se que houve morte celular, pois, há um decréscimo na contagem.

El-Hagarawy, Slatter e Harper (1957), estudando parâmetros da fermentação por 10 diferentes cepas de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, em meio especial preparado pela substituição de vários compostos de lactose no meio caldo básico (1,0% peptona de carne; 1,0% triptona, 0,5% lactose; 0,5% extrato de levedura) e incubadas a 30°C, enfatizam o fato de que não há relação entre número de bactérias e produção de ácido, estando de acordo com os dados deste experimento.

3.3 Parâmetros cinéticos

A matriz com os resultados obtidos para as variáveis dependentes: rendimento em produção dos ácidos em relação ao consumo de ácido láctico (Yp/s) e produção de ácidos (acético e propiônico, para cada ensaio realizado, é apresentado na Tabela 6. A produção de ácidos foi calculada considerando a diferença entre a concentração final e inicial de cada um deles.

Tabela 6 Ensaio e respostas para as variáveis: produção de ácido acético (Paac.) e propiônico (Papp.); e rendimento dos ácidos acético (Yaac.) e propiônico (Yapp.), ambos em relação ao consumo de ácido láctico

Ensaio	Conc. (°Brix) x_1	T (°C) x_2	Paac. (g/L)	Papp. (g/L)	Yaac. (g/g)	Yapp. (g/g)
1	-1 (10)	-1 (27)	0,667	4,904	0,230	1,687
2	1 (15)	-1 (27)	0,528	4,465	0,212	1,789
3	-1 (5)	1 (33)	0,629	3,853	0,445	2,724
4	1 (15)	1 (33)	0,649	4,788	0,149	1,100
5	-1,41 (2,95)	0 (30)	0,846	5,086	0,425	2,556
6	1,41 (17,05)	0 (30)	0,733	4,887	0,358	2,387
7		-1,41 (25,8)	0,309	1,620	0,214	1,123
8		1,41 (34,2)	0,689	6,402	0,302	2,809
9	0 (10)	0 (30)	0,891	5,033	0,190	1,071
10	0 (10)	0 (30)	0,920	5,736	0,184	1,147
11	0 (10)	0 (30)	0,798	4,357	0,172	0,941

Considerando a grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem fermentação e microrganismos, foram considerados parâmetros significativos com p-valores menores que 10% ($p \leq 0,10$).

3.3.1 Produção de ácido acético

De acordo com os resultados do planejamento, apenas os termos linear e quadrático da temperatura apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a produção de ácido acético ($p \leq 0,10$), cujos termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q (Tabela 7).

Tabela 7 Efeito das variáveis na produção de ácido acético

	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de Conf. -90%	Lim. de Conf. +90%	Coef.
Mean/ Interc.	0,870	0,049	17,921	0,000	0,772	0,967	0,870
Conc. (L)	-0,070	0,060	-1,174	0,293	-0,190	0,050	-0,035
Conc. (Q)	-0,093	0,071	-1,311	0,247	-0,236	0,050	-0,047
Temp. (L)	0,155	0,060	2,610	0,048	0,035	0,275	0,078
Temp. (Q)	-0,385	0,071	-5,423	0,003	-0,528	-0,242	-0,193
1L by 2L	0,080	0,084	0,948	0,387	-0,090	0,249	0,040

Considerando somente os parâmetros significativos (Tabela 7), foram obtidos os coeficientes de regressão (Tabela 8).

Tabela 8 Coeficientes de regressão para a resposta de produção de ácido acético

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(8)	p-valor
Média	0,826	0,037	22,044	0,000
x ₂ (L)	0,078	0,032	2,462	0,039
x ₂ (Q)	-0,179	0,036	-4,970	0,001

L – termos lineares; Q – termos quadráticos

Os resultados do cálculo da análise de variância (ANOVA) são apresentados na Tabela 9. Como o $F_{\text{calculado}}$ (15,38) foi maior que o F_{tabela} (4,46), ao nível de significância de 5%, e como R^2 igual a 0,794, pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais. O modelo com as variáveis codificadas para a produção de ácido acético em g/L (Paac), é apresentado na Equação 1.

$$\text{Paac} = 0,826 + 0,078 * x_2 - 0,179 * x_2^2 \quad (1)$$

Tabela 9 ANOVA do modelo quadrático para predição da produção de ácido acético

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Regressão	0,24	2	0,12	15,38	0,0018
Resíduos	0,06	8	0,008		
Total	0,31	10			

%Variação explicada (R^2) = 79,4%; $F_{2;8;0,05} = 4,46$

SQ^a = soma dos quadrados; GL^b = graus de liberdade; QM^c = quadrados médios.

Observa-se pela análise da curva de regressão (Gráfico 3) que a maior produção de ácido acético ocorreu quando a temperatura do sistema fermentativo apresentava-se em torno de 30°C.

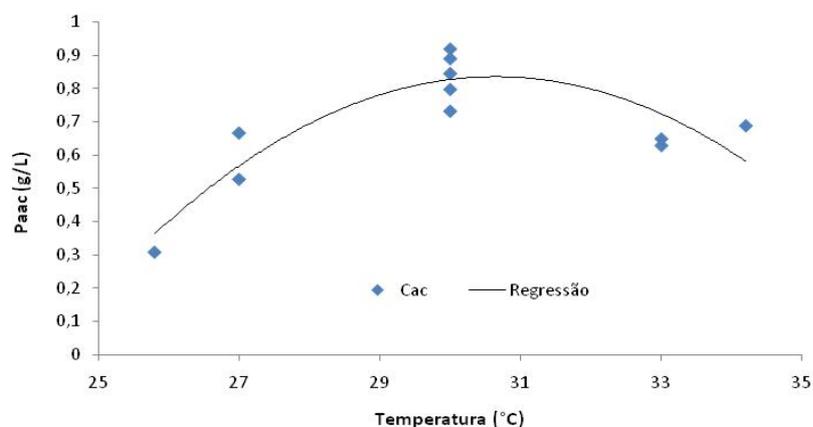


Gráfico 3 Curva de regressão da produção de ácido acético

O maior valor obtido para a produção de ácido acético foi de 0,826 g ác. acético/L de acordo com a curva de regressão e 0,920 g ác. acético /L de acordo com os dados do experimento. Verifica-se também, que à medida que a temperatura do processo aumenta em direção a 30°C, a produção aumenta, contudo, em temperaturas superiores a 30°C ocorre o inverso. Conclui-se que 30°C é a temperatura ótima do processo para a produção do ácido acético.

A Tabela 10 apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo, para a produção de ácido acético, para os desvios e os desvios relativos, para cada ensaio do DCCR, sendo que,

$$\text{Desvio} = Y - \hat{Y} \quad (2)$$

$$\text{Desvio Relativo} = ((Y - \hat{Y})/Y)*100 \quad (3)$$

em que: Y é a resposta experimental e \hat{Y} é a resposta prevista pelo modelo.

Tabela 10 Valores de produção de ácido acético experimentais, prevista pelo modelo e desvios para o DCCR

Ensaio	Paac experimental (g/L)	Paac prevista (g/L)	Desvio	Desvio Relativo (%)
1	0,667	0,569	0,100	14,69
2	0,528	0,569	-0,040	-7,77
3	0,629	0,725	-0,100	-15,26
4	0,649	0,725	-0,080	-11,71
5	0,846	0,826	0,020	2,36
6	0,733	0,826	-0,090	-12,69
7	0,309	0,360	-0,050	-16,55
8	0,689	0,580	0,110	15,80
9	0,891	0,826	0,065	7,30
10	0,920	0,826	0,094	10,22
11	0,798	0,826	-0,028	-3,50

Pode-se observar que os desvios foram baixos na região desejada (ensaio 5, 9, 10 e 11) em que as produções estão maximizadas.

Teixeira (2004), ao desenvolverem processo fermentativo, para produção de bioaromas, utilizando *Propionibacterium freudenreichii*, cultivada em permeado de soro de queijo mussarela a 30°C, sem adição de nutrientes e controle de pH, detectaram que a produção de ácido acético, após 113 horas de fermentação, foi de 0,98 g/L, próximo ao valor máximo (0,92 g/L) obtido neste trabalho.

Haddadin et al. (1996), ao fermentar soro de “labneh” suplementado com 1,0% de extrato de levedura e fortificado com 7,0% de lactose, utilizando *Propionibacterium freudenreichii*, em condições anaeróbicas, e pH ajustado para 7,1-7,2, por 60 horas, registraram que a produção de ácido acético foi de $(0,70\pm 0,09)$ g/L.

Coral (2008), utilizando a *P. freudenreichii*, com 40 g/L de lactato e inóculo 1% v/v, observou que a produção de ácido acético foi maior a 30°C ($6,45\pm 0,37$ g/L). Apesar do valor da produção de ácido acético ser maior do que a obtida neste trabalho, a melhor produção foi obtida a 30°C.

Himmi et al. (2000), realizaram um estudo comparativo em batelada anaeróbia, em que utilizaram duas linhagens de propionibacterias, *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 25562 e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ATCC 9614, inoculando 10% v/v destas em meio preparado, com 20 g/L de glicerol ou glicose. O meio inoculado foi incubado a 30°C por 30 h, e pH controlado em 7,0. *Propionibacterium acidipropionici* apresentou-se mais eficiente na produção tanto de ácido acético quanto propiônico, em ambas as fontes de carbono (glicerol ou glicose), produzindo 1,5 g/L e 3,3 g/L de ácido acético, em meio com glicerol e glicose, respectivamente. A *Propionibacterium freudenreichii* produziu 2,1 g/L e 3,6 g/L de ácido acético, em meio com glicerol e glicose, respectivamente, apresentando valores superiores ao deste trabalho. (BARBIRATO; CHEDAILLE; BORIES, 1997) explicam que este fato poderia ocorrer pela necessidade da célula em equilibrar o potencial redox intracelular, já que o glicerol é um composto mais reduzido do que a glicose.

3.3.2 Produção de ácido propiônico

De acordo com a análise estatística, nenhuma das variáveis estudadas, concentração do meio e temperatura, apresentaram efeito significativo ($p \leq 0,10$) sobre a produção de ácido propiônico (Tabela 11).

Tabela 11 Efeito das variáveis na produção de ácido propiônico.

	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de Conf. -90%	Lim. de Conf. +90%	Coef.
Mean/ Interc.	5,042	0,733	6,880	0,001	3,565	6,519	5,042
Conc. (L)	0,054	0,899	0,060	0,954	-1,757	1,865	0,027
Conc. (Q)	-0,052	1,073	-0,049	0,963	-2,214	2,109	-0,026
Temp. (L)	1,508	0,899	1,678	0,154	-0,303	3,319	0,754
Temp. (Q)	-1,034	1,073	-0,964	0,379	-3,195	1,127	-0,517
1L by 2L	0,687	1,269	0,541	0,612	-1,871	3,245	0,344

A produção de ácido propiônico variou de 1,620 g/L (ensaio 7) e 6,402 g/L (ensaio 8), tendo sua maior produção a temperatura de 34,2°C e concentração de 10°Brix.

Coral (2008), utilizando *P. freudenreichii*, com 40 g/L de lactato e inóculo 1% v/v, mostrou as maiores produções de ácido propiônico a 36°C (17,46±0,43) g/L e a 30°C (17,15±0,45) g/L. O autor constatou que a formação de ácido propiônico, usando lactato como fonte de carbono, não dependeu dos

valores de temperatura (30 e 36°C), pois, as concentrações do ácido propiônico são muito similares a 30 e 36°C, para todas as propionibacterias, embora algumas cepas como a *Propionibacterium freudenreichii* denotaram pequenas diferenças na produção deste metabólito nas duas temperaturas. Ainda com base em seus dados, o autor indicou que a *Propionibacterium freudenreichii* foi mais eficiente para a produção de ácido propiônico do que as outras cepas a 30°C e 36°C, principalmente entre 20 a 60 h. Além disso, a *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*, também, apresentou o crescimento celular mais rápido, tanto a 30°C como 36°C no intervalo de 20 a 60 h entre as outras cepas. Entretanto, após 60 h, com uma produção em torno de 17 g/L de ácido propiônico, o crescimento celular foi inibido e a concentração celular obtida foi menor. Foi observado, ainda, que usando lactato de sódio como fonte de carbono, os valores de pH não foram alterados, atingindo, o final da fermentação, entre 6,2-6,4. Assim, o efeito de inibição foi apenas relacionado com a concentração de ácido propiônico.

Souza et al. (2002), ao cultivarem *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271, em um processo fermentativo anaeróbico, em meio de cultura, contendo água de maceração de milho em substituição ao extrato de levedura, com frequência de agitação 150 min^{-1} , temperatura de 37°C e pH 6,5, durante 54 horas, conseguiu como resultado uma produção de ácido propiônico de 0,23 g/L.h. Ye et al. (1999) obtiveram, em seu trabalho, valores de 0,11 g/L.h, e Quesada-Chanto et al. (1998) obtiveram valores de 0,17/L.h. Goswami e Srivastava (2000) obtiveram valor igual a 0,25 g/L.h, mostrando-se superiores ao valores obtidos neste trabalho (em média 0,01 – 0,04 g/L/h).

Teixeira (2004), ao desenvolver processo fermentativo para produção de bioaromas, utilizando *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, cultivada em permeado de soro de queijo mussarela a 30°C, sem adição de nutrientes e controle de pH, observou em produção de ácido propiônico, após 113 horas de

fermentação foi de 2,29 g/L, valor inferior aos valores obtidos neste trabalho, com exceção do ensaio 7 (1,620 g/L).

Haddadin et al. (1996), no processo fermentativo de soro de “labneh” suplementado com 1,0% de extrato de levedura e fortificado com 7,0% de lactose, utilizando *Propionibacterium freudenreichii*, em condições anaeróbicas, e pH ajustado para 7,1-7,2, por 60 horas, obtiveram a produção de ácido propiônico foi de 7,1 ($\pm 0,03$) g/L, valor próximo ao obtido no ensaio 8.

Anderson et al. (1986) realizaram um estudo com o intuito de analisar o efeito inibitório da autoclavagem de meio soro na produção de ácido propiônico por *Propionibacterium freudenreichii*. Neste trabalho, os autores adicionaram aos dois tipos de meio (pasteurizado e autoclavado), soro doce seco, com concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 g/L e extrato de levedura com concentrações de 5 e 10 g/L, e ajustaram o meio para pH 7,0 com NaOH. Para pasteurização e autoclavação, utilizaram o binômio tempo x temperatura, 65°C/50min e 121°C/15min, respectivamente, e a fermentação ocorreu por 72 horas a 30°C. Como resultado, esses autores obtiveram maior produção de ácido propiônico (10,6 g/L) em meio pasteurizado com 70 g/L de soro doce seco e 10 g/L de extrato de levedura. Em meio autoclavado, a maior produção (10,3 g/L) ocorreu em meio com 50 g/L e 10 g/L de soro doce seco e extrato de levedura, respectivamente. Os mesmos autores, também, observaram que, à medida que se aumentava a concentração do meio autoclavado, havia como consequência um declínio na produção de ácido propiônico e, ainda, que este fato pode estar ligado a dois fatores: primeiro, os nutrientes vitais (vitaminas, aminoácidos, açúcares) podem ser destruídos quando o soro é autoclavado. O extrato de levedura serve para substituir os nutrientes destruídos diretamente ou inibir reações que conduzem à perda de nutrientes ou ambos, sendo o efeito mais pronunciado em altas concentrações de extrato de levedura. Segundo, compostos inibitórios são formados quando o soro é autoclavado. A elevação da

concentração do soro eleva a concentração de compostos inibitórios. O extrato de levedura, no caso, pode reduzir a formação de compostos inibitórios ou torná-los menos inibitórios e o aparecimento de substâncias tóxicas é em virtude da reação de Maillard, não sendo estas hipóteses mutuamente exclusivas.

Himmi et al. (2000), em seu estudo comparativo entre duas linhagens de propionibacterias (*P. acidipropionici* e *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*), com meio preparado utilizando 20g/L de glicerol ou glicose, verificaram a formação de ácido propiônico em concentrações de 12,6 g/L (20g/L de glicerol) e 7,2 g/L (20g/L de glicose) pela *P. acidipropionici*, e formação de ácido propiônico em concentrações de 5,4 g/L (20g/L de glicerol) e 2,1 g/L (20g/L de glicose) pela *P. freudenreichii*, mostrando que, para ambas as cepas, as maiores produções do ácido propiônico foram em meio com glicerol como fonte de energia, sendo a *P. acidipropionici* maior produtora entre as cepas. Ambas propionibacterias mostraram um padrão típico de fermentação de glicose, associando consumo de substrato e formação de produtos.

3.3.3 Rendimento do ácido acético

Conforme a análise estatística dos resultados, a concentração do meio (termo linear e quadrático) e a interação entre concentração e temperatura apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,10$), em relação ao rendimento de ácido acético, como pode ser visto na Tabela 12.

Tabela 12 Efeito das variáveis no rendimento do ácido acético

	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de Conf. -90%	Lim. de Conf. +90%	Coef.
Mean/ Interc.	0,181	0,032	5,704	0,002	0,117	0,245	0,181
Conc. (L)	-0,102	0,039	-2,636	0,046	-0,181	-0,024	-0,051
Conc. (Q)	0,178	0,046	3,846	0,012	0,085	0,272	0,089
Temp. (L)	0,070	0,039	1,790	0,134	-0,009	0,148	0,035
Temp. (Q)	0,044	0,046	0,956	0,383	-0,049	0,138	0,022
1L by 2L	-0,139	0,055	-2,531	0,052	-0,249	-0,028	-0,069

Considerando os parâmetros significativos, concentração (°Brix) e interação entre temperatura e concentração do meio de fermentação, foram obtidos coeficientes da regressão (Tabela 13).

Tabela 13 Coeficientes de regressão para predição do rendimento do ácido acético

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(8)	p-valor
Média	0,201	0,026	7,651	0,000
x ₁ (L)	-0,051	0,022	-2,309	0,054
x ₁ (Q)	0,083	0,025	3,268	0,014
x ₁ * x ₂	-0,069	0,031	-2,218	0,062

L – termos lineares; Q – termos quadráticos

Os resultados da análise de variância (ANOVA) são apresentados na Tabela 14. Como o F_{calc} (5,33) foi maior que o F_{tabela} (4,35), ao nível de significância de 5%, pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível obter o modelo apresentado na Equação 4 e construir a superfície de resposta, como representado no Gráfico 4.

$$Y_{\text{acc.}} = 0,201 - 0,051 * x_1 + 0,083 * x_1^2 - 0,069 * x_1 * x_2 \quad (4)$$

Tabela 14 ANOVA do modelo linear para predição do rendimento do ácido acético

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Regressão	0,02	3	0,02	5,33	0,0542
Resíduos	0,03	7	0,004		
Total	0,11	10			

%Variação explicada (R^2) = 74,9%; $F_{3;7;0,05} = 5,33$

SQ^a = soma dos quadrados; GL^b = graus de liberdade; QM^c = quadrados médios.

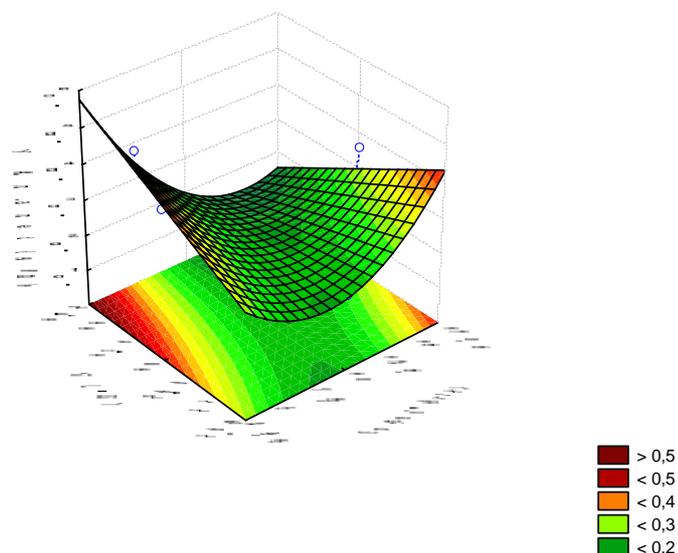


Gráfico 4 Superfície de resposta para o rendimento em ácido acético

Pode-se observar pelo Gráfico 4, que os maiores rendimentos ocorreram na região de alta de sólidos solúveis e baixa temperatura e, na região de concentrações mais baixas e temperaturas mais elevadas. De acordo com os dados experimentais, o maior rendimento ocorreu no processo de 5°Brix/33°C (0,445 g ác. acético/g ác. láctico).

No entanto, o ensaio 7 (10°Brix/25,8°C), também, apresentou um alto rendimento (0,425 g ác. acético/g ác. láctico), que pode ser explicado por ser o único ensaio que não promoveu o consumo total do ácido láctico inicial do permeado de soro, já que os rendimentos (ácido láctico e propiônico) foram calculados com base no consumo de ácido láctico.

O Apêndice B apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a produção de ácido acético, para os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do DCCR.

Teixeira (2004), ao desenvolver processo fermentativo para produção de bioaromas, utilizando células livres de *Propionibacterium freudenreichii*, mostraram que o rendimento ácido acético, após 113 horas de fermentação, foi de 0,152 g/g.

3.3.4 Rendimento do ácido propiônico

De acordo com as análises estatísticas, o termo quadrático da concentração, e os termos, linear e quadrático da temperatura, apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,10$) sobre o rendimento do ácido propiônico.

Contudo, como os p-valores do termo quadrático da temperatura (0,123) e da interação entre as variáveis independentes (0,121) estão muito próximos do p-valor significativo ($>0,1$), decidiu-se considerá-los na regressão (Tabela 15).

Tabela 15 Efeito das variáveis no rendimento do ácido propiônico

	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de Conf. -90%	Lim. de Conf. +90%	Coef.
Mean/ Interc.	1,046	0,267	3,923	0,011	0,509	1,583	1,046
Conc. (L)	-0,441	0,327	-1,350	0,235	-1,101	0,218	-0,221
Conc. (Q)	1,232	0,390	3,157	0,025	0,446	2,019	0,616
Temp. (L)	0,683	0,327	2,088	0,091	0,024	1,342	0,342
Temp. (Q)	0,724	0,390	1,855	0,123	-0,063	1,511	0,362
1L by 2L	-0,863	0,462	-1,869	0,121	-1,794	0,068	-0,432

Desconsiderando apenas o termo linear da concentração, foram obtidos os coeficientes mostrados na Tabela 16 e a análise de variância na Tabela 17.

Tabela 16 Coeficientes de regressão para a predição do rendimento de ácido propiônico

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor
Média	1,046	0,284	3,679	0,010
x ₂ (Q)	0,616	0,208	2,961	0,025
x ₁ (L)	0,342	0,174	1,959	0,098
x ₁ (Q)	0,362	0,208	1,740	0,133
x ₁ * x ₂	-0,432	0,246	-1,752	0,130

L – termos lineares; Q – termos quadráticos

Como o $F_{\text{calculado}}$ (4,13) foi maior que o F_{tabela} (3,18), ao nível de significância de 5%, pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível traçar uma curva, como representado no Gráfico 5.

O modelo obtido para as variáveis codificadas é apresentado na Equação 5.

$$Y_{\text{app}} = 1,046 - 0,221*x_1 + 0,616*x_1^2 + 0,342*x_2 + 0,362*x_2^2 - 0,432*x_1*x_2 \quad (5)$$

Tabela 17 ANOVA do modelo linear para predição do rendimento de ácido propiônico

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	p-valor
Regressão	4,01	4	1,00	4,13	0,0606
Resíduos	1,46	6	0,25		
Total	5,46	10			

%Variação explicada (R^2) = 73,4%; $F_{4;6;0,05} = 4,13$

SQ^a = soma dos quadrados; GL^b = graus de liberdade; QM^c = quadrados médios.

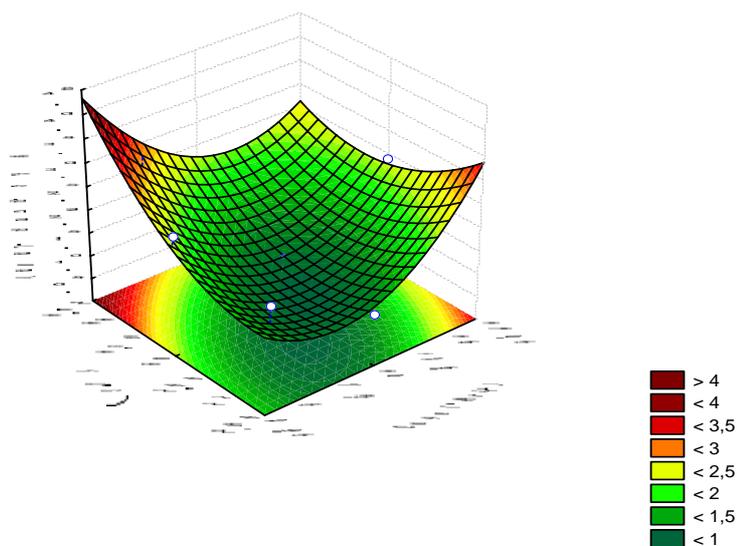


Gráfico 5 Superfície de resposta do rendimento de ácido propiônico em função da temperatura e do teor de sólidos solúveis

Pode-se observar que a análise de superfície de resposta (Gráfico 5), assim como ocorreu com o rendimento do ácido acético (Gráfico 4), os maiores

rendimentos ocorreram nas regiões de concentrações elevadas e menores temperaturas e na região de baixa concentração e temperaturas mais elevadas. De acordo com os dados experimentais, os maiores rendimentos ocorreram com processos de 5°Brix/33°C (2,724 g ác. propiônico / g ác. láctico) e 10°Brix/25,8°C (2,556 g ác. propiônico / g ác. láctico). Contudo, o alto obtido no ensaio 7 (10°Brix/25,8°C) pode ser explicado pelo baixo consumo de ácido láctico durante a fermentação.

O Apêndice B apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a produção de ácido propiônico, para os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do DCCR.

Teixeira (2004), ao promover a fermentação de permeado soro com células livres de *P. freudenreichii*, a 30°C por 113 horas, obteve um valor de 0,369 g/g, menor que o resultados deste trabalho. De acordo com o autor, após 40 horas de fermentação, observou-se o início do consumo de ácido láctico, no sistema livre, confirmando a preferência deste gênero em desdobrar ácido láctico à lactose.

Souza et al. (2002), ao cultivar *Propionibacterium freundeireichii* DSM 20271, em um processo fermentativo anaeróbico, com frequência de agitação 150 min⁻¹, temperatura de 37°C e pH 6,5, durante 54 horas, conseguiram como resultado, um rendimento de 0,50 g/g de ácido propiônico. De acordo com estes autores, verificou-se que este valor foi muito maior que encontrados em outros trabalhos, que mostra a potencialidade desta linhagem.

4 CONCLUSÃO

Os parâmetros ambientais, utilizados neste trabalho, como temperatura e teor de sólidos solúveis do meio, influenciaram no metabolismo da *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, na produção dos ácidos orgânicos.

Para a produção de ácido acético, as melhores condições de fermentação foram teor de sólidos solúveis de 10°Brix e temperatura de 30°C, com valor de 0,920 g/L.

Para a produção de ácido propiônico, as melhores condições de fermentação foram a utilização de teor de sólidos solúveis de 10°Brix do meio e temperatura de 34,2°C, com valor de 6,402 g/L.

No rendimento do ácido acético e propiônico, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se concentrações de 5°Brix e temperatura de 33°C, obtendo-se valor de 0,445 g ác. acético/g ác. láctico e 2,724 g ác. prop./g ác. láctico, respectivamente.

Todos os ensaios apresentaram consumo total de ácido láctico, com exceção do ensaio 10 (10°Brix/25,8°C), que levou a altos rendimentos para ambos os ácidos.

Conclui-se, portanto, que as melhores condições para produção de ácido propiônico e ácido acético, neste trabalho, foram obtidas usando-se meio de fermentação permeado de soro com teor de sólidos solúveis de 10°Brix e temperatura entre 30 e 34°C.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, T. M. et al. Inhibitory effect of autoclaving whey-based medium on propionic acid production by *propionibacterium shermanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 2, p. 427-428, Feb. 1986.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th. ed. Washington, 1998. 1141 p.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 47, n. 4, p. 441-446, Apr. 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINO, S. I.; BRUNS, E. R. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 1996. 300 p.

CARVALHO, W. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa: parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 18, p. 70-76, ago./set. 2005.

CORAL, J. **Propionic acid production by *Propionibacterium sp.* using low-cost carbon sources in submerged fermentation**. 2008. 34 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CUNHA, C. R. et al. Efeito do fator de concentração do retentado o rendimento de queijo Minas frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 76-81, jan./abr. 2002.

DISCHE, Z. General color reaction. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academi Press, 1962. chap. 24, p. 477-512.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Novas metodologias para a fermentação alcoólica de soro de queijo. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 6., 1999, Lisboa. **Actas...** Lisboa: Universidade Federal de Lisboa, 1999. v. 3, p. 271-280.

EL-HAGARAWY, I. S.; SLATTER, W. L.; HARPER, W. J. Organic acid production of propionic acid bacteria: I effect of strains, pH, carbon source and intermediate fermentation products. **Journal Dairy Science**, Champaign, n. 5, p. 579-587, May 1957.

GOSWAMI, V.; SRIVASTAVA, A. K. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 121-128, Jan. 2000.

HADDADIN, M. S. et al. Production of acetic and propionic acid from labneh whey by fermentation from propionibacteria. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Wembley, v. 49, n. 3, p. 79-81, Aug. 1996.

HIMMI, E. H. et al. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin v. 53, n. 4, p. 435-440, Apr. 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicoquímicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2005. 1018 p.

LEWIS, V. P.; YANG, S. T. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*, effect on growth substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 37, n. 4, p. 437-442, July 1992.

MARCOUX, V. et al. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 14, n. 2, p. 95-99, 1992.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. Review: whey pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 323-336, Aug. 1988.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, Essex, v. 47, n. 3, p. 195-203, 1994.

QUESADA-CHANTO, A. et al. Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin B₁₂ production by *Propionibacterium shermanii*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p.843-846, Nov. 1998.

SOUZA, O. et al. Cinética da produção de vitamina B12 por *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271. **Caderno de Iniciação à Pesquisa**, Joinville, v. 4, p. 220-224, 2002.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L. E.; HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. chap. 6, p. 53-67.

TEIXEIRA, M. I. **Microencapsulação de aroma de queijo proveniente da fermentação do permeado de soro por propionibacterium freudenreichii aprisionada em alginato de cálcio**. 2004. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, Nov. 1995.

YE, K. et al. Metabolic pathway of *Propionibacterium* growing with oxygen: enzymes ¹³C NMR analysis, and its application for vitamin B₁₂ production with periodic fermentation. **Biotechnology Progress**, New York, v. 15, n. 2, p. 201-207, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A Teste de Tukey entre tratamentos com proporção de 10 e 20% v/v de inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 para acidez total, contagem de células e pH.

Variáveis	Tratamentos	
	10% v/v	20% v/v
Acidez Total	0.595920 ^a	0.618400 ^a
Contagem de células viáveis	5276000 ^b	6462000 ^b
pH	4.748000 ^c	4.774000 ^c

Numa mesma linha, médias com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

APÊNDICE B Valores de rendimento do ácido acético experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR.

Ensaio	Yaac experimental (g/L)	Yaac prevista (g/L)	Desvio	Desvio Relativo
1	0,149	0,164	-0,015	-10,067
2	0,445	0,302	0,143	32,135
3	0,212	0,404	-0,192	-90,566
4	0,230	0,266	-0,036	-15,652
5, 6 e 7	0,185	0,201	-0,016	-8,649
8	0,184	0,201	-0,017	-9,239
9	0,172	0,201	-0,029	-16,860
10	0,425	0,438	-0,013	-3,041
11	0,358	0,294	0,064	17,849

APÊNDICE B Valores de rendimento do ácido propiônico experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR.

Ensaio	Yaap experimental (g/g)	Yaap prevista (g/g)	Desvio	Desvio Relativo
1	1,100	1,713	-0,613	-55,727
2	2,724	1,893	0,831	30,507
3	1,789	3,019	-1,230	-68,753
4	1,687	1,471	0,216	12,804
5, 6 e 7	1,045	1,046	-0,001	-0,096
8	1,147	1,283	-0,136	-11,898
9	0,941	2,248	-1,307	-138,885
10	2,556	2,582	-0,026	-1,028
11	2,387	1,959	0,428	17,928