



**LUANA ALVES TAVARES**

**AMPLIAÇÃO DE ESCALA E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE  
ÁCIDO PROPIÔNICO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO  
USANDO *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC6207**

**LAVRAS-MG  
2021**

**LUANA ALVES TAVARES**

**AMPLIAÇÃO DE ESCALA E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ÁCIDO  
PROPIÔNICO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO USANDO *Propionibacterium  
freudenreichii* subsp ATCC6207**

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

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Orientador

Profa. Dra. Olga Lucía Modragón-Bernal

Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Tavares, Luana Alves.

Ampliação de Escala e Purificação Parcial de Ácido  
Propiônico Obtido por Fermentação

Usando *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC6207 / Luana  
Alves Tavares. - 2021.

95 p.

Orientador(a): José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Fermentação propiônica. 2. Soro de leite ultrafiltrado. 3.  
Criogéis.

**LUANA ALVES TAVARES**

**SCALE-UP AND PARTIAL PURIFICATION OF PROPIONIC  
ACID OBTAINED BY FERMENTATION USING  
*Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC6207**

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

APROVADA em 29 de outubro de 2021.

Dr. Eliana Setsuko Kamimura USP

Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo UFLA

Dra. Olga Lucía Mondragón-Bernal UFLA

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2021**

*Aos meus amados pais Voli e Hélio por serem minha luz.  
Aos saudosos avós Maria e Urbano por todo exemplo,  
Dirce por todo amor e Pedro por ser minha inspiração de vida.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela iluminação, por sempre está presente em minha vida e ter me mantido forte para chegar ao fim de mais essa caminhada.

A CAPES, pela bolsa de Mestrado concedida, sem a qual, não poderia realizar esse trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A linda e aconchegante Universidade Federal de Lavras, que além do estudo permite caminhadas que traz paz para a alma ao apreciar seus ipês e natureza exuberante.

Ao meu orientador José Guilherme Lembi Ferreira Alves pela oportunidade de realizar essa pesquisa, por compartilhar seu conhecimento e experiência, paciência e amizade durante essa jornada.

A coorientadora Olga Lucía Mondragón-Bernal e as professoras Lizzy Ayra Alcantara Veríssimo e Eliana Setsuko Kamimura pela participação na banca com valiosas contribuições para esse trabalho.

Ao professor Luciano V. Paiva do laboratório de Biologia Molecular da UFLA por permitir a realização das análises em HPLC no seu laboratório e ao Fabrício Lelis da Silva por todo conhecimento compartilhado durante as análises, bondade, amizade, paciência e risadas.

À professora Roberta Hilsdorf Piccoli pelo carinho, bondade e por todas as vezes que compartilhou seu conhecimento nos momentos em que precisei.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL-UFLA) pelos ensinamentos que me passaram. Desejo crescimento e sucesso ao PPGEAL.

A Creuza do laboratório de análises de leite e produtos lácteos, do Departamento de Ciências dos Alimentos, pela bondade, paciência e ser tão solícita com todos, desempenhando muito bem sua função.

Aos meus amados pais, Voli Silva e Hélio Tavares, pela amizade, carinho, amor, incentivo e por sempre me apoiarem não medindo esforços para me verem feliz e realizando meus sonhos. Obrigada pai pelas ligações diárias e por se manter tão presente apesar da distância!!!

À minha querida irmã Juliana Tavares pela amizade, amor, companheirismo, risadas, boa energia e pelos inúmeros apoios durante essa trajetória.

Ao meu irmão Roberson Tavares pela amizade, companheirismo, apoio e aos irmãos mais velhos Hebert, Willian, Wagner e Wanderson pela torcida para meu sucesso.

Aos meus lindos e amados sobrinhos, Leandro, Vitória, Davi, Laura, João Pedro e Bernardo por todo amor, alegria e paz que me transmitiram ao longo da jornada e em cada reencontro, recarregando minha energia.

Aos meus tios Antônio Tavares e Ana Lúcia Tavares pelo apoio, torcida, orações, carinho, amor, incentivo e serem tão presente nas etapas de minha vida.

À minha amiga Marta Silvério que mesmo de longe se manteve tão presente, torcendo pelo meu sucesso para conclusão de mais essa etapa.

A Ana Cristina O. Meira pela boa recepção a minha chegada à UFLA, à amizade, risadas, conhecimentos compartilhados e companheirismo durante os testes de purificação dos ácidos.

Aos colegas do laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Debora, Cristiano, Matheus e Luís Fernando pelos momentos de descontração, trabalho e amizade.

A Katherine A. Moura pela amizade, caminhadas, companheirismo e cervejadas.

Aos meus amados filhos de quatro patas, Peter por trazer luz, paz e fazer tanta diferença na minha vida com sua chegada. Ao saudoso, querido e amado Duque, que me recebia tão feliz a cada chegada e vive em meu coração.

Ao Jonathan Romano por me ajudar a lidar com as adversidades e deixar essa etapa final do Mestrado mais leve.

Aos colegas do grupo Bolsistas Capes (Facebook) pelas risadas e incentivo coletivo durante essa caminhada. Vocês foram dez e dias melhores virão.

Ao governo que fez seu trabalho, cuidou e investiu na área da educação me permitindo chegar até aqui, Lula e Haddad. Pela oportunidade que as gerações passadas não tiveram e espero que as próximas tenham.

As demais pessoas que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

**Meu muito obrigada!!!**



“A demanda crescente na produção de alimentos é um dos maiores desafios da humanidade.

O desenvolvimento sustentável, aquele que atende as exigências do presente, sem comprometer a capacidade das gerações futuras em atingir suas necessidades, somente poderá ser alcançado através da interação harmônica entre o homem e o ambiente”

Professor emérito Dr. Alfredo Schied Lopes (UFLA)

## RESUMO GERAL

O ácido propiônico (AP) é obtido atualmente por síntese química a partir de matéria-prima derivada do petróleo. Buscando abordagens sustentáveis, as pesquisas têm sido voltadas ao uso de microrganismos e biomassa renovável no processo de produção de AP. A demanda por AP tem crescido nos últimos anos por ser considerado um aditivo seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo muito aplicado pelas indústrias químicas e de alimentos em razão da sua atividade antimicrobiana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de AP em biorreator usando meio de fermentação com permeado de soro leite (PSL) como fonte de carbono e água de maceração de milho (AMM) como fonte de nitrogênio e investigar sua purificação usando criogéis de troca iônica. O primeiro tratamento foi realizado com fermentação descontínua por 120 h, em triplicata, com controle e variação do pH em biorreator com meio composto por PSL, contendo 40 g L<sup>-1</sup> de lactose e 65 g L<sup>-1</sup> de AMM e inóculo preparado com *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC 6207. A cada 24 horas, amostras foram retiradas para determinar as concentrações de lactose, pH, ácidos orgânicos (ácido acético, propiônico e láctico) e contagem de bactérias propiônicas. O segundo tratamento foi conduzido com fermentação descontínua alimentada, com controle da concentração de lactose e do pH. O meio fermentado foi composto por PSL e AMM e mesmo inóculo. A concentração de lactose ao longo da fermentação por batelada alimentada no biorreator foi mantida entre 5 e 15 g L<sup>-1</sup>. Também foram retiradas amostras para análises dos ácidos orgânicos (acético, propiônico e láctico) e para contagem de bactérias propiônicas. Comparando-se os dois tratamentos, verificou-se que o processo em batelada foi mais eficaz na produção de AP, com rendimento de 7,41 g.L<sup>-1</sup> e produtividade de 0,103 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> com 72 h de fermentação. Nos testes de purificação, a adsorção do PA foi estudada em diferentes pH (4, 5, 6 e 7) usando criogéis funcionalizados com taurina (Criogel-Tau). A matriz que apresentou maior capacidade de adsorção de AP (256,13 mg g<sup>-1</sup>) e menor capacidade de adsorção de ácido acético (29,34 mg g<sup>-1</sup>) foi com o pH 4. O presente estudo apresenta uma alternativa para obtenção e purificação de ácido propiônico, com aproveitamento de subprodutos da indústria alimentícia.

**Palavras-chave:** Fermentação propiônica. Soro de leite ultrafiltrado. Água de maceração de milho. Purificação. Criogéis.

## ABSTRACT

Propionic acid (PA) is currently obtained by chemical synthesis from petroleum-derived feedstock. Seeking sustainable approaches, research has focused on the use of microorganisms and renewable biomass in the production process of PA. The demand for PA has grown in recent years because it is considered a safe additive by the Food and Drug Administration (FDA), being widely applied by the chemical and food industries due to its antimicrobial activity. The present work aimed to evaluate the production of PA in bioreactor using fermentation medium with whey permeate (PSL) as carbon source and corn steep liquor (AMM) as nitrogen source and to investigate its purification using ion exchange cryogels. The first treatment was carried out with discontinuous fermentation for 120 h, in triplicate, with control and pH variation in a bioreactor with medium composed of PSL, containing  $40 \text{ g L}^{-1}$  lactose and  $65 \text{ g L}^{-1}$  AMM and inoculum prepared with *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC 6207. Every 24 hours, samples were taken to determine lactose concentrations, pH, organic acids (acetic, propionic, and lactic acid), and propionic bacteria counts. The second treatment was conducted with discontinuous fed fermentation, with control of lactose concentration and pH. The fermented medium was composed of PSL and AMM and the same inoculum. The lactose concentration throughout the fed-batch fermentation in the bioreactor was maintained between 5 and  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Samples were also taken for analysis of organic acids (acetic, propionic and lactic) and for counting propionic bacteria. Comparing the two treatments, it was found that the batch process was more efficient in PA production, with yield of  $7.41 \text{ g.L}^{-1}$  and productivity of  $0.103 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  with 72 h of fermentation. In purification tests, the adsorption of PA was studied at different pH (4, 5, 6 and 7) using taurine functionalized cryogels (Criogel-Tau). The matrix that presented the highest adsorption capacity for PA ( $256.13 \text{ mg g}^{-1}$ ) and the lowest adsorption capacity for acetic acid ( $29.34 \text{ mg g}^{-1}$ ) was at pH 4. The present study presents an alternative for obtaining and purifying propionic acid, using by-products from the food industry.

**Keywords:** Propionic fermentation. Ultrafiltered whey. Corn steep water. Purification. Cryogel.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

#### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Efluentes comuns da indústria de laticínios.....	17
Figura 2 – Fluxograma do processo de ultrafiltração do soro.....	18
Figura 3 – Composição do leite, soro e permeado do soro.....	20
Figura 4 – Glicólise via Embden-Meyerhof-Parnas.....	27
Figura 5 – Clico de Wood-Werkmam.....	28
Figura 6 – Esquema do mecanismo de separação por cromatografia de troca iônica.....	35
Figura 7 – Esquema da produção do criogel.....	37
Figura 8 – Etapas do desenvolvimento da dissertação.....	38

### CAPÍTULO 2

#### ARTIGO 1

Figura 1 – Concentração dos ácidos orgânicos, lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e contagem total de células ao longo tempo.....	55
Figura 2 - Acidez ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e pH ao longo do tempo.....	56

### CAPÍTULO 3

#### ARTIGO 2

Figura 1 - Perfil cinético da concentração celular e da variação de pH da fermentação em batelada simples com <i>P. freudenreichi</i> .....	73
Figura 2 - Perfil cinético das concentrações de lactose e ácidos orgânicos para fermentação em batelada em biorreator com <i>P. freudenreichi</i> .....	73
Figura 3 - Perfil cinético da concentração celular e da variação de pH da fermentação em batelada alimentada com <i>P. freudenreichi</i> .....	78
Figura 4 - Perfil cinético das concentrações de lactose e ácidos orgânicos para fermentação em batelada alimentada com <i>P. freudenreichi</i> .....	85

## LISTA DE TABELAS

### PARTE 1

#### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Composição do permeado de soro de leite e permeado de leite.....	19
Tabela 2 – Composição centesimal da água de maceração de milho (AMM).....	22
Tabela 3 – Propriedades químicas e físicas do ácido propiônico.....	25
Tabela 4 – Produção de ácido propiônico por diferentes fontes de carbono.....	259

### PARTE 2

#### ARTIGO 1

Tabela 1 – Caracterização físico-química e centesimal da amostra de permeado de leite desnatado.....	52
Tabela 2 – Resultados da variação de lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ), contagem total de células UFC $\text{mL}^{-1}$ e ácidos orgânicos ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo.....	54
Tabela 3 – Resultados das análises de acidez total e pH ao longo do tempo.....	55
Tabela 4 – Concentração de substrato, produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em erlenmeyer.....	57

### PARTE 3

#### ARTIGO 2

Tabela 1 – Caracterização físico-química e centesimal das amostras de PSL e AMM.....	71
Tabela 2 – Resultados da variação de lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ), contagem total de células UFC $\text{mL}^{-1}$ e concentração de ácidos orgânicos ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo para o processo fermentativo em batelada.....	72
Tabela 3 – Concentração de substrato, produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em batelada.....	75
Tabela 4 – Resultados da variação de lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ), contagem total de células UFC $\text{mL}^{-1}$ e ácidos orgânicos ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo para o processo fermentativo em batelada alimentada.....	77
Tabela 5 – Concentração de produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em batelada alimentada.....	79
Tabela 6 – Concentração de substrato, produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em batelada e batelada alimentada.....	80
Tabela 7 – Conteúdo de ácidos orgânicos adsorvido (q) no criogel funcionalizado com taurina em função de diferentes valores de pH.....	82
Tabela 8 – Recuperação de ácido propiônico purificado em função de diferentes valores de pH .....	82

## LISTA DE SIGLAS

AA – Ácido acético

AMM – Água de maceração de milho

AP – Ácido propiônico

P.AA - Concentração de ácido acético

PLD – Permeado de leite desnatado

PSL – Permeado de soro de leite

P.AP- Concentração de ácido propiônico

PpAA - Produtividade do ácido acético

PpAP - Produtividade do ácido propiônico

S - Concentração de lactose

$Y_{P/S}$  AA - Rendimento do ácido acético

$Y_{P/S}$  AP - Rendimento de ácido propiônico

## SUMÁRIO

PARTE 1.....	14
1 INTRODUÇÃO .....	14
1.1 OBJETIVO GERAL .....	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1 Resíduos da Agroindústria .....	17
2.2 Permeado de Soro de Leite e Permeado de Leite Desnatado .....	18
2.3 Água de Maceração de Milho.....	20
2.4 Objetivo de Desenvolvimento Sustentável e Química Verde.....	22
2.5 Propriedades Físico-Químicas e Aplicações do Ácido Propiônico.....	24
2.6 Bactérias Propiônicas.....	25
2.7 Produção e Inibição do Ácido Propiônico.....	26
2.7.1 Biossíntese do Ácido Propiônico.....	27
2.7.2 Produção de Ácido Propiônico por Fermentação.....	28
2.8 Variáveis do Processo Que Influenciam a Produção de Ácido Propiônico por <i>Propionibacterium</i> .....	30
2.8.1 pH.....	30
2.8.2 Temperatura.....	31
2.8.3 Fontes de Carbono e Nitrogênio .....	31
2.8.4 Tempo de Fermentação .....	32
2.9 Modos de Condução da Fermentação .....	32
2.9.1 Processo em Batelada .....	32
2.9.2 Processo em Batelada Alimentada .....	33
2.10 Purificação do Ácido Propiônico.....	33
2.10.1 Cromatografia de Troca Iônica .....	34
2.10.2 Criogéis .....	35
3 Cronograma de Desenvolvimento do Projeto de Dissertação .....	37
REFERÊNCIAS.....	39
PARTE 2.....	46
Artigo 1 .....	46
Caracterização e fermentação de permeado de leite desnatado e água de maceração de milho para obtenção de ácido propiônico por <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp ATCC 6207 .....	46

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>PARTE 3.....</b>	<b>61</b>
<b>Artigo 2:.....</b>	<b>61</b>
<b>Biossíntese de ácido propiônico a partir de permeado de soro de leite e água de maceração de milho por <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp ATCC 6207 e purificação parcial usando criogéis de troca iônica .....</b>	<b>61</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>91</b>



## PARTE 1

### 1 INTRODUÇÃO

A demanda por ácido propiônico no mercado global tem aumentado nos últimos anos. Atualmente, o ácido propiônico é produzido em escala comercial é por síntese química a partir de matéria prima derivada do petróleo, mas novas abordagens microbianas utilizando biomassa renovável tem atraído atenção para uma produção mais renovável, já que o ácido propiônico é reconhecido como aditivo seguro pela *Food and Drug Administration* (ISMAIL et al. 2017). E de acordo com o Departamento de Energia dos EUA, o ácido propiônico está entre os 30 melhores produtos químicos utilizados como componentes para produtos com diversas aplicações (WERPY; PETERSEN, 2004; DISHISHA et al., 2012).

Para produzir inúmeros produtos os setores das indústrias de alimentos, bebidas e farmacêuticas exigem uma gama de compostos químicos, que geralmente são usados como aditivos, e tais aditivos têm capacidade para atuar como intensificadores de sabor, estabilizantes, agentes acidificantes ou conservante, sendo o ácido propiônico um exemplo de aditivo (JESUS et al., 2015) que pode ser obtido a partir de soro de leite.

Um grande volume e variedade de subprodutos ou resíduos ricos em matéria orgânica vem sendo produzido pelas indústrias de alimentos devido ao incremento dessa atividade e geração de novos produtos. O baixo reaproveitamento desses subprodutos gera prejuízos ao meio ambiente e elevados gastos no tratamento de efluentes (CHAN et al., 2018). De acordo com Fitzpatrick et al., (2010), para o desenvolvimento de processos sustentáveis e uma economia de base biológica voltada para o futuro, pesquisas que enfocam o uso de processos fermentativos para aplicações industriais diretas são essenciais.

Considerada uma fonte de nutrientes de menor custo a água de maceração de milho é um subproduto da indústria de alimentos usado para a produção de vários compostos que além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de fonte de nitrogênio, fornece vários micronutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento microbiano (NASCIMENTO et al., 2006). Outra fonte de nutrientes com menor custo é o permeado de soro de leite. A sua obtenção é a partir do processo de ultrafiltração do soro de leite cru, que obtém o retentado de soro de leite rico em proteínas e o permeado de soro de leite rico em lactose (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017), sendo o último usado como fonte de carbono pelas bactérias propiônicas (AHMADI et al., 2017).

Sendo assim as preocupações com os impactos ambientais da matéria-prima derivada do petróleo e seus processos de fabricação canalizaram o interesse para o desenvolvimento de produção de ácido propiônico de base biológica via fermentação por propionibactérias (Yang et al., 2018, Feng et al., 2010; Ngome et al., 2017, 2021a; Piwowarek et al., 2021).

De acordo com Thierry et al., (2011), além do ácido propiônico outros produtos são formados pela fermentação dessa bactéria, como os ácidos acético e succínico. E conforme Singh et al., (2021), essa é uma dificuldade encontrada na produção do ácido propiônico por meio de processos fermentativos, pois o alto custo associado ao seu processo de purificação corresponde a 30-40% do custo total de produção.

Segundo Djas e Henczka, (2018) devido a importância da produção de ácido propiônico por fermentação torna-se também necessário desenvolver novos métodos ou melhorar a eficiência do processo de purificação do ácido propiônico no meio de fermentação. Trabalhos desenvolvidos por alguns autores como Li et al., (2021), abordam a purificação de ácido propiônico utilizando resinas aniônicas (ZGA412 – esqueleto de Copolímero de ácido acrílico), já Polat e Sayan (2018), verificaram a adsorção de ácido propiônico em cristais de sulfato de cálcio dihidrato, e Silva e Miranda (2013), empregaram uma resina de troca aniônica (Purolite A133S - poliestireno reticulado com matriz de divinilbenzeno) para purificar ácido propiônico presente em caldo de fermentação.

De acordo com Andaç; Galaev; Denizli, (2016), Guiochon, (2007), criogéis poliméricos supermacroporosos são materiais cromatográficos que possibilitam a purificação de extratos brutos e apresentam um menor custo quando comparados a colunas cromatográficas comerciais.

No Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da UFLA, já foram desenvolvidos trabalhos na área de fermentação propiônica. NGOME et al., (2021), investigaram a produção de ácido propiônico usando soro de leite e água de maceração de milho com cultura mista de *Propionibacterium freudenreichi* e *Lactobacillus paracasei* em erlenmeyer obtendo as melhores concentrações desses subprodutos para fermentação.

A presente pesquisa aborda o uso de dois subprodutos da indústria alimentícia, água de maceração de milho e permeado de soro de leite para produção de ácido propiônico por meio de fermentação usando *Propionibacterium freudenreichi* em biorreator, conduzindo o processo em batelada e em batelada alimentada, assim como o estudo da adsorção do ácido propiônico do meio fermentativo utilizando criogéis de troca iônica que se mostra como uma alternativa promissora.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo de produção de ácido propiônico a partir da fermentação de subprodutos da indústria láctea utilizando *Propionibacterium freundenreichii* subsp ATCC 6207 em biorreator em batelada e em batelada alimentada e purificar o ácido propiônico por cromatografia de troca iônica utilizando criogéis.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Testar a cinética da fermentação propiônica utilizando dois tipos de soro (ultrafiltrado de soro de leite ou ultrafiltrado de leite desnatado como fonte de carbono) com cultura pura de *Propionibacterium freundenreichii* subsp ATCC 6207;
- Caracterizar as matérias-primas usadas (soro lácteo ultrafiltrado, leite desnatado ultrafiltrado e água de maceração de milho);
- Realizar estudo cinético em biorreator de 5 L com variação de pH em batelada e em batelada alimentada;
- Realizar a purificação e extração do ácido propiônico do meio fermentado por troca iônica utilizando criogéis; e
- Desenvolver processo com bom rendimento para produção de ácido propiônico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Resíduos da Agroindústria

O grande impacto ambiental ocasionado pela indústria de laticínios é seu efluente, sendo que a cada litro de leite processado é gerado cerca de 6 a 10 litros de águas residuais, e essas águas residuais podem ser categorizadas em água de processamento, águas residuais de limpeza e águas residuais sanitária dependendo da sua composição e origem. Os efluentes mais comuns gerados pelo laticínio podem ser visto na Figura 1 (AHMAD et al 2019).

Figura 1 – Efluentes comuns da indústria de laticínios



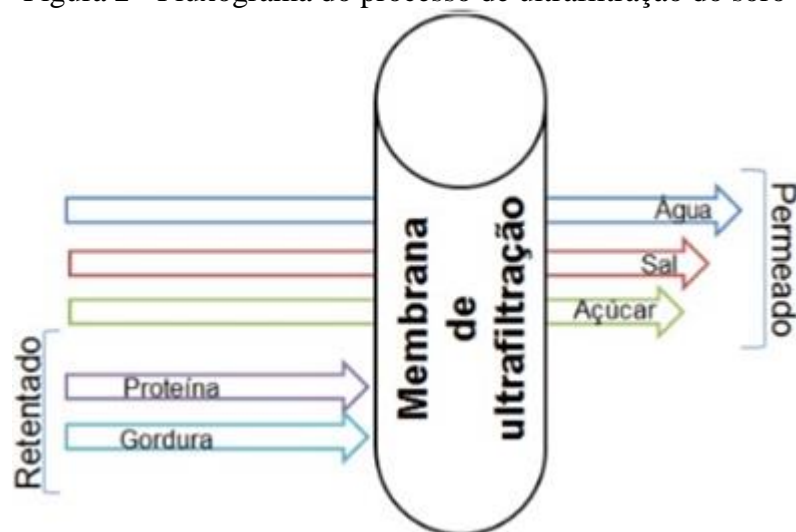
Fonte: (AHMAD et al., 2019).

De acordo com Jaganmai e Jinka (2017), os principais parâmetros que caracterizam esses resíduos são a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) com uma média variando de 0,8 a 2,5 (kg /t) de leite no efluente não tratado e a Demanda Química de Oxigênio (DQO), que normalmente é cerca de 1,5 vezes o nível de DBO. Os equivalentes de carga residual de constituintes específicos do leite são: 1 kg de gordura do leite = 3 kg de DBO; 1 kg de lactose = 1,13 kg de DQO; e 1 kg de proteína = 1,36 kg de DQO.

## 2.2 Permeado de Soro de Leite e Permeado de Leite Desnatado

O soro de leite é o produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos, caseína alimentar e produtos similares (MAPA, 2020). O permeado de leite é o produto que se obtém da extração da proteína e da gordura do leite ou do soro de leite mediante técnicas físicas de separação (ultrafiltração por membranas) que está ilustrada na Figura 2 (BRASIL, 2018).

Figura 2 - Fluxograma do processo de ultrafiltração do soro



Fonte: (BURLANI, 2014).

O soro do leite está presente em muitos produtos alimentícios, tais como *cookies*, torrada, requeijão, *whey protein*, sorvetes, sobremesas lácteas, ricota, bebidas lácteas fermentadas e doce de soro de leite. Utiliza-se o permeado de soro de leite em formulações alimentícias a fim de conferir sabor agradável, enriquecer de minerais com alta biodisponibilidade, substituir carboidratos e reduzir a adição de sal ao produto o que é um fator positivo para a saúde do consumidor (ZACARCHENCO et al., 2013)

Em escala industrial, destina-se às indústrias de panificação e laticínios usualmente. Com exceção às aplicações alimentícias, tem-se uso em indústrias farmacêuticas, bem como de suplementos para alimentação animal (RAPETTI et al., 2002; BAILE et al., 2009).

Os permeados do soro de leite e do leite, obtidos da produção do concentrado proteico de leite, do isolado proteico de leite e do leite ultrafiltrado, tem uma composição semelhante que pode ser vista na Tabela 1, mas, como o permeado de leite é derivado direto do leite passa por menos etapas de processamento (USDEC, 2016).

Tabela 1 - Composição do permeado de soro de leite e permeado de leite

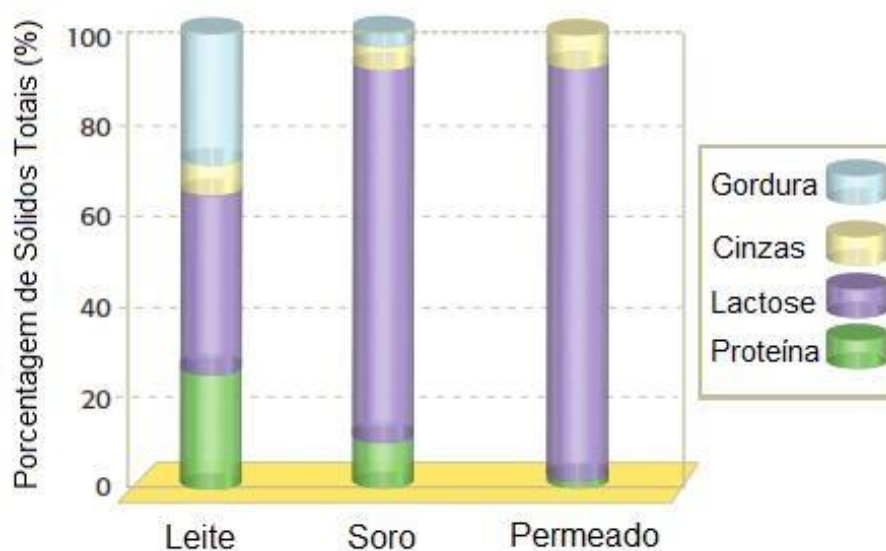
Componente	Permeado de Soro	Permeado
	de Leite	de Leite
Proteína	Típico 2-7% (Máx. 7%)	Típico 3-5% (Min. 2%)
Gordura	Típico 0-1,0% (Máx. 1,5%)	Típico 0-1,0% (Máx. 1,5%)
Lactose	Típico 76-85% (Min. 76%)	Típico 78-88% (Min. 76%)
Cinzas	Típico 8-11% (Máx. 14%)	Típico 8-11% (Máx. 14%)
Umidade	Típico 3-4,5% (Máx. 5,0%)	Típico 3-4,5% (Máx. 5,0%)
Sódio	0,70-0,89%	0,38-0,66%
Cálcio	0,36-0,62%	0,36-0,46%
Magnésio	0,10-0,13%	0,10-0,12%
Potássio	2,18-5,36%	1,91-2,58%

Fonte: (USDEC, 2016).

O componente de maior concentração é a lactose que contribui em grande parte para o soro de leite ser considerado um dos subprodutos mais poluidores devido sua elevadas Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) >35.000 ppm e Demanda Química de Oxigênio (COD) >60.000 ppm (SMITHERS, 2008).

Com isso microrganismos capazes de consumir a lactose podem ser utilizados para a fermentação direta do soro visando sua biotransformação e produzindo diversos produtos (PANESAR et al 2013). Como pode ser visto na Figura 3, a lactose está em maior concentração no permeado do soro. Reaproveitar esse subproduto pode diminuir a degradação ambiental causada no meio ambiente já que pode haver o descarte incorreto (BARBOSA et al., 2010).

Figura 3 - Composição do leite, soro e permeado do soro



Fonte: SMITH (2008).

De acordo com a APIL (2017), no setor lácteo o Brasil importa em torno de 50% do soro em pó que consome, já que as produções são insuficientes para atender a demanda interna, pois a maior parte das queijarias atua apenas com serviço de inspeção estadual, o que impossibilita dessa forma as indústrias de comprarem os soros.

### 2.3 Água de Maceração de Milho

A água de Maceração de Milho (AMM), também conhecida como milhocina, é um subproduto da indústria de moagem úmida do milho, sendo um substrato barato e disponível em grande escala que apresenta valores médios de DQO de  $14.000 \text{ mg L}^{-1}$  e DBO de cerca de  $11.000 \text{ mg L}^{-1}$  (LOSS et al., 2009).

A AMM é composta por proteínas, aminoácidos, vitaminas, açúcares redutores, ácidos orgânicos e minerais, sendo, atualmente, a principal aplicação em ração animal mas apresenta potencial de aplicação em processos biotecnológicos (CHIARI *et al.*, 2010; NGOME et al., 2019). Na Tabela 2 mostra a composição centesimal da AMM.

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias do Milho o consumo total de milho esperado para 2021 é cerca de 20.764 milhões de toneladas. Desse total, 9.590 milhões de toneladas destinados para consumo industrial, 7.840 milhões de toneladas para produção de etanol, 1.625 milhões de toneladas para consumo humano e 1.709 milhões de toneladas para consumo “*in natura*”, mostrando a grande geração de água de maceração de milho

(ABIMILHO, 2021). Contando que para esse processo que pode durar de 24- 48 horas um alto volume de água de 1,2 a 1,48 toneladas é utilizada para cada tonelada de milho (JACKSON e SHANDERA, 1995).

Os fatores que influenciam a duração desse processo vai depender do mix de produtos que serão produzidos, assim como da potência e eficiência dos equipamentos nas etapas posteriores (RAUSCH e EDKHOFF, 2016), mostrando assim a necessidade de buscar novas alternativas para este subproduto.

Pesquisas sugerem o uso da AMM para a produção de ácidos orgânicos, por via fermentativa (MADDIPATI et al., 2011), por ser considerada uma fonte econômica de nutrientes para microrganismos (CHIANI et al., 2010).



Tabela 2 - Composição centesimal da água de maceração de milho (AMM)

Propriedades gerais	Valores	Propriedades gerais	Valores
Proteína	20,5 %	Umidade	47,5 %
Carboidratos	13,22 %	Fibras	1 %
Lipídeos	1 %	Cinzas	8,8 %
Massa seca	52,5 %	pH	4-5
SST* (° Brix)	54,5		
Aminoácidos	Valores	Aminoácidos	Valores
Arginina	3,3 %	Glicina	5,1 %
Isoleucina	3,6 %	Metionina	1,9 %
Treonina	4 %	Leucina	11,3 %
Triptofano	0,2 %	Lisina	2,5 %
Tirosina	5,8 %	Histidina	2,8 %
Cisteína	1,9 %	Valina	3,4 %
Fenilalanina	4,4 %		
Minerais	Valores	Minerais	Valores
Cálcio	1 %	Potássio	4,5 %
Magnésio	1,5 %	Sódio	0,2 %
Fósforo	3,3 %	Cloro	0,18 %
Enxofre	0,58 %	Ferro	0,10 %
Vitaminas	Valores	Vitaminas	Valores
Tiamina	1 mg/kg	Ácido pantotênico	8 mg/kg
Riboflavina	5 mg/kg	Pirodoxina	2 mg/kg
Niacina	g/kg		

\* sólidos solúveis totais

Fonte: (CHIANI et al., 2010)

## 2.4 Objetivo de Desenvolvimento Sustentável e Química Verde

Uma tendência atual da indústria química é usar processos que atendam aos princípios da Química Verde, vertente da Química que tem como uma de suas principais ideias a

aplicação de recursos biodegradáveis, sem gerar resíduos tóxicos ao meio ambiente (NGOME et al., 2019).

O termo química verde foi originalmente formulado por Anastas e seus colaboradores da agência americana de proteção ambiental (EPA) no início da década de 90, sendo oficialmente adotado pela EPA em 1993 (SOUZA MIRANDA, 2014).

De acordo com Castro e Verbel (2011), a química verde tem como filosofia de trabalho avançar em direção ao verdadeiro desenvolvimento sustentável, e eleva 12 princípios para atingir seus objetivos, que estão listados abaixo:

1. Impedir a criação de resíduos: É mais útil evitar ou reduzir a produção de lixo do que tratá-lo ou limpá-lo após a sua formação;
2. Maximizar a economia atômica: Os métodos sintéticos devem maximizar a incorporação de cada material usado no processo;
3. Realizar síntese química menos perigosa: Consiste na elaboração de processos que geram toxicidade mínima e impacto ambiental;
4. Projetar produtos e compostos menos perigosos: Os produtos químicos devem ser formulados com toxicidade mínima;
5. Usar solventes e condições de reação seguras: As substâncias auxiliares dos processos químicos (solventes, tampões, aditivos de separação, entre outros), devem ser inofensivas e seu uso deve ser minimizado;
6. Projetar para eficiência energética: Os requisitos de energia para processos químicos devem ser minimizados, onde serão avaliados quanto ao seu impacto ambiental e econômico e reduzidos ao máximo, tentando executar os métodos de síntese à temperatura e pressão ambiente;
7. Uso de matérias-primas renováveis: Os materiais utilizados devem provir de fontes renováveis, na medida em que seja econômica e tecnicamente viável;
8. Evitar derivados químicos: A síntese deve ser projetada com o uso mínimo de grupos de proteção para evitar etapas extras e reduzir o desperdício;
9. Uso de catalisadores: Os catalisadores devem ser usados o mais seletivo e reutilizável possível;
10. Projetar produtos facilmente degradáveis no final de sua vida útil: Os produtos químicos devem ser projetados de forma que, quando terminem sua função, não persistam no ambiente e possam ser degradados em derivados inertes ou biodegradáveis;

11. Monitorar processos químicos em tempo real para evitar contaminação: Sistemas de controle e monitoramento contínuos devem ser criados para impedir a produção de substâncias perigosas durante os processos; e
12. Prevenir acidentes: Projetar processos químicos, usando métodos e substâncias que reduzam acidentes (emissões, explosões, incêndios, entre outros) e minimizem os danos quando ocorrer um acidente.

Além dos objetivos da química verde, temos 17 objetivos de desenvolvimento sustentável no Brasil apoiado pelas Nações Unidas. Dentre estes objetivos, o 12º é assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis. Dentro desse objetivo, busca-se alcançar o manejo ambientalmente saudável dos produtos químicos e todos os resíduos, ao longo de todo o ciclo de vida destes, reduzindo significativamente a liberação destes para o ar, água e solo, para minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente, assim como até 2030, garantir que as pessoas, em todos os lugares, tenham informação relevante e conscientização para o desenvolvimento sustentável e estilos de vida em harmonia com a natureza (BRASIL, 2021).

Portanto, do ponto de vista ambiental os subprodutos da indústria de laticínios, que constituíam um problema econômico e ambiental podem ser valorizados e estão sendo explorados para múltiplas aplicações alimentares e não alimentares (REBOUILLAT, 2005, NGOME et al., 2021).

## **2.5 Propriedades Físico-Químicas e Aplicações do Ácido Propiônico**

O ácido propiônico é um ácido orgânico, corrosivo e incolor com odor pungente, que possui propriedades físicas que são entre aqueles dos ácidos fórmicos, carboxílico, ácidos graxos de cadeia longa e acético mais leves, representa as propriedades globais dos ácidos carboxílicos e forma compostos éster, amina, cloreto e anidrido, o ácido propiônico é solúvel em água, mas ocorre precipitação com adição de sal (o sal rompe a fase da água), as propriedades físicas e químicas do ácido propiônico podem ser vistas na Tabela 3 (AHMADI et al 2017).

Tabela 3 - Propriedades químicas e físicas do ácido propiônico

<b>Propriedades químicas e físicas</b>	
<b>Nome IUPAC</b>	Ácido propanoico
<b>Outros nomes</b>	Ácido etanocarboxílico, ácido propiônico
<b>Número CAS</b>	79-09-4
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
<b>Massa molar</b>	74,08 g /mol
<b>Aparência</b>	Líquido incolor
<b>Odor</b>	Ligeiramente rançoso
<b>Ponto de fusão</b>	-21°C
<b>Ponto de ebulição</b>	141°C
<b>Densidade</b>	0,99 g /cm <sup>3</sup>
<b>Solubilidade em Água</b>	Miscível
<b>Acidez (pKa)</b>	4,87
<b>Viscosidade</b>	10 mPa·s

Fonte: (AHMADI et al., 2017).

O ácido propiônico e seus sais de potássio, sódio e cálcio são utilizados como aditivos na alimentação animal, conservante de grãos e principalmente como agentes antifúngicos em alimentos humanos, em outros campos, o ácido propiônico pode ser usado para terapia animal e para a fabricação de perfumes, herbicidas, plásticos de celulose e agentes aromatizantes, segundo LIU et al. (2012).

## 2.6 Bactérias Propiônicas

As bactérias do gênero *Propionibacterium* foram isoladas e descritas na primeira metade do século XX por Eduard von Freudenreich, Orl-Jensen e van Niela, que classificaram esse gênero na classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales e família Propionibacteriaceae (PIWOWAREK et al., 2018).

O gênero *Propionibacterium* são diferenciados em dois grupos com base em seus biótopos naturais: “laticínios” (ou “clássicos”) e propionibactérias “cutâneas, sendo que as propionibactérias lácteas são isoladas do leite e produtos lácteos, e as propionibactérias cutâneas são comensais de mamíferos, incluindo seres humanos (AHMADI et al., 2015).

As propionibactérias são um grupo de bactérias Gram-positivas, e apresentam-se em forma de bastonetes curtos ou de cocos, de acordo com o meio em que se encontram (KIATPAPAN e MUROOKA, 2002), são anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, que são utilizadas há muito tempo em produção de queijo tipo suíço e vitamina B12, sendo que quatro espécies típicas de laticínios foram descritas precocemente: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* e *P. thoenii*, já as espécies mais estudadas de propionibactérias cutâneas são as do grupo *P. acnes* (THIERRY et al 2011). Como substrato as bactérias produtoras do ácido propiônico preferem usar o lactato do que a glicose (AHMAD et al 2019).

## 2.7 Produção e Inibição do Ácido Propiônico

A via do ácido dicarboxílico, também conhecida como via do succinato, tem o ácido propiônico como seu principal produto, sendo que este ácido orgânico e seus sais são capazes de inibir microrganismos (CORAL et al., 2008).

Um dos fatores que inibe a produção por fermentação do ácido propiônico é o próprio ácido propiônico, pois ele tem um forte efeito inibidor no crescimento da propionibactéria e na produção do ácido, mesmo com uma concentração muito baixa, como de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , como resultado da sua atividade antimicrobiana (MELO, 2007).

A visão predominante é que através da membrana celular, o ácido propiônico perturba o gradiente de pH, uma força motriz essencial para que os anaeróbios facultativos transportem nutrientes e metabólitos. Devido à natureza hidrofóbica do ácido propiônico e da membrana celular, o ácido não dissociado pode difundir-se através da membrana bacteriana para o citoplasma e depois dissociar-se em um ânion próton e propionato dentro da célula. Assim, o "vazamento" interno de prótons é criado, através da membrana celular a fim de manter o gradiente de prótons funcional, o trifosfato de adenosina extra (ATP) deve ser consumido pela  $\text{H}^+$ -ATPase para expulsar o próton, diminuindo o ATP disponível para o metabolismo celular. Portanto o crescimento de fungos filamentosos, leveduras e algumas bactérias é inibido, segundo (CORAL et al., 2008).

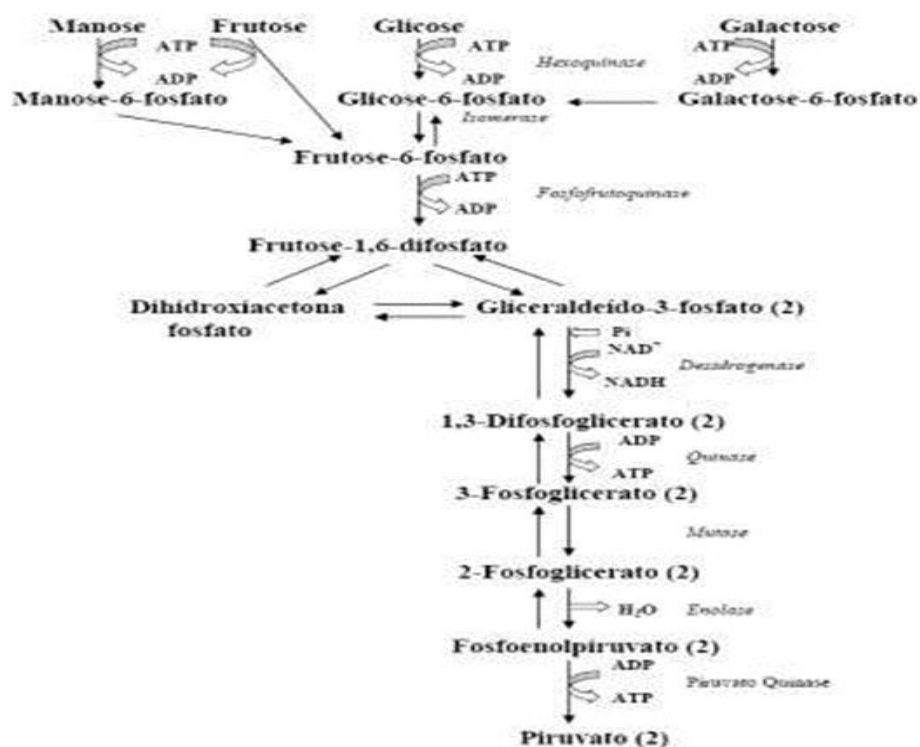
Devido à baixa concentração do produto final e ao rendimento e produtividade insatisfatórios, o desempenho dos sistemas de fermentação convencionais é limitado (ZHU et al., 2012), isso ocorre devido à forte inibição pelo produto final e à co-produção de outros subprodutos como ácido succínico e acético. No entanto buscando uma redução no custo do

produto, os esforços concentraram-se na utilização de subprodutos da matéria prima renovável com custo baixo para fermentação de ácido propiônico ou no uso de resíduos industriais (WANG YANG, 2013), podendo assim justificar as vantagens econômicas do produção biológica sobre a química (ZHU et al., 2012).

### 2.7.1 Biossíntese do Ácido Propiônico

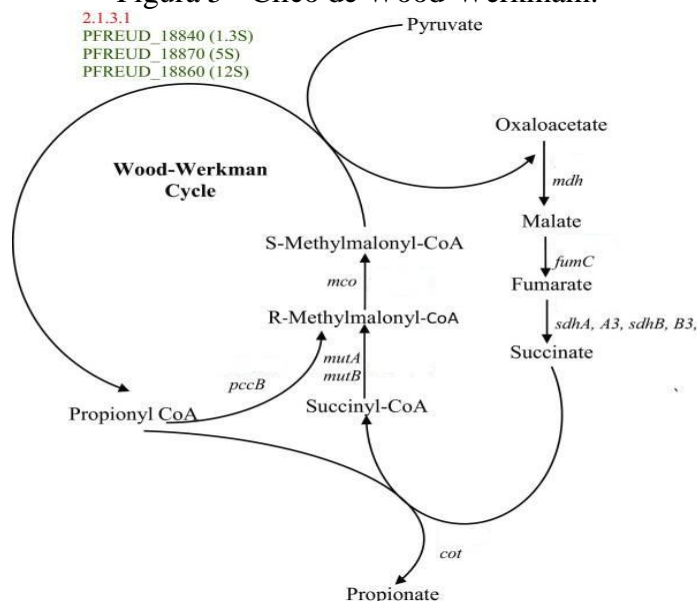
A lactose é um dissacarídeo que é composto por dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, que são hidrolisadas e transformadas em piruvato pela via glicolítica como mostrado na Figura 4. As vias de fermentação primária catabolizam diferentes fontes de carbono para o propionato, tendo como produtores nativo de propionato as vias do ciclo de Wood-Werkmam (GONZALEZ-GARCIA et al., 2017).

Figura 4 – Glicólise via Embden-Meyerhof-Parnas



Fonte: (KOZLOSKI, 2002)

Figura 5 - Ciclo de Wood-Werkman.



Fonte: (Gonzalez-Garcia et al., 2017).

A principal característica do ciclo de Wood-Werkman em *P. freudenreichii* é uma reação de transcarboxilação sem o envolvimento de  $\text{CO}_2$  livre. A enzima que catalisa a reação é uma metilmalonil-CoA carboxitransferase, transferindo um grupo carboxil da metilmalonil-CoA para o piruvato para formar oxaloacetato e propionil-CoA como posto na Figura. 5.

A via Wood-Werkman (Figura 5) começa com a transformação do piruvato gerado durante a glicólise em oxaloacetato na presença de metilmalonil-CoA carboxitransferase e complexo biotina- $\text{CO}_2$ . Então, oxaloacetato é reduzido através de malato e fumarato em succinato. No estágio seguinte, o succinato é acetilado pela succinil-CoA sintetase em succinil-CoA, que em cooperação com a coenzima B12 (cobalamina) e a metilmalonil-CoA mutase é transformado em metilmalonil-CoA, que leva a geração de propionil-CoA. A CoA transferase libera CoA de propionil-CoA, transformando-o em propionato (PIWOWAREK et al., 2018).

## 2.7.2 Produção de Ácido Propiônico por Fermentação

Diversos autores já investigaram e determinaram as melhores condições, de temperatura, tempo de fermentação e o pH ideal para a produção de ácido propiônico por *Propionibacterium*, que podem ser observados nas Tabela 4 e 5.

Tabela 4 - Produção de ácido propiônico por diferentes fontes de carbono

Fonte	Microrganismo	Tempo (h)	pH	Temperatura (°C)	Referência
Alcachofra	<i>P. acidipropionici</i>	200	6.5	32	Liang et al., (2012)
Farinha de trigo	<i>P. acidipropionici</i>	120-140- 168	6.0	37	Kagliwal et al., (2013)
	<i>P. acidipropionici</i>	140	6.0	32	Jiang et al., (2015)
lactose (leite)					
Glicerina	<i>P. acidipropionici</i>	120	6.5	30	Dishisha et al., (2012)
Glicose	<i>P. freudenreichii</i>	108	6.0	35	Chen et al., (2012)
Melaço	<i>P. freudenreichii</i>	144	6.5	30	Ahmadi et al., (2015)
Leite	<i>P. freudenreichii</i>	72	6.7	30,35 e 40	Farhadi et al., (2013)

Segundo NGOME et al. (2019), a fermentação convencional, para a obtenção de ácido propiônico, emprega habitualmente uma única matéria-prima. Contudo, na prática, uma única matéria-prima não atende completamente as exigências nutricionais para a produção de ácido propiônico. Fontes mistas de carbono e nitrogênio podem aumentar a produção de ácido propiônico, por meio de mudanças na composição do produto final e, conseqüentemente, na cinética da fermentação. NGOME et al. (2019) produziram AP usando-se cultura mista de *P. acidipropionicii* NRRL B-3568 e *L. paracasei*, a partir de soro de queijo Minas frescal e água de maceração de milho (AMM), com produção máxima do ácido propiônico de 6,85 g L<sup>-1</sup>, e rendimento de 0,21 g g<sup>-1</sup>, usando 40 g L<sup>-1</sup> de lactose e 65 g L<sup>-1</sup> de AMM. O aumento da água de maceração de milho favorece uma produção de ácido propiônico, mas também a de ácido láctico, enquanto o aumento da concentração de lactose favorece, especialmente, a produção de ácido láctico. O consumo de lactose foi de 98,0% em até 48 h. Mostrando que o uso de subprodutos lácteo e AMM em bioprocessos é promissor (FENG et al., 2010), analisaram os resultados da fermentação com pH constante e variação de pH em batelada simples e com



variação de pH em batelada alimentada. Os autores controlaram a fermentação com o pH a 6,5 em um período de 0 - 48h, e com isso observaram que maximizaram o crescimento celular, com elevados valores de ( $\mu_x$ ) velocidade específica de crescimento celular. Após 48h o pH foi diminuído naturalmente para 6,0 e mantido constante, e com isso observou-se que foram mantidos altos valores da ( $\mu_p$ ) velocidade específica da formação de AP, tornando assim essa estratégia benéfica para formação de AP na fermentação. Os autores verificaram que a produção de AP aumentou em 31,75% (de 14,58 para 19,21 g L<sup>-1</sup>), em comparação com o processo constante de pH 6,0. Ao mesmo tempo, a produtividade do ácido propiônico foi aumentada de 0,122 (pH 6,0) para 0,178 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> com esta estratégia. O tempo de fermentação foi reduzido de 120 para 108 h (40 g L<sup>-1</sup> de glicose), o que foi vantajoso na produção de AP com esta estratégia. A estratégia de controle de mudança de pH também foi benéfica para o crescimento celular, sendo que 8,38 g L<sup>-1</sup> de UFC foram obtidos no final da fermentação, em comparação com o processo em pH constante de pH 6,0 (8,05 g L<sup>-1</sup>). A fermentação em batelada alimentada com a estratégia de controle e mudança de pH aumentou ainda mais a produção de AP (25,23 g L<sup>-1</sup>) comparado com a fermentação em batelada simples (19,21 g L<sup>-1</sup>) com estratégia de controle e variação de pH, um aumento de 31,34%, com alta taxa de conversão de glicose em ácido AP (47,76%).

## **2.8 Variáveis do Processo Que Influenciam a Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium***

Vários fatores influenciam a fermentação do AP, entre eles incluem espécies de microrganismos, pH, temperatura, fontes de carbono, tipo e concentração de fonte de nitrogênio, tamanho do inóculo e tempo (AHMADI et al., 2017).

### **2.8.1 pH**

O pH é um dos fatores ambientais mais importantes na produção de ácido propiônico, sendo de extrema importância buscar o pH ideal para alcançar o resultado desejado.

*Propionibacterium* é muito suscetível ao pH, portanto, o controle do pH é importante, pois o crescimento é inibido em pH menor que 5,0 (CORAL et al., 2008). O pH também está relacionado com o crescimento celular, consumo de substrato, e a formação de subproduto,

sendo que para alcançar a produção de ácido propiônico com uma máxima eficiência de conversão de substrato e diminuir a formação de produtos secundários, é necessário uma otimização da produção de ácido propiônico em outras condições de pH.

### 2.8.2 Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais significativos que influenciam o rendimento da biossíntese de AP. Coral *et al* (2008) observaram que a produção de AP e biomassa eram superiores a 30 °C do que a 36°C. Farhadi *et al.* (2013) observaram que quando a temperatura era aumentada de 30 para 35 e 40 °C, a produção de AP e ácido acético diminuía, enquanto a biomassa celular aumentava. Como as taxas de reação bioquímica aumentam com a temperatura, a digestão termofílica é muito mais rápida que a mesofílica (KIM *et al.*, 2002). No entanto, de acordo com Zhang e Shen (2005), a mais indicada para produção de ácido propiônico é a faixa mesofílica, devido à condição próxima do ideal (35 °C) para o funcionamento dos catalisadores bioquímicos.

### 2.8.3 Fontes de Carbono e Nitrogênio

As propionibactérias são capazes de usar diferentes fontes de carbono incluindo glicose, frutose, maltose, sacarose, lactose, glicerol, melão e lactato (AHMADI *et al.*, 2017).

Coral *et al* (2008), mostraram o efeito de diferentes fontes de carbono (lactato, melão de cana e glicerol) na fermentação do AP. Os resultados mostraram que a concentração final máxima e a produtividade de AP foram obtidas do lactato. De fato, a produção de AP a partir do lactato foi mais rápida que a partir do melão, pois não precisa ser metabolizada pela via glicolítica. Outra clara vantagem do uso de lactato sobre melão de cana e glicerol é que ele não requer controle constante de pH devido à variação limitada de pH. A taxa máxima de crescimento celular, a produtividade, o rendimento e a concentração da biomassa produzida foram obtidos quando o melão de cana foi usado como substrato (esse recurso é desejado para a produção simultânea de AP e vitamina B12).

O tipo e a concentração da fonte de nitrogênio também afetam a produção microbiana de AP significativamente. Extrato de levedura, peptona e água de maceração de milho são boas fontes que podem ser usadas por *Propionibacterium* spp. (QUESADA-CHANTO, 1994). Fontes de nitrogênio na faixa de concentração de 40 g L<sup>-1</sup> foram utilizadas em diferentes

estudos para fermentação de AP, e as concentrações mais comumente aplicadas foram 5 e 10 g L<sup>-1</sup> por Coral et al. (2008), Zhang e Yang (2009), Zhu et al., (2010). NGOME et al. (2019), obtiveram melhores resultados na produção de ácido propiônico, com concentração de 65 g L<sup>-1</sup> de AMM.

#### **2.8.4 Tempo de Fermentação**

Segundo Ahmadi et al. (2017), a extensão do tempo de fermentação reduz a produtividade devido ao acúmulo de metabólitos inibitórios. Portanto, é muito crítico selecionar o momento ideal para o processo de fermentação, sendo que a produção de AP já foi relatada por diferentes tempos, como 48, 96, 120, 144 e 168 h, mas nenhum estudo abrangente sobre o tempo ideal foi relatado. A importância desse fator está diretamente relacionada à produtividade do ácido.

### **2.9 Modos de Condução da Fermentação**

Processos fermentativos classificados em batelada e batelada alimentada são descritos abaixo.

#### **2.9.1 Processo em Batelada**

Este processo também conhecido por processo descontínuo simples é muito utilizado devido à facilidade de operação em que todos os substratos de carbono e outros componentes são adicionados no início da fermentação, exceto os agentes de neutralização para o controle de pH.

O processo é realizado pela adição de um inóculo por fermentador, que se baseia no preparo do substrato apropriado ao crescimento do micro-organismo. A fermentação só tem início após o preenchimento do fermentador. A fermentação é considerada concluída quando cessa a atividade biológica por falta de nutrientes ou por excesso de produto inibidor. Esse tipo de fermentação pode levar a baixos rendimentos e produtividades, visto que o substrato exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam em razão de ser adicionado de uma só vez. Com isso esse tipo de processo fica limitado para fermentações sem inibição ou de bebidas alcoólicas, como na produção de

cachaça, de vinho e de cerveja (TOSETTO, 2002; CARVALHO; SATO, 2001; PORTO, 2005).

A grande vantagem desse processo são as boas condições de assepsia e a possibilidade de realizar a manutenção sempre que for necessário. Além de menores riscos de contaminação, este processo exprime grande flexibilidade de operação, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO; SATO, 2001; SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

### **2.9.2 Processo em Batelada Alimentada**

Também denominado por "cultura por processo descontínuo alimentado", se referindo a uma fermentação descontínua continuamente alimentada por açúcares (CARVALHO; SATO, 2001). O processo batelada-alimentada pode ser observado como a técnica em que, é realizada a adição de um ou mais nutrientes no meio de cultivo e no qual os produtos permanecem no mesmo até o final do processo (LESSMANN, 1993).

O processo em batelada alimentada tem por objetivo reduzir os problemas em relação à inibição da produção pela concentração de substrato ou por repressão catabólica (RODRIGUES, 2018). Os cultivos em batelada alimentada são comumente empregados para se obter elevada densidade celular e/ou máxima formação de produto (KLEMAN et al., 1991).

A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente, sendo que através desse mecanismo de alimentação o metabolismo microbiano é conduzido para determinada via metabólica levando ao acúmulo de um produto específico, trazendo uma melhoria na produção, mostrando que o processo em batelada alimentada pode ser vantajoso (CARVALHO; SATO, 2001).

### **2.10 Purificação do Ácido Propiônico**

São divididos em métodos químicos ou mecânicos, os mecanismos para tratamento do caldo de fermentação. Como processos químicos de separação tem-se cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia por interação hidrofóbica, extração com solventes e a eletrodialise, e como métodos físicos podem ser citados a filtração,

centrifugação, cristalização, evaporação, secagem, osmose reversa e a ultrafiltração (DECHOW, 1989; NOBLE; TERRY, 2004).

### 2.10.1 Cromatografia de Troca Iônica

Utilizada há pelo menos 50 anos com intuito de separar e purificar proteínas, a cromatografia de troca iônica, é uma modalidade da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (KARLSSO; HIRISH, 2011).

A técnica pode ser definida como um fenômeno físico-químico em que há uma troca de íons entre uma solução carregada (fase móvel) e um sólido poroso (fase estacionária) (GUICHON, 2002).

Os solutos com cargas opostas oriundos da fase móvel se adsorvem na fase estacionária que se encontra altamente carregada. A interação desses íons com a fase estacionária é mais elevada, estes podem ser seguidamente eluídos através do deslocamento por íons que possuem o mesmo tipo de carga, porém, com maior força iônica (SPADARO, 2006).

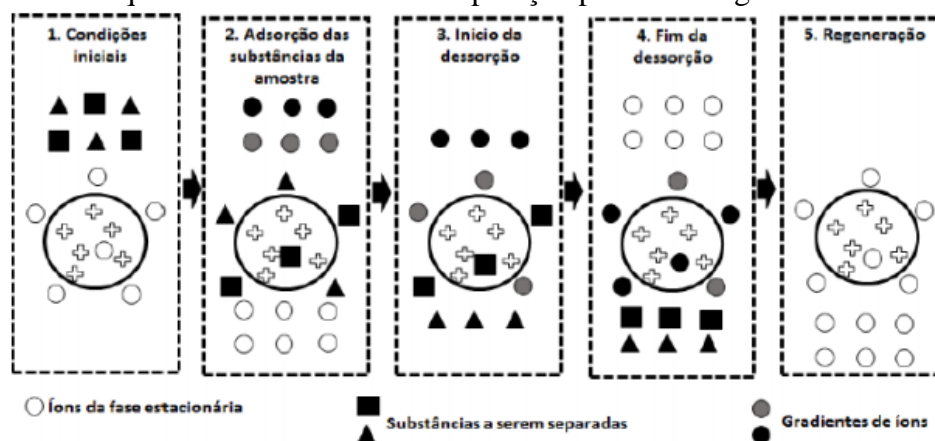
A utilização de resinas de troca iônica pode ser uma excelente alternativa, quando as moléculas que se deseja separar são substâncias ácidas ou básicas. Vários inconvenientes das extrações líquido-líquido e ácido-base podem ser minimizados usando-se a cromatografia de troca iônica (CTI), como por ex.: formação de emulsões de difícil separação, que comprometem a eficiência do processo de partição; limitação no uso do solvente de extração, já que os dois líquidos devem ser imiscíveis; extração de compostos não ácidos solúveis em água; custo elevado e periculosidade potencial para o operador em função de manipulação de volumes elevados de solventes, geralmente perigosos; baixa reprodutibilidade e dificuldades de automatização (BARRETO et al., 2005).

O processo de troca iônica é similar à uma reação estequiométrica. Para que ocorra adsorção de determinada quantidade de cargas de uma espécie (positivas ou negativas) à matriz, a mesma quantidade de cargas da outra espécie deve ser liberada (GALLANT, 2005). Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre a fase estacionária e os íons da fase móvel regem esse tipo de cromatografia (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Os experimentos de troca iônica são realizados em 5 fases principais que podem ser vistas na Figura 6.

Na primeira fase, ocorre um equilíbrio entre os trocadores de íons, o trocador iônico é conduzido a um estado inicial em termos de pH e força iônica, o qual permite a ligação das moléculas desejadas de soluto. Comumente se utiliza ânions e cátions simples como o cloro e o sódio como contra-íons, ou seja, aqueles íons que se encontram presentes na matriz. A segunda fase se dá pela aplicação e adsorção da amostra, onde os íons liberados são equivalentes aos íons adsorvidos, eles se diferem apenas pela posição e origem do sítio de troca. A terceira fase ocorre quando as substâncias que estavam adsorvidas são removidas, ou seja, dessorvidas pela troca do eluente. Esse processo pode ser feito mais rapidamente através da utilização de um gradiente crescente de concentração de um sal, força iônica. Já a quarta e quinta fases são a remoção, da coluna, de substâncias não eluídas sob condições experimentais prévias e o reequilíbrio para as condições iniciais para uma próxima purificação. Devido à diferentes graus de interação da substância com a fase estacionária é que a separação se faz possível, sendo que essas interações podem ser controladas pela força iônica, eluente, pH dentre outros (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002; YAGINUMA, 2007; MORAES, 2009).

Figura 6 - Esquema do mecanismo de separação por cromatografia de troca iônica



Fonte: Adaptado de YAGINUMA, (2007).

### 2.10.2 Criogéis

Dentre os novos materiais que tem sido empregado como coluna cromatográfica por troca iônica encontram-se os criogéis.

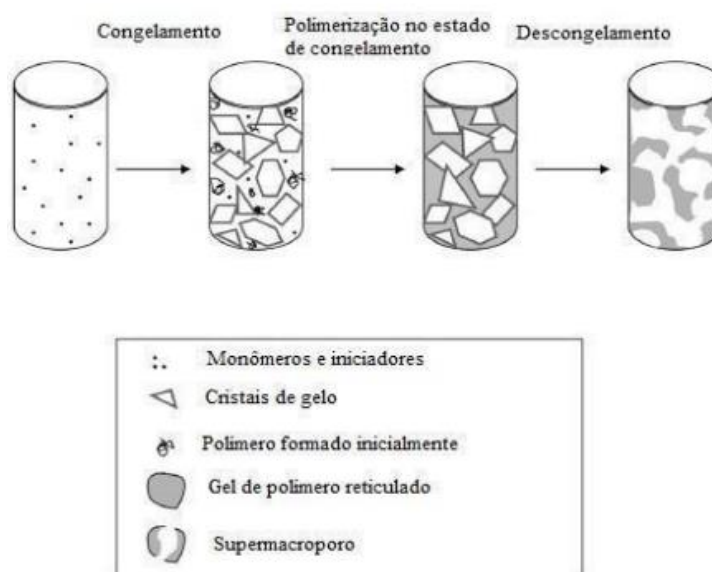
Devido à sua versatilidade, os materiais poliméricos macroporosos têm se destacado, podendo ser aplicados em diferentes áreas tais como química, biotecnologia, bioengenharia,

biologia, permitindo a purificação e um rápido isolamento de ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos e outras biomoléculas (ERTÜRK; MATIASSON, 2014).

Os criogéis são monólitos poliméricos que foram relatados pela primeira vez há 40 anos, e suas características distintas logo atraíram a atenção de vários pesquisadores. (LOZINSKY et al., 2001).

Os suportes formados por redes poliméricas e preparados em condições de congelamento (-10 °C a -20 °C) são considerados como o que há de mais moderno no setor de matrizes cromatográficas, sendo que os criogéis, têm sido cada vez mais utilizados devido à fácil preparação, excelentes propriedades de fluxo e alta performance quando comparado às matrizes convencionais, os mesmos possuem um sistema interconectado de poros variando de 10 a 100 µm e se caracterizam por suas propriedades como elevada porosidade, baixa queda de pressão e baixo tempo de residência nas etapas de adsorção e eluição (MÓL et al., 2017). O processo de síntese dos criogéis resultam em uma unidade com estrutura única (FONTAN, 2013). O criogel é obtido devido à polimerização de uma solução contendo monômeros e adicionada de catalisadores adequados, em condições criogênicas por uma técnica conhecida como criopolimerização. Ao se iniciar o processo de congelamento, os monômeros se concentram em uma microfase que ainda não se congelou. Dessa forma, ocorre um aumento na concentração dos monômeros, possibilitando a formação de um gel mais resistente. Os cristais de gelo formados atuam como agentes porogênicos, sendo que, após o seu descongelamento são formadas as cavidades dos criogéis acarretando na formação de uma estrutura esponjosa e macroporosa. A forma e o tamanho dos cristais de gelo serão responsáveis pela forma e tamanho dos poros conforme Figura 7 (LOZINSKY et al., 2001).

Figura 7 - Esquema da produção do criogel.



Fonte: PLIEVA et al., (2004).

Os criogéis são matrizes que podem ser funcionalizados objetivando apresentar um aumento em sua capacidade adsorptiva. Para a imobilização dos ligantes podem ser aplicados os métodos epóxi, base de Schiff, glutaraldeído, carbonildiimidazol, dissuccinimidil carbonato, hidrazida e brometo de cianogênio (MALLIK; HAGE, 2006).

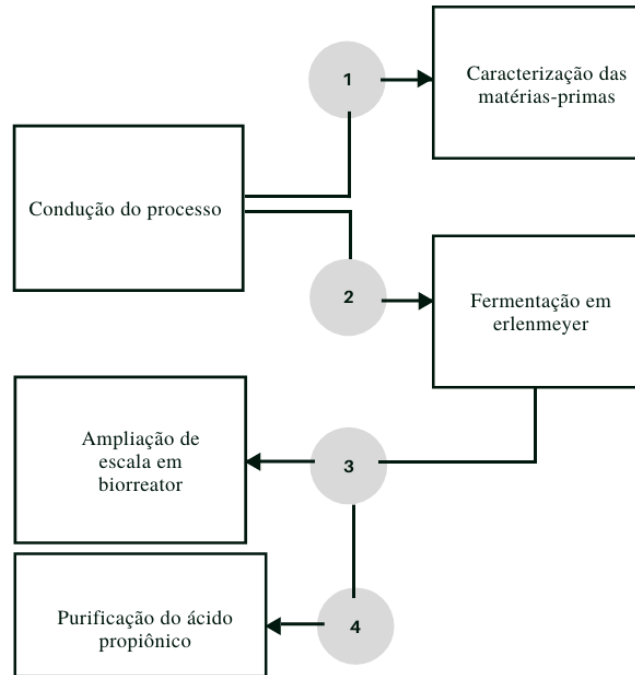
### 3 Cronograma de Desenvolvimento do Projeto de Dissertação

Esse projeto de dissertação foi conduzido em 4 etapas que podem ser vistas na Figura 8, e os resultados obtidos seguem divididos nos artigos 1 e 2. Primeiro foi realizado a caracterização centesimal das matérias-primas a serem utilizadas no processo fermentativo. Segundo, foi feito um pré-teste (fermentação em erlenmeyer) que foi composta por água de maceração de milho, permeado de leite desnatado e carbonato de cálcio. Na terceira fase, foi realizada fermentações em biorreator compostas por água de maceração de milho e permeado de soro de leite. O permeado de soro de leite estava disponível em maior escala no momento das fermentações, e também apresentou composição centesimal semelhante ao permeado de leite desnatado, assim foi utilizado na ampliação de escala. Após as fermentações foi



realizada a última etapa da pesquisa, que foi os testes de adsorção dos ácidos orgânicos utilizando criogéis de troca iônica em diferentes pH.

Figura 8 – Etapas do desenvolvimento da dissertação



Fonte: Própria autora (2021)

## REFERÊNCIAS

- ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias do Milho). **Consumo de milho humano e industrial do Brasil - 2021**. Disponível em: <  
<http://www.abimilho.com.br/estatisticas/consumo> >. Acesso em: 05 set. 2021.
- APIL RS, Soro, a riqueza desperdiçada: de descarte na fabricação de queijos à produto de alto valor industrial. **Revista Leite & Queijos**, Porto Alegre, v. 6, n. 33, p.8-12, abr. 2017.
- AHMAD, T.; AADIL, R. M.; AHMED, H. ur Rahman U, Soares BC, Souza SL, et al. Treatment and utilization of dairy industrial waste: a review. **Trends Food Sci Technol**, v. 88, p. 361-72, 2019. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.04.003
- AHMADI, Negin; KHOSRAVI-DARANI, Kianoush; MORTAZAVIAN, Amir Mohammad. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 67-75, 2017. Doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.04.004.
- AHMADI, Negin et al. Fed-batch fermentation for propionic, acetic and lactic acid production. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 581, 2015. DOI: 10.13005/ojc/310174.
- ANDAÇ, Müge; GALAEV, Igor Yu; DENIZLI, Adil. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **Journal of Chromatography B, [S. l.]**, v. 1021, p. 69–80, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.034>.
- BARILE, Daniela et al. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 9, p. 524-530, 2009. Doi: 10.1016/j.idairyj.2009.03.008.
- BARBOSA, A. dos Santos et al. Utilização do soro como substrato para a produção de aguardante: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, [S. l.]**, v. 5, n. 1, p. 07–25, 2010. ISSN: 1981-8203. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/240/240>.
- BURLANI, E. L.. **Avaliação do potencial da levedura *Kluyveromyces* spp. para biotransformação da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol.** [S. l.], p. 87, 2014.
- BRASIL. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs> Acesso em: Novembro de 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 53**, de 01 de Outubro de 2018. Diário Oficial [da] União, Brasília, 01 out. 2018.

CHAN, L. G.; COHEN, J. L.; BELL, J. M. L. N. de M.. Conversion of Agricultural Streams and Food-Processing By-Products to Value-Added Compounds Using Filamentous Fungi. **Annual Review of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 503–523, 2018. ISSN: 1941-1413. DOI: 10.1146/annurev-food-030117-012626.

CHEN, Fei et al. Propionic acid production in a plant fibrous-bed bioreactor with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. **Journal of biotechnology**, v. 164, n. 2, p. 202-210, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.025>.

CHIANI, M. et al. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 13, n. 23, p. 1151-1155, 2010.

CORAL, J.; KARP, S. G.; VANDENBERGHE, L. P. de; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.. Batch fermentation model of propionic acid production by *propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 151, n. 2–3, p. 333–341, 2008. ISSN: 02732289. DOI: 10.1007/s12010-008-8196-1.

JACKSON, D. S.; SHANDERA JR, D. L.. **Advances in food and nutrition research**, vol. 38. [S. l.], v. 38, n. December, p. 1487–1488, 1995. ISBN: 9781461582571.

JESUS, C.-S. A.; VALLE-GONZÁLEZ, E. R.; DANIEL, S.-F. R.; SHARMA, Ashutosh. Biotechnological Alternatives for the Utilization of Dairy Industry Waste Products. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, [S. l.], v. 06, n. 03, p. 223–235, 2015. ISSN: 2156-8456. DOI: 10.4236/abb.2015.63022.

SOUZA, M. A.; MIRANDA, S. M Continuous flow reactions: From green chemistry towards a green. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 34–43, 2014. ISSN: 19846835. DOI: 10.5935/1984-6835.20140004.

DISHISHA, ALVAREZ, HATTI-KAUL, Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 118, p. 553–562, 2012. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.079. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.079>.

DJAS, M.; HENCZKA, M.. Reactive extraction of carboxylic acids using organic solvents and supercritical fluids: A review. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 201, p. 106–119, 2018. ISSN: 18733794. DOI: 10.1016/j.seppur.2018.02.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.010>.

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. (2014). Ferramentas versáteis para criogéis em biosseparação. **Journal of Chromatography A**, 1357, 24-35. doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.055

FARHADI, S.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MASHAYEKH, M.; MORTAZAVIAN, M.; MOHAMMADI, SHAHRAZ, Production of propionic acid in a fermented dairy beverage.

**International Journal of Dairy Technology**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 127–134, 2013. ISSN: 1364727X. DOI: 10.1111/1471-0307.12004.

FENG, XU, YAO, LI, ZHU, OUYANG, Kinetic analysis and pH-shift control strategy for propionic acid production with *freudenreichii* CCTCC M207015. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 160, n. 2, p. 343–349, 2010. ISSN: 02732289. DOI: 10.1007/s12010-008-8300-6.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A.. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 23, p. 8915–8922, 2010. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.125. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.125>.

GUIOCHON, Georges. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1168, p. 101–168, 2007. ISSN: 00219673. ISBN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.05.090.

GONZALEZ-GARCIA, R.; MCCUBBIN, T.; NAVONE, L.; STOWERS, C.; NIELSEN, L.; MARCELLIN, E.. Microbial Propionic Acid Production. **Fermentation**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 21, 2017. DOI: 10.3390/fermentation3020021.

ISMAIL, E.; KHANEGHAH, A. M.; HASHEMI, S. M. B.; KOUBAA, M.. Current advances in biological production of propionic acid. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 635–645, 2017. ISSN: 15736776. DOI: 10.1007/s10529-017-2293-6.

JAGANMAI, G.; JINKA, R.. Production of Lipases from Dairy Industry Wastes and its Applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 67–73, 2017.

JAYAMUTHUNAGAI, J.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M.; GAUTAM, P. D-Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 235, p. 250–255, 2017. ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.03.123. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.123>.

JIANG, L.; CUI, H.; ZHU, L.; HU, Yi; XU, X.; LI, S.; HUANG, H.. Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized *Propionibacterium acidipropionici* and the role of trehalose synthesis in acid tolerance. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 250–259, 2015. ISSN: 14639270. DOI: 10.1039/c4gc01256a.

RAUSCH, S. R.. **Learn more about Dry Milling Dry Milling**. [S. l.], 2016.

KAGLIWAL, D.; SURVASE, A.; SINGHAL, S.; GRANSTRÖM, Wheat flour based propionic acid fermentation: An economic approach. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 129, p. 694–699, 2013. ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.154. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.154>.

KIATPAPAN, P.; MUROOKA, Y.. **Genetic Manipulation System in Propionibacteria**. [S. l.],

*l.*], v. 93, n. 1, p. 1–8, 2002.

KIM, M.; A., Y.- SPEECE, R. E **Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion ; mesophilic vs . thermophilic.** [*S. l.*], v. 36, p. 4369–4385, 2002. ISBN: 1615322434.

KLEMAN, G. L.; CHALMERS, J.; LULI, W.; STROHL, R A **Predictive and Feedback Control Algorithm Maintains.** [*S. l.*], v. 57, n. 4, p. 910–917, 1991.

KOZLOSKI, V. G.. Bioquímica microbiana ruminal. In: **Bioquímica dos ruminantes.** 1 ed. Santa Maria: UFMS, 2002, cap. 1, p. 140p.

LI, Xiaolian; WEI, Liqun; WANG, Ziqiang; WANG, Yunshan; SU, Zhiguo. Efficient co-production of propionic acid and succinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* using membrane separation coupled technology. **Engineering in Life Sciences**, [*S. l.*], v. 21, n. 6, p. 429–437, 2021. ISSN: 16182863. DOI: 10.1002/elsc.202000103.

LIANG, X.; LI, L.; LI, S.; CAI, Y. H.; YANG, S. T.; WANG, J. F.. Enhanced propionic acid production from Jerusalem artichoke hydrolysate by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a fibrous-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [*S. l.*], v. 35, n. 6, p. 915–921, 2012. ISSN: 16157591. DOI: 10.1007/s00449-011-0676-y.

LIU, Z.; MA, C.; GAO, C.; XU, P.. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 114, p. 711–714, 2012. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.118. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.118>.

LOSS, E.; ROYER, A. R.; BARRETO-RODRIGUES, M.; BARANA, A. C.. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, [*S. l.*], v. 166, n. 2–3, p. 1522–1525, 2009. ISSN: 03043894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.11.014.

MADDIPATI, ATIYEH, K.; BELLMER, Danielle D.; HUHNEKE, L **Bioresource Technology Ethanol production from syngas by Clostridium strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract.** **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 102, n. 11, p. 6494–6501, 2011. ISSN: 0960-8524. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.047. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.047>.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 94, de 18 de Setembro de 2020.** Diário Oficial [da] União, Brasília, 18 set. 2020.

MELO, Marcelo Rodrigues de. **Propionic acid production in cheese whey by ruminal bacteria.** 2007. 3 f. Dissertação (Mestrado em Associações micorrízicas; Bactérias lácticas e probióticos; Biologia molecular de fungos de interesse) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MÓL, Paula Chequer Gouveia et al. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.032>.

NASCIMENTO, W. C. A. Do; MARTINS, M. L. L.. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 582–588, 2006. ISSN: 0101-2061. DOI: 10.1590/s0101-20612006000300016.

CASTRO, N. P. P.; VERBEL, J. T. O.. Química verde: un nuevo reto. **Ciencia e ingeniería Neogranadina**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 169–182, 2011.

NGOME, M. T. **Aproveitamento de Subprodutos da Indústria de Alimentos para Produção de Ácido Propiônico por Fermentação e Purificação Usando Sistemas Aquosos Bifásicos**. 110 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

NGOME, Moisés Tomás et al. Biosynthesis of propionic acid using whey and calcium carbonate by mixed culture of *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 4, p. 811-822, 2021.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R.. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 345–364, 2013. ISSN: 07388551. DOI: 10.3109/07388551.2012.709482.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v.27, n.10-11, p.828-836, 2004.

PIWOWAREK, K.; LIPÍŃSKA, E.; HAĆ-SZYMAŃCZUK, E.; KIELISZEK, M.; ŚCIBISZ, I. *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 515–538, 2018. ISSN: 14320614. DOI: 10.1007/s00253-017-8616-7.

PIWOWAREK, Kamil et al. Use of *Propionibacterium freudenreichii* T82 strain for effective biosynthesis of propionic acid and trehalose in a medium with apple pomace extract and potato wastewater. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3965, 2021.

POLAT, S.; SAYAN, P. Assessment of propionic acid adsorption performance on the phase transformation of calcium sulfate hemihydrate to dihydrate. **Separation Science and Technology** (Philadelphia), v. 53, n. 13, p. 1966–1978, 2018.

QUESADA-CHANTO, A. et al. Microbial production of propionic acid and vitamin B 12 using molasses or sugar. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 378-383, 1994.

REBOUILLAT, S. O.-R.. S. Bigger data open innovation: Potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry. Review. **Green Chemistry**, [S. l.], p. 471–472, 2005. DOI: 10.1016/b0-12-369400-0/00463-4.

SMITHERS, Geoffrey W. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold”. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 695–704, 2008. ISSN: 09586946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.03.008.

RODRIGUES, T.V.D. **Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoides em meio agroindustrial por *Rhodotorula mucilaginosa***. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2018.

SILVA, A. H.; Miranda, E. A. Adsorption/Desorption of Organic Acids onto Different Adsorbents for Their Recovery from Fermentation Broths. **J. Chem. Eng.** v. 58, 1454–1463, 2013.

SINGH, Sudhanshu et al. Process Intensification of Propionic Acid Separation–Effect of Channel Geometry on Microchannel Distillation. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 169, p. 108599, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108599>

THIERRY, Anne et al. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. **International journal of food microbiology**, v. 149, n. 1, p. 19-27, 2011. [Doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026).

WANG, Zhongqiang; YANG, Shang-Tian. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. **Bioresource technology**, v. 137, p. 116-123, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.012>.

WERPY, Todd; PETERSEN, Gene. **Top value added chemicals from biomass: volume I--results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**. National Renewable Energy Lab., Golden, CO (US), 2004.

YANG, H.; WANG, Z.; LIN, M.; YANG, S. T.. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 250, n. October 2017, p. 1–9, 2018. ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.11.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SILVA-ALVES, A.; SPADOTI, L. M.; MASSAGUER-ROIG, S.. **Revista Indústria de Laticínios Número 103**, jul/ago 2013, p. 42-47. ISSN 1678-7250

ZHANG, An; YANG, Shang-Tian. Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 766-773, 2009.

ZHANG, Yongfang; SHEN, Jianquan. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 4, p. 441-446, 2006.

ZHU, Linqi et al. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource technology**, v. 112, p. 248-253, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.055>.

ZHU, Yunfeng et al. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8902-8906, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.070. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.070>.



## PARTE 2

### Artigo 1

#### **Caracterização e fermentação de permeado de leite desnatado e água de maceração de milho para obtenção de ácido propiônico por *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC 6207**

Na indústria de alimentos e química, a demanda por ácido propiônico tem aumentado nos últimos anos. Atendendo aos princípios da Química Verde, processos fermentativos utilizando matérias-primas renováveis tem atraído atenção para uma produção sustentável de ácido propiônico. Atualmente, esse ácido é obtido por síntese química a partir de matéria-prima derivada do petróleo, o que causa preocupação devido aos impactos ambientais. Esse trabalho teve por objetivo estudar a cinética da fermentação propiônica usando permeado de leite desnatado como fonte principal de carbono e *Propionibacterium freudenreichii*. O experimento foi realizado a 30 °C por 120 h em triplicata em erlenmeyers contendo 65 g L<sup>-1</sup> de permeado de leite desnatado e 40 g L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e carbonato de cálcio, respectivamente. A cada 24 h foram retiradas amostras para análises de acidez total titulável, pH e lactose, e nos tempos de 0 e 120h para contagem celular e determinação dos ácidos orgânicos, sendo o plaqueamento realizado em ágar lactato em anaerobiose. Observou-se que a acidez aumentou de 0,10 g L<sup>-1</sup> para 0,23 g L<sup>-1</sup>, houve declínio do pH de 6,26 a 5,45 e da concentração de lactose, de 33 para 22 g L<sup>-1</sup>, em 120 h de fermentação. Pode-se observar um crescimento total de bactérias propiônicas no processo fermentativo de 7,77 para 9,2 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. Conclui-se então que o permeado de leite desnatado pode ser utilizado como fonte de carbono na fermentação propiônica, sendo uma alternativa de aproveitamento para esse subproduto da indústria de laticínios.

**Palavras-chaves:** fermentação propiônica; soro de leite ultrafiltrado; água de maceração de milho.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o ácido propiônico é produzido por síntese química de matérias-primas derivada do petróleo (matérias-primas não renováveis) (DISHISHA; ALVAREZ; HATTI-KAUL, 2012) que causam danos ao meio ambiente. O ácido propiônico é um ácido carboxílico importante com amplas aplicações. Aproximadamente 70% do ácido propiônico é usado como conservante de ração humana ou animal. O ácido propiônico também pode ser usado na fabricação de plásticos de celulose, perfumes, herbicidas e produtos farmacêuticos (WANG et al., 2015).

Devido aos impactos ambientais da matéria-prima derivada do petróleo e seus processos de fabricação, a obtenção de ácido propiônico de base biológica via fermentação por propionibactérias é de grande interesse (YANG et al., 2018).

Vários fatores influenciam a concentração e a produtividade do ácido propiônico, como condições de cultura, tipo e escala do biorreator; entretanto, o valor do pH e a temperatura são os mais importantes. Dado que existem muitos relatórios sobre a produção de ácido propiônico a partir de glicose, permeado de soro de leite, glicerol, ácido láctico, hemiceluloses, fubá de milho hidrolisado, lactose, melão de cana-de-açúcar e farinha de trigo integral hidrolisada enzimaticamente, apenas alguns artigos de revisão avaliam aspectos biotecnológicos, ou seja, variáveis de bioprocessos (RANAIEI et al., 2020).

Esse trabalho teve por objetivo estudar a cinética da fermentação propiônica em erlenmeyer usando permeado de leite desnatado como fonte principal de carbono, água e maceração de milho como fonte de nitrogênio e *Propionibacterium freudenreichii* para posterior ampliação de escala em biorreator.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A fermentação foi realizada utilizando permeado de leite desnatado (PLD) e água de maceração de milho (AMM), dois subprodutos da indústria alimentícia. O permeado foi doado pelo laticínio Verde Campo localizado na cidade de Lavras-MG e a água de maceração de milho foi doada pela indústria Ingredion localizada em Mogi Guaçu-SP. O microrganismo, *Propionibacterium freundenreichii* subsp ATCC 6207 foi adquirido junto à Coleção de Culturas Tropical pertencente à Fundação André Tosello, de Campinas-SP. Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Análise de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras.

### 2.1 Caracterização do Subproduto Industrial Utilizado no Processo Fermentativo

O permeado de leite desnatado (PLD) fresco foi filtrado visando retirar micelas de proteínas remanescentes, homogeneizado e armazenado sobre congelamento até o momento da análise.

#### 2.1.1 Caracterização do Permeado de Leite Desnatado

O teor de umidade do PLD foi determinado por secagem em estufa até peso constante a 105 °C (AOAC, 1997). A fração lipídeos foi obtida empregando o método de Gerber, a leitura foi feita em escala graduada do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria (IAL, 2008). Foi feita análise de nitrogênio total seguindo a metodologia de Kjeldhal descrita pela 037/IV do IAL (2008). Utilizou-se um fator de correção de 6,25 para estimar o teor de proteínas totais. Para a determinação de cinzas foi utilizado o método 018/IV IAL (2008), a amostra foi carbonizada totalmente com auxílio de uma mufla a (550 °C). A fração glicídica foi calculada por diferença (AOAC, 2000). O pH foi monitorado utilizando um pHmetro de bancada (Tecnopon, modelo mPA-210, Brasil).

A acidez total foi determinada por titulometria, com hidróxido de sódio 0,1 mol/L, utilizando uma solução de fenolftaleína 1% como indicador (AOAC, 1990). A densidade foi medida usando um picnômetro (AOAC, 2005).

## 2.2 Ativação, estoque e padronização do inóculo

Para ativação a cultura armazenada em eppendorf de *Propionibacterium freundenreichii* subsp ATCC 6207 foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo lactato, previamente esterilizado à temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Este tubo foi incubado a 30 °C por 48 h. Em seguida, para ser utilizado na propagação foi transferida uma alíquota de 10 mL deste tubo para um Erlenmeyer contendo 90 mL de caldo lactato composto por (extrato de levedura, peptona de carne, fosfato de potássio e lactato de sódio). Os mesmos foram incubados à temperatura de 30 °C em estufa BOD durante 24 h. Para propagação a cultura foi inserida em eppendorfs, centrifugadas a 15.000g em centrífuga (SPINLAB, modelo SL-5AM). Os sobrenadantes foram retirados e adicionou-se 1 mL de meio congelante previamente esterilizado. O meio congelante era composto por glicerol (15%), peptona bacteriológica (0,5%), extrato de levedura (0,3%), NaCl (0,5%) e seu pH foi ajustado para 7,0.

A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. O inóculo armazenado em eppendorf sob congelamento foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo lactato esterilizado e incubado a 30 °C por 48 h. Posteriormente 500 µl desse conteúdo foi transferido ao Erlenmeyer contendo 300 mL de caldo lactato esterilizado, onde a cultura foi incubada a 30 °C sendo realizada leituras periódicas em espectrofotômetro ( $\lambda=600$  nm) a cada 3 horas em um período de 36 h, e plaqueamento em ágar lactato, seguido de incubação a 30 °C por 72 h. As culturas foram padronizadas para a fermentação com base na correlação entre absorbância e o número de células viáveis, correspondente a uma contagem de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

## 2.3 Condução da Fermentação em Erlenmeyer

O meio fermentado (300 mL) foi composto por permeado PLD e AMM conforme os melhores resultados obtidos por NGOME et al. (2021), concentração de lactose de 40 g L<sup>-1</sup> e 65 g L<sup>-1</sup> de AMM.

Nos tempos 0, 24, 48, 72 e 120 horas, foram coletados 10 mL do meio fermentado em tubos de centrífuga e 0,1 mL em eppendorfs, para cada uma das três repetições de cada amostra ou ensaio.

O volume de 10 mL foi centrifugado a 3000 rpm (1428 g) por 20 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de ensaio com rosca, e posteriormente congelados para posteriores estudos cinéticos da fermentação (em triplicata), para verificar a produção dos ácidos graxos (propiónico, láctico, succínico e acético), e para análises de acidez total titulável, lactose e pH. As amostras em eppendorfs foram utilizadas para determinação do número de organismos viáveis. As análises dos ácidos e contagem foram realizadas nos tempos 0 e 120 h por se tratar de pré-teste.

## **2.4 Análise do meio fermentado**

### **2.4.1 Determinação dos parâmetros físico-químicos**

As amostras de meio fermentado obtidos ao longo das fermentações em biorreator foram analisadas quanto a concentração de lactose pelo método do Ácido Dinitrossalicílico (MILLER, 1959). E o pH foi mensurado usando um pHmetro de bancada (Tecnopon, modelo mPA-210, Brasil).

### **2.4.2 Determinação da viabilidade celular**

As amostras do meio foram diluídas com água peptonada, previamente esterilizada. Um alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas. Para determinar o número de organismos viáveis foi utilizado o método de plaqueamento por profundidade (*pour-plate*) em meio ágar lactato. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose, posteriormente em estufa microbiológica a 30 °C por 3 dias. O número de organismos viáveis foi determinado pela técnica de contagem total de células nas placas com número de colônias entre 25 e 250 (SWANSON et al., 2001).

### 2.4.3 Determinação dos ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), com amostrador automático (SIL-20AHT). Foi utilizada uma coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm x 9,0 µm), equipada com pré-coluna. A fase móvel usada foi uma solução de ácido perclórico em água ultrapura a 100mM, com fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> a 40 °C e tempo de corrida de 30 min. Os ácidos foram detectados por análise espectrofotométrica a 210 nm. A identificação e quantificação dos ácidos foi feita utilizando os respectivos padrões dos ácidos propiônico, acético e láctico. Todos os padrões apresentavam pureza de 99,9% (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram diluídas 1/20 e filtradas com filtro de 0,22 µm para posterior análise (NGOME, 2017). Os resultados foram processados com ajuda do software LC-Solutions.

### 2.5 Determinação do rendimento, produtividade e fator de crescimento do processo fermentativo

O rendimento ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade (Pr) para os ácidos propiônicos e acético e o fator de crescimento (FC) foram calculados de acordo com as equações 1 e 2.

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{(S_0 - S)} \quad (1)$$

$$Pr = \frac{(P - P_0)}{t_f} \quad (2)$$

Em que P é a concentração final de ácido (g L<sup>-1</sup>); P<sub>0</sub> - concentração inicial de ácido (g L<sup>-1</sup>); S - concentração final de substrato (g L<sup>-1</sup>); S<sub>0</sub> - concentração inicial de substrato (g L<sup>-1</sup>); Pr - produtividade; t<sub>f</sub> - tempo de fermentação (h).

## 2.6 Análise estatística

Os ensaios de fermentação conduzidos no biorreator foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos para as análises físico-químicas do meio fermentado ao longo da fermentação e para a purificação do meio fermentado foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de média Tukey a 95 % de significância com o auxílio do *software* R (versão 4.1.1) ( R Core Team, 2021). Os gráficos foram plotados usando o *software* SigmaPlot versão 11 (Systat Software, Inc., San Jose, EUA).

## 3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 3.1 Composição Centesimal

A Tabela 1 apresenta a composição físico-química do permeado de leite desnatado utilizado para produção de ácido propiônico por meio de fermentação usando *Propionibacterium freudenreichi*.

Tabela 1- Caracterização físico-química e centesimal da amostra de permeado de leite desnatado

Análises	PLD
Umidade (%)	95,34±0,02
Lipídios (%)	0,00±0,00
Proteína (%)	0,27±0,00
Fibra Bruta (%)	**
Cinzas (%)	0,64±0,00
Carboidratos (%)	3,75±0,88
pH	6,72±0,00
ATT (***)	0,05±0,00
Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	1,02± 0,001

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

\*\* Não se aplica. \*\*\* Acidez titulável por mL de NaOH 0,1M/L.

Fonte: Própria autora (2021)

Dentre as amostras analisadas nesta pesquisa, o valor médio encontrado para umidade de 95,34 g/100 g foi bem próximo ao valor encontrado por Fontes et al., (2015), de 97,36 g/100 g para permeado de leite desnatado. Para a variável lipídios, o valor encontrado de 0g /100 g, foi próximo ao valor encontrado por Andrade et al. (2002) que obtiveram teor de lipídios menor que 0,1 g/100 g. Por se tratar de permeado de leite o resultado obtido está condizente ao resultado esperado, sendo que o processo tecnológico aplicado para sua obtenção tem como finalidade a retirada de lipídios por ultrafiltração (BRASIL, 2018). O resultado obtido para proteínas de 0,27g /100 g (aproximadamente 2,76 g L<sup>-1</sup>) foi superior ao valor encontrado pelo mesmo autor de 0,087 g/100 g, e mais próximo ao encontrado por Andrade et al. (2002) de 0,50 g/100 g para permeado de soro de leite (PSL). Tratando-se de permeado o teor de proteína esperado é sempre o menor possível.

Analisando os dados obtidos verifica-se que o teor de cinzas encontrados no presente estudo de 0,64 g/100 g (6,53 g L<sup>-1</sup>) foi superior ao valor encontrado por Fontes et al., (2015), de 0,41g /100 g, e próximo ao valor encontrado por Yadav et al. (2015) de 5,0 g L<sup>-1</sup> (0,5 g /100 g) para PSL. Para o teor de carboidratos do PLD no presente estudo foi encontrado 3,75 g/100 g, valor esse superior ao encontrado por Fontes et al. (2015) que encontraram média de carboidratos de 2,15 g/100 g, para PLD. A desigualdade entre os teores de carboidratos para PLD dessa pesquisa e PLD da literatura pode ser remetida a composição química inicial das matérias-primas provocando maior ou menor degradação dos carboidratos.

Para a variáveis pH e acidez os valores encontrados no presente estudo para PLD de 6,72 e 0,05 sucessivamente estão próximos ao encontrado por Fontes et al. (2015) de 6,58 para pH e 0,056 para acidez total titulável.

A densidade encontrada de 1,02 g.mL<sup>-1</sup> foi de acordo com a densidade determinada por Figura e Teixeira (2007), no qual informa que a densidade da maioria dos alimentos, bem como de materiais agrícolas e biológicos é cerca de (1200 ± 300) kg.m<sup>-3</sup>). As diferenças observadas entre o presente estudo e as pesquisas citadas, podem estar relacionadas a origem da matéria prima, mistura de variedades, entre outros.

### 3.2 Pré-teste

Os resultados das análises das três repetições realizadas em erlenmeyer ao longo de 120 h estão apresentados na Tabela 2 e Figura 1.



Tabela 2 - Resultados da variação de lactose ( $\text{g.L}^{-1}$ ), contagem total de células  $\text{UFC.mL}^{-1}$  e ácidos orgânicos ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do tempo

<b>Tempo</b>	<b>Lactose</b>	<b>Log</b>	<b>Ác.Lático</b>	<b>Ác.Acético</b>	<b>Ác.Propiônico</b>
<b>(h)</b>	<b>(<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b><math>\text{UFC.mL}^{-1}</math></b>	<b>(<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>
0	33,11±4,98 <sup>a</sup>	7,77±0,32 <sup>a</sup>	7,72±0,12 <sup>a</sup>	0,87±0,80 <sup>b</sup>	0±0,00 <sup>b</sup>
24	32,11±3,61 <sup>a</sup>	**	**	**	**
48	30,89±3,48 <sup>a</sup>	**	**	**	**
72	27,89±5,03 <sup>a</sup>	**	**	**	**
96	22,87±5,46 <sup>a</sup>	**	0±0,00 <sup>b</sup>	4,47±1,91 <sup>a</sup>	4,92±1,50 <sup>a</sup>
120	23,14±3,45 <sup>a</sup>	9,02±0,15 <sup>b</sup>	0±0,00 <sup>b</sup>	5,08±2,17 <sup>a</sup>	5,26±1,56 <sup>a</sup>

Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

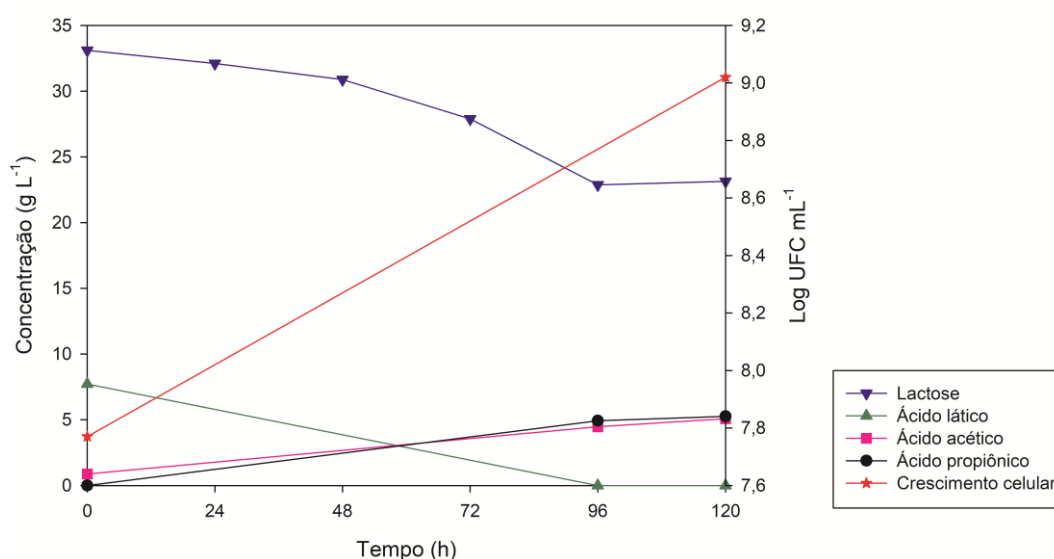
\*As letras minúsculas na mesma coluna correspondem a análise estatística (Teste Tukey). Letras diferentes correspondem a diferença significativa ao nível de 5% de significância, letras iguais são correspondentes a igualdade na medida nas análises realizadas. \*\* Não se aplica.

Fonte: Própria autora (2021)

Nota-se através da Tabela 2, que os resultados de consumo de lactose foram iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância, e houve diferença significativa na contagem total de células, consumo de ácido láctico, produção de ácido acético e propiônico.

Através da Figura 1, pode-se observar o crescimento total das bactérias propiônicas presentes no meio de fermentação, decréscimo progressivo da lactose de 33,11 para 22,87  $\text{g.L}^{-1}$  e também consumo total do ácido láctico presente no meio fermentativo. Com 96h observa-se que estabilizou a concentração de lactose e também o aumento da concentração dos ácidos acético e propiônico.

Figura 1- Concentração dos ácidos orgânicos, lactose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e contagem total de células ao longo do tempo



Fonte: Própria autora (2021)

Tabela 3 - Resultados das análises de acidez total e pH ao longo do tempo

Tempo (h)	ATT** ( $\text{g.L}^{-1}$ )	pH
0	1,00±0,02 <sup>b</sup>	6,26±0,11 <sup>a</sup>
24	1,20±0,02 <sup>b</sup>	6,30±0,03 <sup>a</sup>
48	1,50±0,00 <sup>b</sup>	5,71±0,02 <sup>b</sup>
72	2,40±0,06 <sup>a</sup>	5,47±0,01 <sup>c</sup>
96	2,30±0,00 <sup>a</sup>	5,44±0,01 <sup>c</sup>
120	2,30±0,00 <sup>a</sup>	5,45±0,01 <sup>c</sup>

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

\*As letras minúsculas na mesma coluna correspondem a análise estatística (Teste Tukey). Letras diferentes correspondem a diferença significativa ao nível de 5% de significância, letras iguais são correspondentes a igualdade na medida nas análises realizadas.

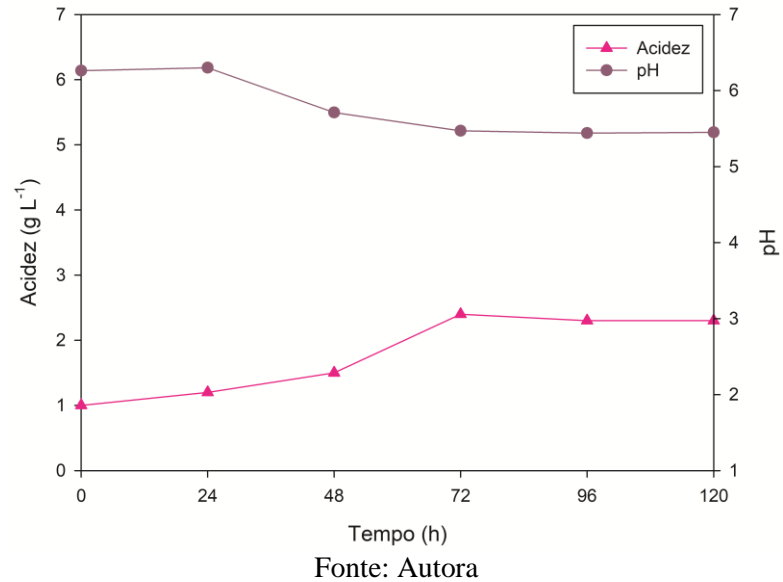
\*\* ATT (% de ácido propiônico)

Fonte: Própria autora (2021)

Um dos fatores mais importantes que influenciam na concentração e produtividade do ácido propiônico é o pH. Na Figura 2 e Tabela 3, pode-se observar a variação do pH e acidez ao longo do tempo de fermentação. Nota-se que nas primeiras horas não ocorreu alteração significativa do pH. A partir de 24h observa-se um decaimento progressivo do pH o que indica o início da produção dos ácidos orgânicos, e com 48 h o mesmo diferenciou-se estatisticamente ao nível de 5% de significância dos demais tempos, momento esse que teve

seu maior decréscimo de (6,30 para 5,71). Nota-se também que com 72 h de fermentação os valores de pH e acidez mantiveram-se constantes, sendo esse um indicativo do fim do processo fermentativo nesse tempo.

Figura 2 - Acidez ( $\text{g L}^{-1}$ ) e pH ao longo do tempo



A partir da Tabela 4, pode-se verificar uma relação entre os coeficientes de rendimento e produtividade dos ácidos acético e propiônico com 96 h de fermentação sendo que nesse tempo não se diferenciou estatisticamente do tempo de 120 h ao nível de 5% de significância.

Tabela 4 - Concentração de substrato, produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em erlenmeyer

<b>T</b> (h)	<b>[S]</b> (g.L <sup>-1</sup> )	<b>[P.AA]</b> (g.L <sup>-1</sup> )	<b>[P.AP]</b> (g.L <sup>-1</sup> )	<b>Y<sub>P/S</sub></b> AA (g.g <sup>-1</sup> )	<b>Y<sub>P/S</sub></b> AP (g.g <sup>-1</sup> )	<b>PpAA</b> (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<b>PpAP</b> (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0	33	1,16	0	0,331	0,492	0,046	0,052
96	23	4,47	4,92				
120	22	5,08	5,26				

[S] é a concentração de lactose, [P.AA] é a concentração de ácido acético, [P.AP] é a concentração de ácido propiônico, Y<sub>P/S</sub> AA é o rendimento do ácido acético, Y<sub>P/S</sub> AP é o rendimento do ácido propiônico, PpAA é a produtividade do ácido acético e PpAP é a produtividade do ácido propiônico.

Fonte: Própria autora (2021)

Observa-se através da Tabela 4, que as concentrações, rendimentos, e produtividades dos ácidos acético e propiônico ficaram próximas. Um fator que pode ter influenciado nesse resultado, é a variação do pH ao longo do tempo de fermentação.

Podemos verificar também que no presente trabalho a concentração de ácido propiônico de 4,92 g.L<sup>-1</sup>, foi inferior a produção alcançada por Ali et al., (2021) de 10 g.L<sup>-1</sup>.

No entanto, quando se compara os resultados obtidos dessa pesquisa referente ao rendimento e produtividade de ácido propiônico de 0,492 g.g<sup>-1</sup> e 0,052 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> respectivamente, nota-se valor superior ao encontrado por (ALI et al., 2021) de 0,084 g.g<sup>-1</sup> e próximo de 0,079 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> sucessivamente, que utilizaram como substrato ração vegana para cães e queijo de cabra moído como inóculo.

#### 4 CONCLUSÃO

No pré-teste realizado, notou-se que com 120 h de fermentação foi alcançada uma concentração de  $5,26 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido propiônico, e que no tempo de 72 h já não apresentava alterações no pH e acidez do meio de fermentação. Nota-se com esse resultado, que o PLD e AMM são subprodutos com grande potencial da indústria alimentícia que podem ser utilizados para uma produção mais sustentável de ácido propiônico.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. L. P. de; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2002, vol.22, n.3, pp.249-253. ISSN 1678-457X. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000300009>.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. v. 2, ed. 15, Washington, 1990.
- AOAC - Official methods of analysis of Association of official Analytical Chemist 16a ed. Washington. A.O.A.C. 1997. 288p.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis AOAC. 17.ed. Maryland, 2000.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of AOAC International. 18. ed. Washington: AOAC, 2005.
- ALI, Rowayda et al. Produção de ácido propiônico a partir de resíduos alimentares em reatores em batelada: efeito do pH, tipos de inóculo e pré-tratamento térmico. **Bioresource Technology** , v. 319, p. 124166, 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 53**, de 01 de Outubro de 2018. Diário Oficial [da] União, Brasília, 01 out. 2018.
- DISHISHA, Tarek; ALVAREZ, Maria Teresa; HATTI-KAUL, Rajni. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 118, p. 553–562, 2012. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.079. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.079>.
- FIGURA, L. O.; TEIXEIRA, A. A. **Food Physics: Physical Properties** - Measurement and Application. Berlin: Springer-Verlag, 2007.
- FONTES, Edimar Aparecida Filomeno et al. Milk ultrafiltration permeate-based electrolyte drink: physical, chemical and microbiological assessment during storage. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 342-348, 2015.. DOI: 10.1590/0103-8478cr20131432.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. ed. 4, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.
- MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. ISSN: 15206882. DOI: 10.1021/ac60147a030.

NGOME, Moisés Tomás et al. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, p. 543-550, 2017. DOI: 10.4025/actascitechnol.v39i5.29479.

NGOME, Moisés Tomás et al. Biosynthesis of propionic acid using whey and calcium carbonate by mixed culture of *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 4, p. 811-822, 2021. DOI: 10.1007/s43153-021-00143-0.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2021. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

RANAEL, Vahid et al. Propionic acid: method of production, current state and perspectives. **Food Technology and Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 115-127, 2020. DOI: 10.17113/FTB.58.02.20.6356.

SWANSON, K. M. J., PETRAN, R. L. E HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes, F. P. e Ito, K. (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 6, p. 53-67, 2001.

WANG, Zhongqiang et al. Engineering *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for enhanced propionic acid fermentation: Effects of overexpressing propionyl-CoA: Succinate CoA transferase. **Metabolic engineering**, v. 27, p. 46-56, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.10.005>.

YADAV, Jay Shankar Singh et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 756-774, 2015.. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>.

YANG, Hopen et al. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource technology**, v. 250, p. 1-9, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.11.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>.

### PARTE 3

#### Artigo 2:

Artigo a ser submetido para publicação na revista: FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY (ONLINE)

Luana Alves Tavares <sup>1</sup>. Ana Cristina F. de O. Meira <sup>1</sup>. Lizzy Ayra A. Veríssimo <sup>1</sup>. Fabricio L. da Silva <sup>1</sup>. Roberta H. Piccoli <sup>1</sup>. Luciano V. Paiva <sup>1</sup>. Olga Lúcia M. Bernal <sup>1</sup>. José Guilherme L. F. Alves <sup>1</sup>

**Biossíntese de ácido propiônico a partir de permeado de soro de leite e água de maceração de milho por *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC 6207 e purificação parcial usando criogéis de troca iônica**

#### Resumo

Neste estudo, foram conduzidas fermentações com permeado de soro de leite (PSL) e água de maceração de milho (AMM) para obtenção de ácido propiônico (AP) usando *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC 6207. Fermentações em batelada e em batelada alimentada foram realizadas a 30 ° C em biorreator de 5L com controle de pH e, no caso da batelada alimentada, também com controle da concentração de lactose, com retirada de amostras para análises dos ácidos orgânicos (acético, propiônico e láctico) e para contagem de bactérias propiônicas. Foram realizados testes de purificação do AP obtido através do uso de criogéis. Os criogéis foram funcionalizados com taurina (Tau-criogel) em diferentes pH (4,5, 6 e 7) e foram aplicados na purificação de ácido propiônico por cromatografia de troca iônica. Os resultados mostraram que a produção de AP foi melhor na batelada simples, com concentração, rendimento e produtividade de ácido propiônico de 13,10 g L<sup>-1</sup>, 0,335 g g<sup>-1</sup> e 0,182 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> sucessivamente com 72 h de fermentação. O pH 4 que apresentou maior capacidade de adsorção e recuperação de ácido propiônico (256,13 mg g<sup>-1</sup>) e (59,73) sucessivamente e menor capacidade de adsorção de ácido acético (29,34 mg g<sup>-1</sup>). Os resultados mostram que PSL e AMM são subprodutos promissores para produção de AP, assim como o uso de criogel para purificação.

**Palavras-chave:** fermentação propiônica; batelada alimentada, subprodutos da indústria de alimentos, purificação por criogéis.



## 1 INTRODUÇÃO

O ácido propiônico é muito utilizado nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica. De acordo com o Departamento de Energia dos EUA, o ácido propiônico está entre os 30 melhores produtos químicos utilizados como componentes para produtos com diversas aplicações (WERPY; PETERSON, 2004; DISHISHA et al., 2012). O ácido propiônico e seus sais de potássio, sódio e cálcio são utilizados como aditivos na alimentação animal, conservantes de grãos e principalmente como agentes antifúngicos em alimentos humanos, em outros campos o ácido propiônico pode ser usado para terapia animal e para a fabricação de perfumes, herbicidas, plásticos de celulose e agentes aromatizantes (LIU et al., 2012).

A produção deste ácido é realizada a partir de matéria-prima proveniente do petróleo (ISMAIL et al 2017) sendo uma fonte não renovável e que causa danos ao meio ambiente. O ácido propiônico também pode ser produzido por meio de processos fermentativos usando *Propionibacterium* (FENG et al., 2010a, 2010b; NGOME et al., 2017, 2021a; PIWOWAREK et al., 2021).

A obtenção de ácido propiônico a partir de processos biológicos é uma alternativa verde, por utilizar matérias-primas renováveis durante o processo fermentativo. Subprodutos alimentícios como água de maceração de milho e permeado de soro de leite podem ser utilizados como substratos de fermentação pois são fontes de nitrogênio e carbono (NASCIMENTO et al., 2006), que podem ser metabolizados pelas bactérias propiônicas (AHMADI; KHOSRAVI-DARANI; MORTAZAVIAN, 2017, NGOME et al., 2021). A riqueza de nutrientes desses subprodutos lhes confere inclusive um alto potencial poluidor quando descartados de forma incorreta, sendo o permeado de soro rico em lactose e a água de maceração de milho em muitos outros nutrientes, como proteínas, aminoácidos, vitaminas, açúcares redutores, ácidos orgânicos e minerais (AHMAD et al. 2019, SMITHERS, 2008 CHIANI et al., 2010).

Um entrave encontrado na produção do ácido propiônico por meio de processos fermentativos é o alto custo associado ao processo de separação desse metabólito, pois outros ácidos orgânicos são produzidos no decorrer desse processo. Acredita-se que o custo associado a sua purificação corresponde a 30-40% do custo total de produção (SINGH et al., 2021). Uma alternativa promissora para solucionar este problema é utilizar os criogéis poliméricos supermacroporosos no processo de separação. Esses materiais cromatográficos

possibilitam a purificação de extratos brutos e apresentam um menor custo quando comparados a colunas cromatográficas comerciais (ANDAÇ; GALAEV; DENIZLI, 2016; GUIOCHON, 2007). O desempenho dos criogéis é atribuído a funcionalização de sua superfície com ligantes (SAVINA; MATTIASSON; GALAEV, 2005). Ligantes como aminoácidos (histidina, fenilalanina, cisteína, triptofano, taurina, entre outros) (KIM et al., 1991; VIJAYALAKSHMI, 1993) e polímeros como a polietilenoimina (EROL et al., 2016) podem ser empregados na produção de criogéis de troca iônica.

Os criogéis possuem um sistema interconectado de poros variando de 10 a 100  $\mu\text{m}$  e se caracterizam por suas propriedades como elevada porosidade, baixa queda de pressão e baixo tempo de residência nas etapas de adsorção e eluição (MÓL et al., 2017). Para que ocorra adsorção de determinada quantidade de cargas de uma espécie (positivas ou negativas) à matriz, a mesma quantidade de cargas da outra espécie deve ser liberada (GALLANT, 2005).

O aumento da demanda por ácidos produzidos a partir de produtos naturais, principalmente, para a indústria de alimentos aumentou o interesse pela recuperação dos ácidos, a partir do caldo de fermentação (YANKOV, 2004).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ácido propiônico a partir da fermentação de subprodutos da indústria alimentícia utilizando *Propionibacterium freundenreichii* subsp ATCC 6207 em biorreator, conduzindo o processo com variação de pH em batelada, e com variação de pH e controle da concentração de lactose em batelada alimentada, e investigar a purificação do ácido propiônico por cromatografia de troca iônica utilizando criogéis de troca catiônica funcionalizados com taurina (criogel-tau) em função de diferentes valores de pH.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A fermentação foi realizada utilizando permeado de soro de leite (PSL) e água de maceração de milho (AMM), dois subprodutos da indústria alimentícia. O permeado foi doado pelo laticínio Verde Campo localizado na cidade de Lavras-MG e a água de maceração de milho foi doada pela indústria Ingredion localizada em Mogi Guaçu-SP. O microrganismo, *Propionibacterium freundenreichii* subsp ATCC 6207 foi adquirido junto à Coleção de Culturas Tropical pertencente à Fundação André Tosello, de Campinas-SP. Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Análise de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras.

### 2.1 Caracterização dos subprodutos industriais utilizados no processo fermentativo

O permeado de soro de leite (PSL) fresco foi filtrado visando retirar micelas de proteínas remanescentes, homogeneizado e armazenado sobre congelamento até o momento da análise.

A água de maceração de milho (AMM) foi liofilizada e armazenada para posterior análise de lipídios. Para realizar sua liofilização um volume de 50 mL de AMM foi inserido em potes de vidro com capacidade de 100 mL. As amostras foram submetidas ao congelamento em ultracongelador com sistema de ar estático (Coldlab, modelo CL120-86V, Piracicaba, SP, Brasil) a -75 °C. Em seguida, as amostras foram liofilizadas (Edwards, modelo L4KR, São Paulo, Brasil) a -40 °C e pressão de vácuo de 0,998 mbar por 48 h. O produto seco foi armazenado em dessecador a vácuo.

#### 2.1.1 Caracterização do permeado do soro de leite (PSL) e da água de maceração de milho (AMM)

O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa até peso constante a 105 °C (AOAC, 1997). A fração lipídeos foi obtida empregando o método de Gerber, a leitura foi feita em escala graduada do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria (IAL, 2008). Já a fração de lipídeos da AMM liofilizada foi determinada pelo método 032/IV IAL (2008), utilizando Éter Etilico como solvente orgânico e um aparelho tipo Soxhlet

(MARCONI, modelo MA117/6/800, Brasil). Foi feita análise de nitrogênio total seguindo a metodologia de Kjeldhal descrita pela 037/IV do IAL (2008). Utilizou-se um fator de correção de 6,25 para estimar o teor de proteínas totais dos dois subprodutos. Para a determinação de cinzas foi utilizado o método 018/IV IAL (2008), a amostra foi carbonizada totalmente com auxílio de uma mufla a 550 °C. A fração glicídica foi calculada por diferença (AOAC, 2000). O pH foi monitorado utilizando um pHmetro de bancada (Tecnocon, modelo mPA-210, Brasil). A fração de fibra bruta da AMM foi obtida pelo método da Official Methods of Analysis – AOAC (2000).

A acidez total foi determinada por titulometria, com hidróxido de sódio 0,1 mol/L, utilizando uma solução de fenolftaleína 1% como indicador (AOAC, 1990). A densidade foi medida usando um picnômetro (AOAC, 2005).

## 2.2 Estoque, ativação e padronização do inóculo

Para propagação e ativação, 1 mL da cultura armazenada em eppendorf de *Propionibacterium freundenreichii* subsp ATCC 6207 foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo lactato, previamente esterilizado a temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Este tubo foi incubado a 30 °C por 48 h. Em seguida, foi transferida uma alíquota de 10 mL deste tubo para um Erlenmeyer contendo 90 mL de caldo lactato composto por (extrato de levedura (1%), peptona de carne (1%), fosfato de potássio (0,025%) e lactato de sódio (1%). Os mesmos foram incubados a 30 °C em estufa BOD durante 24 h. Para propagação, a cultura foi inserida em eppendorfs, centrifugada a 15.000g (SPINLAB, modelo SL-5AM). Os sobrenadantes foram retirados e adicionou-se 1 mL de meio congelante previamente esterilizado. O meio congelante era composto por glicerol (15%), peptona bacteriológica (0,5%), extrato de levedura (0,3%), NaCl (0,5%) e seu pH foi ajustado para 7,0. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. O inóculo armazenado em eppendorf sob congelamento foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo lactato esterilizado e incubado a 30 °C por 48 h. Posteriormente 500 µl desse conteúdo foi transferido ao erlenmeyer contendo 300 mL de caldo lactato esterilizado, onde a cultura foi incubada a 30 °C sendo realizadas leituras periódicas em espectrofotômetro ( $\lambda=600$  nm) a cada 3 horas em um período de 36 h, e plaqueamento em ágar lactato, seguido de incubação a 30 °C por 72 h. As culturas foram padronizadas para a

fermentação com base na correlação entre absorvância e o número de células viáveis, correspondente a uma contagem inicial no biorreator de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

## **2.3 Estudo cinético em biorreator**

### **2.3.1 Fermentação em batelada**

O primeiro tratamento foi conduzido em um biorreator TEC-BIO modelo 7,5 (TECNAL, Piracicaba/Brasil) em batelada com controle de pH, em triplicata. O meio fermentado (3,6 L) foi composto por permeado PSL e AMM conforme os melhores resultados obtidos por NGOME et al. (2021), concentração de lactose de 40 g L<sup>-1</sup> e 65 g L<sup>-1</sup> de AMM. O inóculo apresentou uma concentração inicial de células no biorreator  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. A fermentação foi conduzida por 120 h, sendo que a cada 24 horas, 10 mL de amostra eram retiradas para determinar as concentrações de lactose, pH, ácidos orgânicos (ácido acético, propiônico e láctico) e contagem de bactérias propiônicas.

### **2.3.2 Fermentação em batelada alimentada**

O segundo tratamento foi conduzido em biorreator em batelada alimentada e foi realizado com controle de lactose e pH, em triplicata. O meio fermentado (1,6 L) foi composto por PSL e AMM, iniciando com inóculo de concentração  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> no biorreator (NGOME et al., 2017). O controle da concentração de lactose ao longo da fermentação no biorreator foi realizado retirando periodicamente amostras e analisando pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). A concentração desse açúcar redutor foi mantida entre 5 e 15 g L<sup>-1</sup>. A adição do mosto ocorreu até que o meio de fermentação atingiu um volume final de 4 L. Foram retiradas amostras a cada 12 h para análises de ácidos orgânicos (acético, propiônico e láctico) e a cada 24 h para contagem de bactérias propiônicas. O pH do meio ao longo da fermentação foi medido no biorreator e com pHmetro de bancada (Tecnocon, modelo mPA-210, Brasil).

## 2.4 Análise do meio fermentado

### 2.4.1 Determinação da viabilidade celular

As amostras do meio foram diluídas com água peptonada, previamente esterilizada. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas. Para determinar o número de organismos viáveis foi utilizado o método de plaqueamento por profundidade (*pour-plate*) em meio ágar lactato. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose, dentro de estufa microbiológica a 30 °C por 3 dias. O número de organismos viáveis foi determinado pela técnica de contagem total de células nas placas com número de colônias entre 25 e 250 UFC mL<sup>-1</sup> (SWANSON et al., 2001).

### 2.4.2 Determinação dos ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), com amostrador automático (SIL-20AHT). Foi utilizado uma coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm x 9,0 µm), equipada com pré-coluna. A fase móvel usada foi uma solução de ácido perclórico em água ultrapura a 100mM, com fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> a 40 °C e tempo de corrida de 30 min. Os ácidos foram detectados por análise espectrofotométrica a 210 nm. A identificação e quantificação dos ácidos foi feita utilizando os respectivos padrões dos ácidos propiônico, acético e láctico. Todos os padrões apresentavam pureza de 99,9% (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram diluídas 1/20 e filtradas com filtro de 0,22 µm para posterior análise (NGOME, 2017). Os resultados foram processados com ajuda do software LC-Solutions.

## 2.5 Determinação do rendimento, produtividade e fator de crescimento do processo fermentativo

O rendimento ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade ( $Pr$ ) para os ácidos propiônicos e acético foram calculados de acordo com as equações 1 e 2.

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{(S_0 - S)} \quad (1)$$

$$Pr = \frac{(P - P_0)}{t_f} \quad (2)$$

Em que P é a concentração final de ácido ( $\text{g L}^{-1}$ );  $P_0$  - concentração inicial de ácido ( $\text{g L}^{-1}$ ); S - concentração final de substrato ( $\text{g L}^{-1}$ );  $S_0$  - concentração inicial de substrato ( $\text{g L}^{-1}$ ); Pr - produtividade;  $t_f$  - tempo de fermentação (h).

## 2.6 Purificação do ácido propiônico usando criogéis de troca iônica supermacroporosos

### 2.6.1 Síntese dos criogéis

Os criogéis de poliacrilamida supermacroporosos foram sintetizados conforme descrito por VERÍSSIMO et al. (2017). A mistura polimérica foi feita dissolvendo 1,185 g de monômeros acrilamida (99%), 0,3175 g de *N,N'*-metileno-*bis*-acrilamida (99%), 1 mL de alil glicidil éter (99%) em 25 mL de água ultrapura. Para iniciar a polimerização foram adicionados dois catalisadores, sendo 100  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônio (98 %) e 23,8  $\mu\text{L}$  de *N,N,N,N'*-tetrametil etilenodiamina (99%). As soluções foram vertidas em seringas e polimerizadas por 24 h a  $-12\text{ }^\circ\text{C}$  em banho de etilenoglicol (Modelo 521/3DE, Nova Ética, Brasil). Em seguida os criogéis foram descongelados, lavados e secos em estufa a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h.

### 2.6.2 Funcionalização dos criogéis de troca iônica

A funcionalização do criogel com ligante de troca iônica foi realizada explorando a reatividade dos grupos epóxi decorrentes do co-monômero alil glicidil éter (ALTINTAŞ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2019; WHEATLEY; SCHMIDT JR, 1999). Inicialmente, os criogéis puros de aproximadamente 3,0 cm ( $\pm 0,24$  g) foram imersos em 50 mL de uma solução tampão de sulfato de amônio ( $2,75\text{ mol L}^{-1}$ , pH 9,5), contendo 0,5 g de ligante taurina (ácido

2-aminoetanossulfônico), por 24 h a 40 °C (WHEATLEY; SCHMIDT JR, 1999). Em seguida, a solução residual foi removida, os criogéis foram lavados com 400 mL de água deionizada e, então as matrizes foram secas a 40 °C por 24 h e armazenadas em um dessecador até o uso.

### 2.6.3 Ensaio de adsorção do ácido propiônico proveniente do meio fermentado por *Propionibacterium freundenreichii*

Visando determinar a melhor condição de pH para adsorção do ácido propiônico empregando o criogel enxertado com taurina (criogel-Tau) foi avaliado a influência do pH (4,0, 5,0, 6,0 e 7,0) sobre a capacidade adsorptiva dos criogéis de troca iônica. Os ensaios de adsorção foram realizados em batelada, usando tubos de centrifugação de 15 mL. Foi adicionado aos tubos 0,05 g do criogel de troca iônica e 2,5 mL de solução salina de fosfato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> nos diferentes valores de pH estabelecidos, durante 30 minutos, para equilibrar o adsorvente. Em seguida foram adicionados aos tubos 2,5 mL do extrato fermentado filtrado com o pH previamente ajustado.

O pH das soluções foram ajustados com auxílio de ácido fosfórico ou NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>). Os ensaios de adsorção foram realizados a 25 °C, sob agitação de 50 rpm por 24 h. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3248×g por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para quantificação do conteúdo de ácidos orgânicos por CLAE conforme apresentado na seção 2.4.2. Os ensaios de adsorção e as corridas no HPLC foram realizados em duplicata. A capacidade de adsorção dos criogéis para ácido propiônico e ácido acético foi determinada pela Equação 3 e a recuperação de ácido propiônico foi encontrado pela Equação 4.

$$q = \frac{(c_0 - c) \times V}{M} \quad (3)$$

$$r = \frac{m_{AP.recuperada}}{m_{AP.inicial}} \times 100 \quad (4)$$

Em que q é a capacidade adsorptiva do adsorvente (mg ácido g criogel<sup>-1</sup>); C<sub>0</sub> - concentração inicial do ácido em solução (mg mL<sup>-1</sup>); C - concentração final do ácido em solução (mg mL<sup>-1</sup>); M - massa de criogel seco utilizado (g); r - recuperação; *m<sub>AP recuperada</sub>*



. massa de ácido propiônico presa no criogel e que seria recuperada (mg); *mAP inicial* - massa inicial de ácido propiônico (mg).

## **2.7 Análise estatística**

Os ensaios de fermentação conduzidos no biorreator foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos para as análises físico-químicas do meio fermentado ao longo da fermentação e para a purificação do meio fermentado foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de média Tukey a 95 % de significância com o auxílio do software R (versão 4.1.1) (R Core Team, 2021). Os gráficos foram plotados usando o software SigmaPlot versão 11 (Systat Software, Inc., San Jose, EUA).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Caracterização físico-química de PSL e AMM**

Permeado de soro de leite (PSL) e água de maceração de milho (AMM) foram utilizados na elaboração do meio de fermentação para produção de ácido propiônico por *Propionibacterium freudenreichi*. A Tabela 1 apresenta a composição físico-química desses subprodutos agroindustriais.

Tabela 1 - Caracterização físico-química e centesimal de PSL e AMM

Análises	PSL	AMM
Umidade (%)	97,17 ± 0,02	57,21 ± 0,12
Lipídios (%)	0,00 ± 0,00	0,70 ± 0,06
Proteína (%)	0,49 ± 0,00	22,91 ± 0,31
Fibra Bruta (%)	**	0,00 ± 0,00
Cinzas (%)	0,27 ± 0,00	6,69 ± 0,22
Carboidratos (%)	2,58 ± 0,88	12,49±0,34
pH	6,65 ± 0,00	4,00 ± 0,00
ATT (g L <sup>-1</sup> )	0,1 ± 0,00	11,43 ± 0,55
Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	1,021 ± 0,007	1,199 ± 0,001

Os resultados são expressos em média seguidos por seus respectivos desvios padrão. \*\* Não se aplica.

Fonte: Própria autora (2021)

O permeado de soro de leite (PSL) utilizado no processo fermentativo apresentou umidade de 97,17 %, pH de 6,65 e acidez titulável de 0,01 g L<sup>-1</sup>. Fontes et al. (2015) ao analisar permeado de leite desnatado obteve um valor semelhante de umidade (97,36 %) e pH (6,58) e uma acidez titulável superior (0,056 %). O PSL não apresentou fração lipídica (0,0 %), visto que o processo tecnológico aplicado tem finalidade de retirar lipídios por ultrafiltração.

O percentual de proteína do PSL foi análogo ao obtido por Andrade e Martins (2002) que ao analisar permeado do soro de leite proveniente da produção de queijo Minas encontraram um teor de 0,50 %. Já o teor de cinzas 0,27% foi inferior a 0,41% detectados por Fontes et al. (2015).

Analisando os resultados obtidos da caracterização físico-química da AMM (Tabela 1) nota-se que Chiani et al. (2010) ao avaliar o mesmo subproduto encontrou valores menores para os parâmetros umidade (47,5 %) e proteína (20,5 %) e maiores para lipídeos (1 %), fibras (1 %) e cinzas (8,8 %). Para os demais parâmetros a acidez foi inferior ao valor de 14 g L<sup>-1</sup> obtido por Cunha et al. (2018) e a densidade foi semelhante a 1,25 g mL<sup>-1</sup> obtido por Liggett e Koffler (1948).

## 3.2 Estudo cinético em biorreator

### 3.2.1 Fermentação em batelada

Os resultados de pH, concentração de açúcares redutores, contagem total de células e concentração dos ácidos orgânicos ao longo do período de fermentação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da variação de lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ), contagem total de células UFC  $\text{mL}^{-1}$  e concentração de ácidos orgânicos ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo para o processo fermentativo em batelada

Tempo (h)	pH	Log UFC $\text{mL}^{-1}$	Lactose ( $\text{g L}^{-1}$ )	Ác.Lático ( $\text{g L}^{-1}$ )	Ác.Acético ( $\text{g L}^{-1}$ )	Ác.Propiônico ( $\text{g L}^{-1}$ )
0	6,54±0,69	6,05±2,92	48,73±4,07	8,93±0,68 <sup>a</sup>	1,75±1,32 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>
24	6,92±0,17	7,16±0,89	45,65±5,48	6,95±0,78 <sup>b</sup>	2,20±0,43 <sup>ab</sup>	0,45±0,78 <sup>c</sup>
48	6,34±0,36	10,06±0,72	25,36±2,20	0,92±0,85 <sup>c</sup>	2,90±1,16 <sup>ab</sup>	6,94±1,66 <sup>b</sup>
72	6,75±0,32	8,35±0,86	10,14±1,30	0,37±0,64 <sup>c</sup>	7,79±3,21 <sup>a</sup>	13,10±2,18 <sup>a</sup>
96	6,83±0,36	8,11±1,71	6,06±1,21	0,13±0,22 <sup>c</sup>	7,37±2,34 <sup>ab</sup>	14,72±3,88 <sup>a</sup>
120	7,07±0,12	7,21±2,10	4,89±1,45	0,15±0,26 <sup>c</sup>	8,00±3,12 <sup>a</sup>	15,82±1,67 <sup>a</sup>

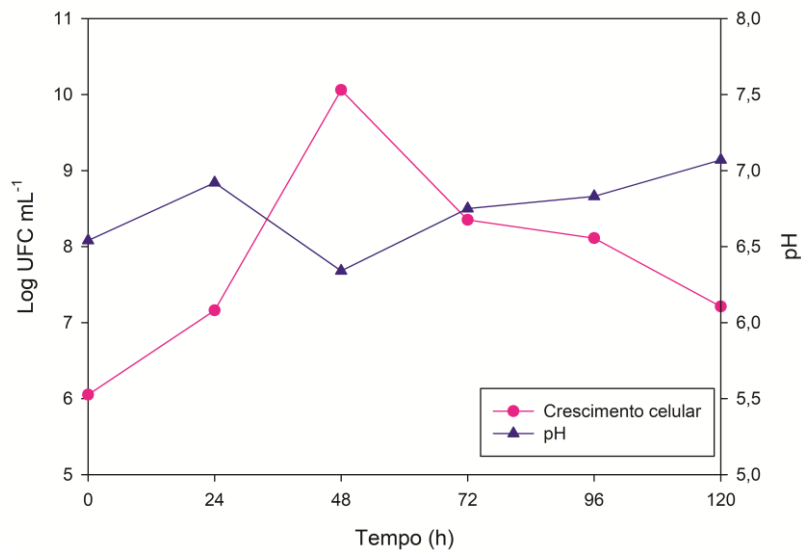
Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Os valores médios seguidos de mesma letra para cada parâmetro indicam que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Própria autora (2021)

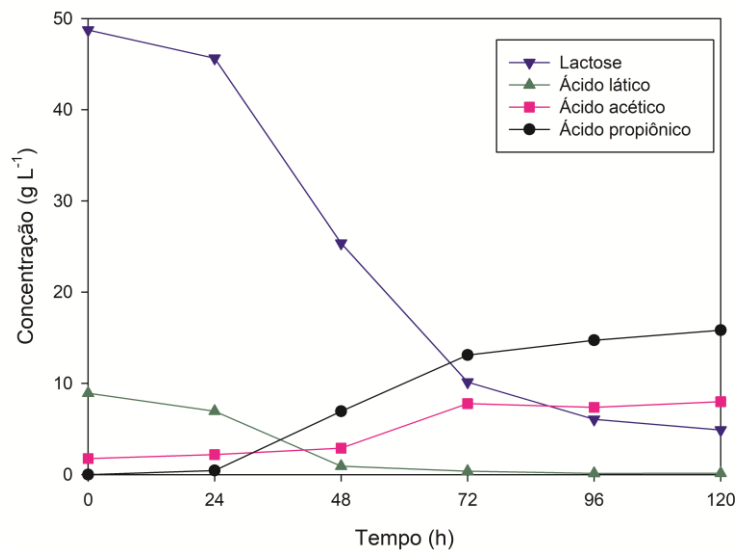
Os perfis cinéticos da fermentação em batelada com os parâmetros avaliados ao longo do tempo são apresentados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 - Perfil cinético da concentração celular e variação de pH da fermentação em batelada simples com *P. freudenreichi*



Fonte: Própria autora (2021)

Figura 2 - Perfil cinético das concentrações de lactose e ácidos orgânicos para fermentação em batelada em biorreator com *P. freudenreichi*



Fonte: Própria autora (2021)

Observa-se pela Figura 2 que ao longo do processo fermentativo houve um consumo de lactose, de 48,73 para 4,89 g L<sup>-1</sup> e de ácido láctico de 8,93 para 0,15 g L<sup>-1</sup> após 120 h. A síntese de ácido acético e propiônico alcançaram uma concentração de 15,82 e 8,00 g L<sup>-1</sup>

sucessivamente nesse mesmo tempo. Este perfil é característico de fermentação com bactéria *Propionibacterium freudenreichii*, pois este microrganismo metaboliza uma variedade de substratos, como carboidratos, polióis como o glicerol e ácidos orgânicos como o ácido láctico.

As bactérias propiônicas hidrolisam a lactose, metabolizando-a em piruvato pela via glicolítica. O piruvato é oxidado a acetato e  $\text{CO}_2$  ou reduzido a propionato pela via de Wood-Werkman para manter o equilíbrio redox. (KOZLOSKI, 2002 (FRÖHLICH-WYDER et al., 2017)). O piruvato é uma molécula que pode ser utilizada tanto para síntese de propionato que consome NADH, como para acetato geradora de NADH (DEBORDE e BOYAVAL 2000). Os principais produtos formados pela fermentação dessa bactéria são os ácidos propiônico, acético, succínico e  $\text{CO}_2$  (THIERRY et al., 2011).

Analisando-se os perfis de consumo de lactose e contagem total de células nota-se que nas primeiras 24 horas de fermentação o consumo de lactose e ácido láctico foi baixo, o que pode ser atribuído a etapa de adaptação das bactérias propiônicas ao substrato. No período de 24 a 48 horas de fermentação, pode ser visto um maior consumo de lactose e ácido láctico, aumento da contagem total de células e queda de pH. De acordo com Ahmadi et al. (2015), as bactérias são capazes de usar as fontes de carbono rapidamente durante as 36 horas iniciais e a rápida produção de ácidos que causa a queda do pH.

A partir de 72 horas de fermentação o consumo de lactose não apresenta uma grande variação e nota-se um decaimento da contagem total de células. A rápida estagnação da produção de ácido propiônico pode ser atribuída à forte inibição do produto final e à coprodução de outros subprodutos como ácido succínico e acético (ZHU et al., 2012). O efeito antimicrobiano dos sais de propionato proveniente do ácido propiônico se estende a fungos que crescem sobre as superfícies de alimentos e pode inibir o crescimento de bactérias patogênicas como a *Listeria monocytogenes* (GONZALEZ-GARCIA et al., 2017).

Analisando o consumo e a produção de ácidos orgânicos, pode ser verificado na Tabela 2 verifica-se que ao longo da fermentação houve produção dos ácidos acéticos e propiônico, sendo  $8,00 \text{ g L}^{-1}$  e  $15,82 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. A maior concentração desses ácidos foi observada após 120 horas de fermentação, entretanto nota-se que após 72 horas de fermentação não houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas concentrações desses ácidos, indicando assim o término do processo fermentativo. Pela Figura 8, pode-se observar que os ácidos acético e propiônico crescem simultaneamente ao longo da fermentação, observa-se ainda pela Tabela 2 que a proporção de produção de (AA/AP) foi de aproximadamente de 2:1,

segundo Assis et al. (2020) essa é uma característica do metabolismo anaeróbio das bactérias propiônicas.

Visando avaliar a capacidade da bactéria *Propionibacterium freudenreichii* em converter os substratos presentes no meio em ácidos orgânicos foi feito cálculos de rendimento ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade (Pp), a Tabela 3 expressa os resultados encontrados, considerando que a fermentação terminou em 72h.

Tabela 3 - Concentração de substrato, produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em batelada

T (hora)	[S] (g L <sup>-1</sup> )	[P.AA] (g L <sup>-1</sup> )	[P.AP] (g L <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s}$ AA (g g <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s}$ AP (g g <sup>-1</sup> )	PpAA (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0	49	1,75±1,32 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	0,154	0,336	0,108
24	46	2,20±0,43 <sup>ab</sup>	0,45±0,78 <sup>c</sup>			
48	25	2,90±1,16 <sup>ab</sup>	6,94±1,66 <sup>b</sup>			
72	10	7,79±3,21 <sup>a</sup>	13,10±2,18 <sup>a</sup>			
96	6	7,37±2,34 <sup>ab</sup>	14,72±3,88 <sup>a</sup>			
120	4,89±1,45	8,00±3,12 <sup>a</sup>	15,82±1,67 <sup>a</sup>			

[S] é a concentração de lactose, [P.AA] é a concentração de ácido acético, [P.AP] é a concentração de ácido propiônico,  $Y_{p/s}$  AA é o rendimento do ácido acético,  $Y_{p/s}$  AP é o rendimento de ácido propiônico, PpAA é a produtividade do ácido acético e PpAP é a produtividade do ácido propiônico.

Fonte: Própria autora (2021)

A análise dos resultados de produção de ácidos orgânicos (Tabela 3) demonstra que a concentração, rendimento e produtividade de ácido propiônico após 72 horas de fermentação foram de 13,10 g L<sup>-1</sup>, 0,335 g g<sup>-1</sup> e 0,182 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores de produção e produtividade de ácido propiônico foram superiores ao encontrado por Piwowarek et al. (2021) que ao fermentar em Erlenmeyer bagaço de maçã e água residuária de batata utilizando a cepa bacteriana *Propionibacterium freudenreichii* T82 produziu 12,71 g L<sup>-1</sup> de ácido propiônico com rendimento de 0,42 g g<sup>-1</sup> e produtividade de 0,106 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, após 120 horas de fermentação.

Ngome et al. (2017) ao fermentar soro de leite com cultura mista de *Lactobacillus helveticus* e *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 também alcançou menor produção de

ácido propiônico ( $3,78 \text{ g L}^{-1}$ ). Já um estudo realizado em erlenmeyer por Ngome et al., (2021) com meio de fermentação contendo soro de leite, água de maceração de milho e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) utilizando cultura mista de *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 e *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, obtiveram uma concentração de ácido propiônico levemente superior ( $23,27 \text{ g L}^{-1}$ ) com 120 h de fermentação.

Uma pesquisa desenvolvida por Feng et al. (2010a) em biorreator contendo cepa de *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 e 7,5 litros de meio contendo glicose como substrato (glicose  $40 \text{ g L}^{-1}$ , peptona  $5 \text{ g L}^{-1}$ , extrato de levedura  $10 \text{ g L}^{-1}$ , NaCl  $3 \text{ g L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$   $5 \text{ g L}^{-1}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $5 \text{ g L}^{-1}$ ) com controle de pH em dois estágios, obteve concentração de  $19,21 \text{ g L}^{-1}$  de ácido propiônico e produtividade de  $0,178 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , com 108 horas de fermentação. Enquanto, Feng et al. (2010b) ao fermentar também glicose como substrato e bactérias *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 para realizar uma fermentação em batelada em biorreator observou uma concentração de ácido propiônico ( $20,41 \text{ g L}^{-1}$ ) e produtividade ( $0,34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) maior desse ácido. Nestas pesquisas a concentração e a produtividade de ácido propiônico foi maior, porém as matérias-primas empregadas provavelmente apresentaram um custo superior já que não se tratava de subprodutos industriais de baixa custo.

### 3.2.2 Fermentação em batelada alimentada

Os resultados obtidos para pH, concentração de açúcares redutores, contagem total de células, e perfil de concentração dos ácidos orgânicos ao longo do tempo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da variação de lactose ( $\text{g L}^{-1}$ ), contagem total de células UFC  $\text{mL}^{-1}$  e ácidos orgânicos ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo para o processo fermentativo em batelada alimentada

Tempo (h)	pH	Log UFC. $\text{mL}^{-1}$	Lactose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Ác.Lático ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Ác.Acético ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Ác. <i>Propiônica</i> ( $\text{g.L}^{-1}$ )
0	6,88±0,09	7,00±0,99	6,00±0,00	4,58±2,93 <sup>a</sup>	1,16±1,34 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>
5	7,03±0,24	***	5,00±0,00	***	***	***
6	7,10±0,30	***	8,00±1,00 **	***	***	***
10	7,38±0,15	***	7,00±0,58	***	***	***
12	7,10±0,20	***	15,0±1,15 **	1,13±1,00 <sup>ab</sup>	0,70±0,64 <sup>b</sup>	0,86±0,94 <sup>b</sup>
24	6,36±1,00	7,00±1,93	8,00±1,53* *	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,63±1,10 <sup>b</sup>
36	7,55±0,12	***	7,00±3,61* *	0,43±0,26 <sup>b</sup>	3,53±1,49 <sup>ab</sup>	6,27±1,32 <sup>a</sup>
48	7,62±0,57	7,00±1,61	4,00±3,55* *	0,00±0,00 <sup>b</sup>	5,04±2,48 <sup>a</sup>	6,04±1,84 <sup>a</sup>
72	7,56±0,38	8,00±1,17	2,00±0,00	0,00±0,00 <sup>b</sup>	4,78±1,24 <sup>a</sup>	7,41±1,31 <sup>a</sup>

Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os valores médios seguidos de mesma letra para cada parâmetro indicam que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

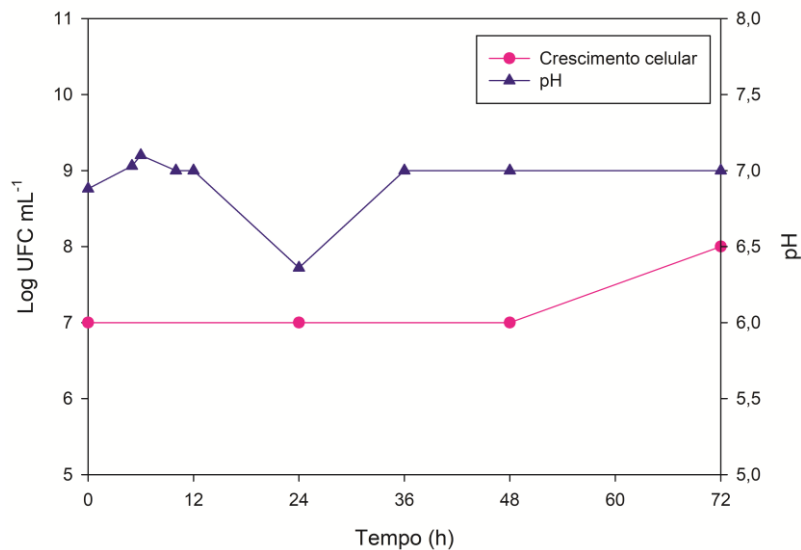
\*\* Adição de substrato. \*\*\* Não se aplica.

Fonte: Própria autora (2021)

Os perfis cinéticos dos parâmetros avaliados ao longo do tempo são ilustrados nas Figuras 3 e 4.

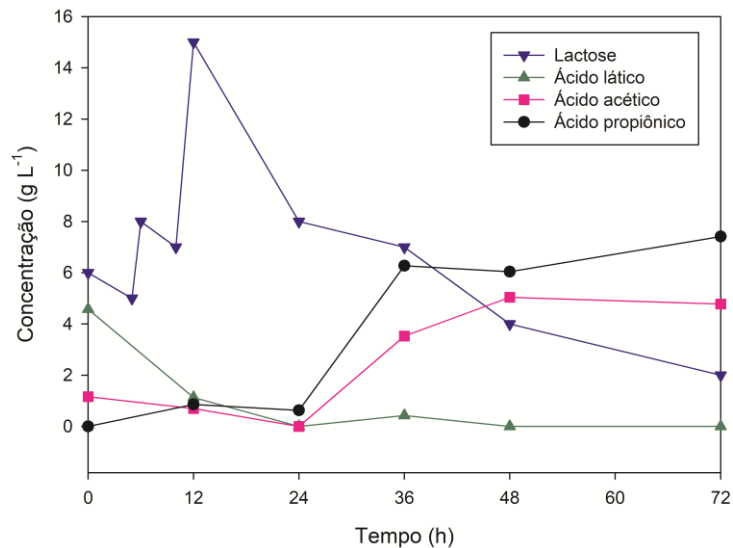


Figura 3 - Perfil cinético da concentração celular e da variação de pH da fermentação em batelada alimentada com *P. freudenreichi*



Fonte: Própria autora.

Figura 4 - Perfil cinético das concentrações de lactose e ácidos orgânicos para fermentação em batelada alimentada com *P. freudenreichi*



Fonte: Própria autora (2021)

Pelas Tabela 4 e Figura 4 observa-se que ocorreu adição de substrato nos tempos 6, 12, 24, 36 e 48 horas de fermentação e que nas primeiras 11 horas foi mantido uma concentração de lactose dentro do biorreator entre 5 e 8 g L<sup>-1</sup>. Nota-se que ao adicionar

substrato após 12 h de fermentação a concentração do meio subiu para  $15 \text{ g L}^{-1}$ , para manter a concentração de lactose acima de  $5 \text{ g L}^{-1}$  sem que houvesse necessidade de uma nova adição de substrato antes de completar 24 h. Pela Figura 3 pode-se observar que não houve grande variação da contagem total de células ao longo da fermentação. De acordo com Melo et al., (2007), mesmo em uma concentração muito baixa como  $2 \text{ g.L}^{-1}$  o próprio ácido propiônico tem efeito inibidor no crescimento das bactérias propiônicas. Outro fator que também pode ter influenciado no crescimento das bactérias ao longo do tempo são as alimentações realizadas já que diluem o meio de fermentação, e conseqüentemente pode diminuir a contagem total de células.

Na tabela 5, pode ser visto que a partir de 36 horas de fermentação não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de ácido propiônico, mas ocorreu adição de mosto superior a esse tempo, sendo assim os cálculos para rendimento e produtividade foram realizados no tempo final com 72 horas de fermentação.

Tabela 5 - Concentração de produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em batelada alimentada

T (h)	[P.AA] ( $\text{g L}^{-1}$ )	[P.AP] ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ AA ( $\text{g g}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ AP ( $\text{g g}^{-1}$ )	PpAA ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	PpAP ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
0	$1,16 \pm 1,34^{ab}$	$0,00 \pm 0,00^b$	0,219	0,414	0,066	0,103
12	$0,70 \pm 0,64^b$	$0,86 \pm 0,94^b$				
24	$0,00 \pm 0,00^b$	$0,63 \pm 1,10^b$				
36	$3,53 \pm 1,49^{ab}$	$6,27 \pm 1,32^a$				
48	$5,04 \pm 2,48^a$	$6,04 \pm 1,84^a$				
72	$4,78 \pm 1,24^a$	$7,41 \pm 1,31^a$				

[P.AA] é a concentração de ácido acético, [P.AP] é a concentração de ácido propiônico,  $Y_{P/S}$  AA é o rendimento do ácido acético,  $Y_{P/S}$  AP é o rendimento de ácido propiônico, PpAA é a produtividade do ácido acético e PpAP é a produtividade do ácido propiônico.

Fonte: Própria autora (2021)

Os resultados obtidos na batelada alimentada, foram superiores aos encontrados por Ahmadi et al. (2015), que avaliaram o efeito do pH na produção de ácido propiônico em batelada alimentada por *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* e *Lactobacillus acidophilus*, utilizando melaço como substrato base, e com 36 h de fermentação realizavam a alimentação do meio com leite. Estes autores produziram  $5,25 \text{ g.L}^{-1}$  de AP e  $5,86 \text{ g.L}^{-1}$  de AA

controlando o pH do meio fermentativo em 6,5 e alcançaram valores de 5,67 g L<sup>-1</sup> de AP e 6,33 g L<sup>-1</sup> de AA quando não realizaram o controle do pH. Ambas as fermentações foram conduzidas por 144 horas. Foi observado que no tratamento em que o pH foi controlado, a concentração de AP e AA foi menor do que no tratamento sem controle de pH. Os autores concluíram, que a fermentação sem controle de pH é mais adequada para o crescimento de *P. freudenreichii* e destacam que o uso de grande volume de NaOH com o intuito de manter o pH permanente ao longo do processo fermentativo pode causar efeito negativo no crescimento das bactérias.

No estudo conduzido por Feng et al. (2010b) com substrato e suplementos puros na fermentação em batelada alimentada com estratégia de controle de pH de 6,5 nas primeiras 48 horas e 6,0 a partir desse tempo até o final da fermentação, obteve uma concentração final superior de ácido propiônico de 25,23 g L<sup>-1</sup> com produtividade de 0,150 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Em outro estudo de Feng et al. (2010b) ao fermentar também glicose como substrato e células imobilizadas de *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 alcançou 67,05 g L<sup>-1</sup> de AP após 496 h de fermentação. No entanto buscando uma redução no custo do produto, os esforços recentes concentram-se na utilização de resíduos industriais ou de subprodutos da matéria prima renovável com custo baixo para fermentação de AP (WANG; YANG, 2013).

### 3.2.3 Fermentação em batelada simples (BS) e em batelada alimentada (BA)

A Tabela 6 apresenta um comparativo dos resultados finais das fermentações conduzidas em batelada simples e em alimentada.

Tabela 6 - Concentração de substrato, produtos, coeficientes de rendimento e produtividade do processo fermentativo em batelada e batelada alimentada

Tempo (h)	Tratamentos	[P.AA] (g L <sup>-1</sup> )	[P.AP] (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> AA (g g <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> AP (g g <sup>-1</sup> )	PpAA (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PpAP (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
72	BS	4,78 ± 1,24	13,10 ± 2,18	0,154	0,336	0,108	0,182
72	BA	4,78 ± 1,24	7,41 ± 1,31	0,219	0,414	0,066	0,103

[P.AA] é a concentração de ácido acético, [P.AP] é a concentração de ácido propiônico, Y<sub>P/S</sub> AA é o rendimento do ácido acético, Y<sub>P/S</sub> AP é o rendimento de ácido propiônico, PpAA é a produtividade do ácido acético e PpAP é a produtividade do ácido propiônico.

Fonte: Própria autora (2021)

Após 72 horas de fermentação em batelada alimentada a concentração final de AP de  $7,41 \text{ g.L}^{-1}$  e produtividade  $0,103 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , foram inferiores aos observados para o processo fermentativo em batelada simples ( $13,10 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,182 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) no mesmo tempo.

Foi observado que o rendimento de AP foi maior na batelada alimentada ( $0,414 \text{ g g}^{-1}$ ) do que na batelada simples ( $0,336 \text{ g g}^{-1}$ ), mas a produtividade e a concentração final foram menores na batelada alimentada. Portanto os resultados levam a concluir que é melhor conduzir a fermentação propiônica usando batelada simples.

Um das possíveis causas para os resultados obtidos da batelada alimentada não serem melhores pode ser a ausência de inibição pelo substrato (lactose) na faixa investigada deste trabalho, pois uma das vantagens da batelada alimentada em relação a batelada simples é evitar esse tipo de inibição (DEBABRATA E DEBAYAN, 2019).

De acordo com Ammar e Philippidis (2021), um obstáculo que reduz o rendimento de ácido propiônico e aumenta o custo de processamento posterior é a purificação, isso ocorre devido à formação de subprodutos como os ácidos acético e succínico pois torna o processo mais complexo.

### 3.3 Purificação do ácido propiônico obtido por fermentação de subprodutos

Criogéis de troca catiônica funcionalizados com taurina (criogel-tau) foram aplicados na purificação de ácido propiônico. A Tabela 7 apresenta os resultados de capacidade de adsorção ( $q - \text{mg g}^{-1}$ ) do criogel-Tau, em função dos diferentes valores de pH (4,0 a 7,0). Os resultados (Tabela 6) foram submetidos à ANOVA e verificou-se que os tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre si de acordo com o teste de Tukey. Em pH 4,0 o criogel-Tau foi efetivo na adsorção de ácido propiônico ( $256,13 \text{ mg g}^{-1}$ ) em detrimento da adsorção de ácido acético ( $29,34 \text{ mg g}^{-1}$ ), isso ocorreu porque o  $pK_a$  do AP é igual a 4,88, enquanto o do AA é 4,75. Assim no pH 4,0 o AA apresentava menos cargas positivas comparado ao AP, resultando em sua menor atração eletrostática e interação com o ligante. O criogel-Tau apresentou características de um trocador catiônico, pois o  $pK_a$  da cadeia lateral livre da taurina é 1,5 (CHEMICALBOOK, 2021), logo em todos os valores de pH estudados, o ligante apresentava carga líquida negativa, sendo neutralizado por contra íons catiônicos.

A capacidade adsortiva do criogel-Tau em pH 4,0 foi superior ao reportado por Li et al. (2021) que ao analisarem a adsorção de ácido propiônico em resinas aniônicas (ZGA412 –

esqueleto de Copolímero de ácido acrílico), obtiveram um resultado máximo de capacidade adsorptiva de 47,32 mg g<sup>-1</sup>. Resultados inferiores aos obtidos nesse trabalho também foram relatados por Polat e Sayan (2018), que verificaram uma adsorção de ácido propiônico (188,50 mg g<sup>-1</sup>) em cristais sulfato de cálcio dihidrato. Já Silva e Miranda (2013) ao empregar uma resina de troca aniônica (Purolite A133S - poliestireno reticulado com matriz de divinilbenzeno) para purificar ácido propiônico presente em caldo de fermentação, alcançaram um resultado máximo de 452,73 mg +g<sup>-1</sup>.

Tabela 7 - Conteúdo de ácido orgânicos adsorvido (q) no criogel funcionalizado com taurina em função de diferentes valores de pH

Criogel	pH	Capacidade de adsorção (mg <sub>ácido propiônico</sub> g <sub>criogel</sub> <sup>-1</sup> )	Capacidade de adsorção (mg <sub>ácido acético</sub> g <sub>criogel</sub> <sup>-1</sup> )
Criogel-Tau	4,0	256,13 ± 38,14 <sup>d</sup>	29,34 ± 12,86 <sup>c</sup>
	5,0	153,45 ± 5,81 <sup>c</sup>	199,34 ± 15,52 <sup>b</sup>
	6,0	203,81 ± 11,80 <sup>b</sup>	249,94 ± 25,57 <sup>a</sup>
	7,0	148,42 ± 2,59 <sup>c</sup>	185,36 ± 14,71 <sup>b</sup>

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

Os valores médios seguidos de mesma letra para capacidade adsorptiva indica que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tau-criogel: criogel funcionalizado com taurina.

Fonte: Própria autora (2021)

A Tabela 8 apresenta os valores de porcentagem de recuperação de ácido propiônico após purificação utilizando o criogel-Tau. Observa-se que no pH 4,0 obteve-se um maior valor de recuperação (59,73 %). Este resultado foi próximo ao encontrado por Silva e Miranda (2013), que obtiveram 64% de recuperação de AP.

Tabela 8 - Recuperação de ácido propiônico purificado em função de diferentes valores de pH

Criogel	pH	Recuperação (%)
Criogel-Tau	4,0	9,73 ± 9,03 <sup>a</sup>
	5,0	35,70 ± 1,35 <sup>c</sup>
	6,0	47,46 ± 2,59 <sup>b</sup>
	7,0	34,81 ± 0,39 <sup>c</sup>

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

Os valores médios seguidos de mesma letra para capacidade adsorptiva indica que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Criogel-Tau: criogel funcionalizado com taurina.

Fonte: Própria autora (2021)



#### 4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, conclui-se que o uso de subprodutos da indústria alimentícia como PSL e AMM são promissores para produção de AP de maneira sustentável, contribuindo assim para a preservação do meio ambiente, redução dos gastos das indústrias com o tratamento desses efluentes e agregação de valor para esses subprodutos. O melhor resultado usando esses dois subprodutos e cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* subsp ATCC 6207 foi alcançado pela batelada simples com concentração de AP de 13,10 g L<sup>-1</sup> após 72 h de fermentação. A maior capacidade de adsorção de AP (256,13 mg g<sup>-1</sup>) nos testes usando criogéis de troca catiônica funcionalizados com taurina (criogel-tau) foi obtida em pH 4, assim como a maior recuperação de AP (59,73 %) e menor capacidade adsortiva de AA (29,34 mg g<sup>-1</sup>), mostrando assim que o uso de criogéis de troca iônica é uma forma promissora de purificação de AP do meio de fermentação.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, T.; AADIL, R. M.; AHMED, H. ur Rahman U, Soares BC, Souza SL, et al. Treatment and utilization of dairy industrial waste: a review. **Trends Food Sci Technol**, v. 88, p. 361-72, 2019. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.04.003
- AHMADI, Negin; KHOSRAVI-DARANI, Kianoush; MORTAZAVIAN, Amir Mohammad. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 67-75, 2017. Doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.04.004.
- AHMADI, Negin et al. Fed-batch fermentation for propionic, acetic and lactic acid production. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 581, 2015. DOI: 10.13005/ojc/310174.
- ALTINTAŞ, Evrim Banu et al. Use of magnetic poly (glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. **Journal of Chromatography B**, v. 853, n. 1-2, p. 105-113, 2007. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.02.058.
- AMMAR, Ehab M.; PHILIPPIDIS, George P. Fermentative production of propionic acid: prospects and limitations of microorganisms and substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 105, n. 16–17, p. 6199–6213, 2021. ISSN: 14320614. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1007/s00253-021-11499-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11499-1>.
- ANDAÇ, Müge; GALAEV, Igor Yu; DENIZLI, Adil. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1021, p. 69–80, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.034>.
- ANDRADE, Rafael Leite Pinto De; MARTINS, José Francisco Pereira. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 249–253, 2002. ISSN: 0101-2061. DOI: 10.1590/s0101-20612002000300009.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists International Official Official Methods of Analysis. 16ª Edição, AOAC, Arlington, 1997.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis AOAC. 17.ed. Maryland, 2000.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of AOAC International. 18. ed. Washington: AOAC, 2005.



ASSIS, Dener Acosta de et al. Biosynthesis of vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 using liquid acid protein residue of soybean as culture medium. **Biotechnology progress**, v. 36, n. 5, p. e3011, 2020. DOI: 10.1002/btpr.3011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. v. 2, ed. 15, Washington, 1990.

BARRETO, A. G. et al. **Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*)**. Química Nova, v. 28, n. 4, p. 719, 2005.

CUNHA, M. C. et al. Highly efficient production of l(+)-lactic acid using medium with potato, corn steep liquor and calcium carbonate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. **BRAZILIAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING**, v. 35, p. 887-900, 2018.

CHEMICALBOOK. Taurine. 2021. Disponível em: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2742654.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2742654.htm). Acesso em: 16 out. 2021.

CHIANI, M. et al. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 13, n. 23, p. 1151-1155, 2010.

DEBABRATA DAS, DEBAYAN DAS. **Biochemical Engineering: An Introductory Textbook** 1st Edition. New York: Imprint Jenny Stanford Publishing. 2019, 508 pages, eBook ISBN 9780429031243

DEBORDE, Catherine; BOYAVAL, Patrick. Interactions between pyruvate and lactate metabolism in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*: in Vivo 13C Nuclear Magnetic Resonance Studies. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2012-2020, 2000.

Dishisha T, Alvarez MT, Hatti-Kaul R. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresour Technol.** 2012 Aug;118:553-62. doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.079. Epub 2012 May 24. PMID: 22728152.

EROL, K. et al. Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, n. 0927-7765, p. 567-576, 2016.

FENG, Xiao-Hai et al. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous-bed bioreactor. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 9, p. 1077-1085, 2010. DOI: 10.1007/s00449-010-0433-7.

FENG, Xiaohai et al. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for propionic acid production with *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 343-349, 2010.

FONTES, Edimar Aparecida Filomeno et al. Bebida eletrolítica a base de permeado da ultrafiltração de leite: avaliação física, química e microbiológica durante o armazenamento. **Ciência Rural**, v. 45, p. 342-348, 2014. DOI: 10.1590/0103-8478cr20131432.

FRÖHLICH-WYDER, Marie-Therese et al. Cheeses with propionic acid fermentation. In: **Cheese**. Academic Press, 2017. p. 889-910. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00035-1.

GALLANT, S. R. Modeling ion-exchange adsorption of a protein in a spherical particle. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 189-195, 2004.

GONZALEZ-GARCIA, R. Axayacatl et al. Microbial propionic acid production. **Fermentation**, v. 3, n. 2, p. 21, 2017. DOI: 10.3390/fermentation3020021.

GUIOCHON, Georges. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.05.090.

ISMAIL, ES. et al. Current advances in biological production of propionic acid. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 635–645, 2017. ISSN: 15736776. DOI: 10.1007/s10529-017-2293-6.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. ed. 4, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 823 a 881, 2008.

KIM, M. et al. Protein adsorption capacity of a porous phenylalanine-containing membrane based on a polyethylene matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 586, n. 1, p. 27–33, 1991.

LI, Xiaolian et al. Efficient co-production of propionic acid and succinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* using membrane separation coupled technology. **Engineering in Life Sciences**, v. 21, n. 6, p. 429-437, 2021. DOI: 10.1002/elsc.202000103.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn Steep Liquor in Microbiology. **Bacteriological reviews**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 297–311, 1948. ISSN: 00053678. DOI: 10.1128/mmbr.12.4.297-311.1948.

LIU, Zhen et al. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource technology**, v. 114, p. 711-714, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.118.

MELO, Marcelo Rodrigues de; Passos, FML ; MANTOVANI, Hilário Cuquetto . Produção de ácido propiônico a partir de lactose por bactéria do rúmen bovino. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007**.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. ISSN: 15206882. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MÓL, Paula Chequer Gouveia et al. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.032>.

NASCIMENTO, Wellington Cristina Almeida do; MARTINS, Meire Lelis Leal. Production of proteases by *Bacillus* sp. SMIA-2 grown on whey and corn steep liquor and compatibility of the enzyme with commercial detergents. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.. DOI: 10.1590/s0101-20612006000300016.

NGOME, Moisés Tomás et al. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, p. 543-550, 2017. DOI: 10.4025/actascitechnol.v39i5.29479.

NGOME, Moisés Tomás et al. Biosynthesis of propionic acid using whey and calcium carbonate by mixed culture of *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 4, p. 811-822, 2021. DOI: 10.1007/s43153-021-00143-0.

OLIVEIRA, Ana Cristina Freitas et al. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 55, n. 11, p. 2012-2024, 2020.. DOI: 10.1080/01496395.2019.1617743.

PIWOWAREK, Kamil et al. Use of *Propionibacterium freudenreichii* T82 strain for effective biosynthesis of propionic acid and trehalose in a medium with apple pomace extract and potato wastewater. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3965, 2021. DOI: 10.3390/molecules26133965.

POLAT, S.; SAYAN, P. Assessment of propionic acid adsorption performance on the phase transformation of calcium sulfate hemihydrate to dihydrate. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 53, n. 13, p. 1966–1978, 2018.

RAPETTI, Luca et al. Effect of maize, rumen-protected fat and whey permeate on energy utilisation and milk fat composition in lactating goats. **Italian Journal of Animal Science**, v. 1, n. 1, p. 43-53, 2002. <http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2002.43>.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

SAVINA, Irina N.; MATTIASSON, Bo; GALAEV, Igor Yu. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 9596-9603, 2005. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.07.091.

SILVA, Alan Henrique; MIRANDA, Everson Alves. Adsorption/desorption of organic acids onto different adsorbents for their recovery from fermentation broths. **Journal of Chemical & engineering data**, v. 58, n. 6, p. 1454-1463, 2013.

SINGH, Sudhanshu et al. Process Intensification of Propionic Acid Separation—Effect of Channel Geometry on Microchannel Distillation. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 169, p. 108599, 2021.. DOI: 10.1016/j.cep.2021.108599.

SMITHERS, Geoffrey W. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold”. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 695–704, 2008. ISSN: 09586946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.03.008.

SWANSON, K. M. J., PETRAN, R. L. E HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes, F. P. e Ito, K. (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 6, p. 53-67, 2001.

THIERRY, Anne et al. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. **International journal of food microbiology**, v. 149, n. 1, p. 19-27, 2011. Doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudo-biospecific affinity ligand chromatography. In: **Molecular Interactions in Bioseparations**. Springer, Boston, MA, 1993. p. 257-275.

VERÍSSIMO, Lizzy Ayra Alcântara et al. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 1973-1982, 2017. DOI: 10.1080/01496395.2017.1318921.

WANG, Zhongqiang; YANG, Shang-Tian. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. **Bioresource technology**, v. 137, p. 116-123, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.012>.

WERPY, Todd; PETERSEN, Gene. **Top value added chemicals from biomass: volume I--results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**. National Renewable Energy Lab., Golden, CO (US), 2004.

WHEATLEY, Jeffrey B.; SCHMIDT JR, Donald E. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 849, n. 1, p. 1–12, 1999. ISSN: 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00484-7.

YANKOV, D. et al. Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-n-octylamine dissolved in decanol and dodecane. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 1, p. 63-71, 2004.

ZHU, Linqi et al. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource technology**, v. 112, p. 248-253, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.055>.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O permeado de soro de leite e a água de maceração de milho mostraram-se eficientes para utilização na fermentação propiônica. Novos testes com esses subprodutos são sugeridos, para as fermentações em batelada simples e alimentada com cultura mista afim de obter uma maior concentração de ácido propiônico e menor tempo de fermentação. Assim como mais testes de capacidade de adsorção de AP usando criogéis, e também testes de dessorção, afim de melhorar o processo de purificação com o uso de criogéis.

## APÊNDICE

Figura 1 – Filtração para retirada de micelas de proteínas remanescentes



Fonte: Própria autora (2021)

Figura 2 – Fermentação do pré-teste em triplicata



Fonte: Própria autora (2021)

Figura 3 – Fermentação da batelada simples



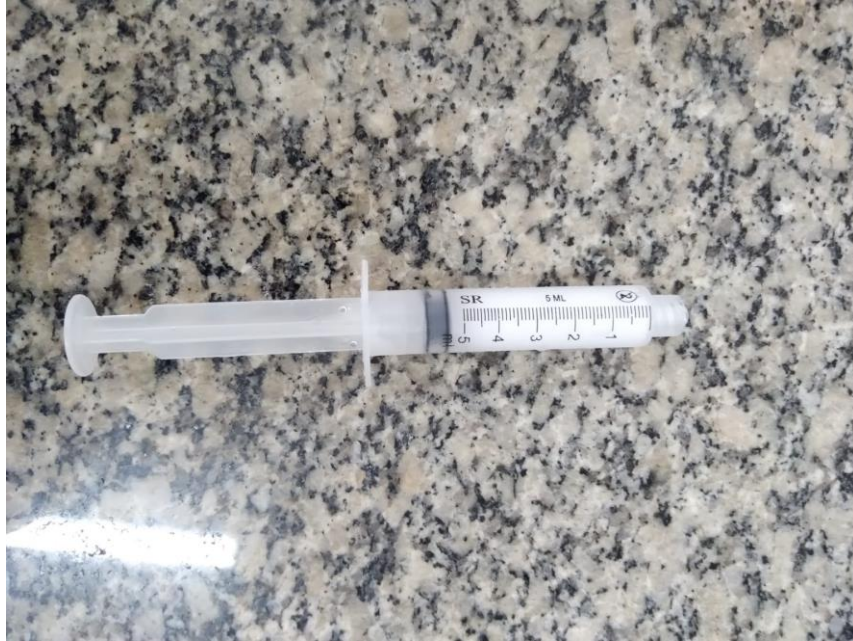
Fonte: Própria autora

Figura 4 – Fermentação da batelada simples alimentada



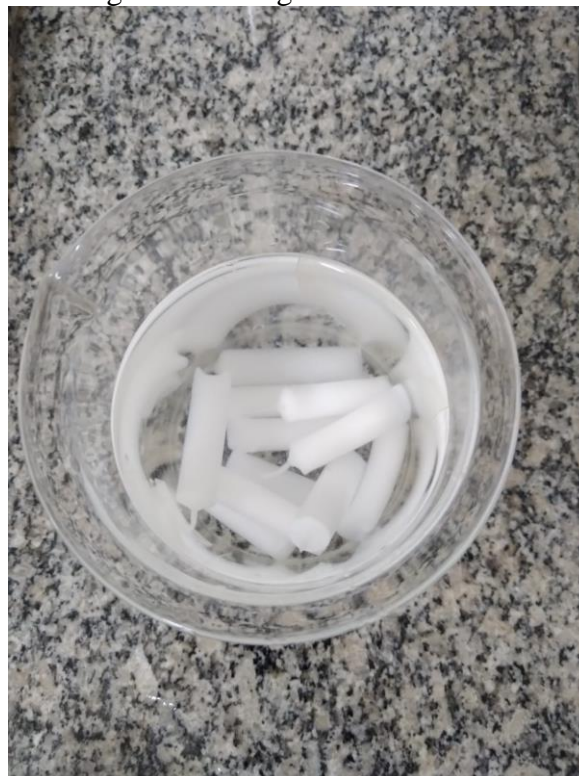
Fonte: Própria autora

Figura 5 – Etapa de síntese de criogéis com as soluções vetidas em seringa



Fonte: Própria autora

Figura 6 – Criogéis sendo lavados



Fonte: Própria autora



Figura 7 – Criogéis sendo secos em estufas



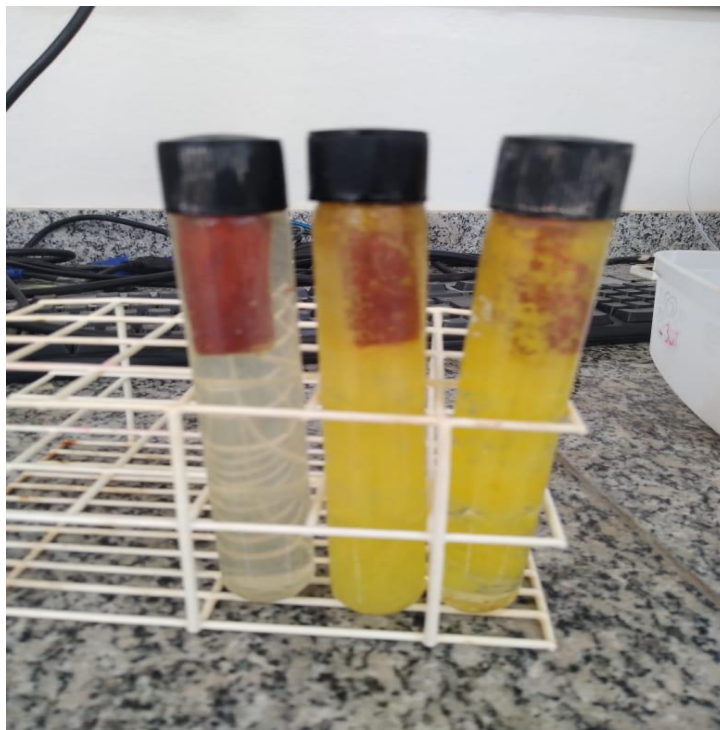
Fonte: Própria autora

Figura 8 – Criogéis sendo funcionalizado com os ligantes



Fonte: Própria autora

Figura 9 – Ensaio de adsorção do AP proveniente do meio fermentativo



Fonte: Própria autora