



**MOISÉS TOMÁS NGOME**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM  
SORO LÁCTEO POR CULTURA MISTA DE  
*Propionibacterium freudenreichii PS-1* e  
*Lactobacillus helveticus***

**LAVRAS – MG**

**2013**

**MOISÉS TOMÁS NGOME**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM SORO LÁCTEO POR  
CULTURA MISTA DE *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e  
*Lactobacillus helveticus***

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

Orientador

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Coorientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Ngome, Moisés Tomás.

Produção de ácido propiônico em soro lácteo por cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* / Moisés Tomás Ngome. – Lavras : UFLA, 2013.

104 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

Bibliografia.

1. Soro desnatado. 2. Ácidos orgânicos. 3. Bactérias propiônicas. 4. Fermentação. 5. Biotecnologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.28449

**MOISÉS TOMÁS NGOME**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM SORO LÁCTEO POR  
CULTURA MISTA DE *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e  
*Lactobacillus helveticus***

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2013.

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Dr. Cleube Andrade Boari	UFVJM

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

Com muito orgulho que dedico esta obra científica á minha esposa **Ester Simione Come** que sempre esteve presente e apoiando-me em toda minha vida acadêmica.

## AGRADECIMENTO

Quero agradecer a Deus, por seu amor infindável para comigo, por estar sempre ao meu lado, dando-me coragem todos os dias para lutar até o fim.

Ao meu pai Tomás e a minha mãe Maria, pelo incentivo e pela educação a cada dia.

Aos meus irmãos e aos meus primos pela ajuda, dedicação e compreensão.

À minha esposa Ester e aos meus filhos Samira, Ivan, Sheinase, Marnete e Adinilson, pela paciência de permanecer distante durante todo período de formação, pelo apoio e tão valioso incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas da Universidade Eduardo Mondlane (UEM/ESUDER), pela convivência e harmonia durante os trabalhos.

À Universidade Federal de Lavras que por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos me acolheu para que estas pesquisas e tornasse realidade.

Ao meu orientador Professor José Guilherme por ter me auxiliado com informações e discussões ao longo da pesquisa.

À minha coorientadora Roberta Piccoli pela amizade, apoio e incentivo cuja dedicação e discussões foram essenciais para esta pesquisa.

Ao professor Luiz Ronaldo e ao professor Cleube Boari, por suas contribuições valiosas.

Aos Professores do programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, por terem contribuído com ensinamentos durante todo período do curso.

Aos funcionários Cleuza, Tales, Eliane, Tina e Damisa, pelo apoio prestado durante este trabalho.

Á secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, pela competência no atendimento às minhas necessidades.

Aos colaboradores desta pesquisa Elô, Sheyla, Camily, Elisangela, Letícia e Renato pelo incentivo, apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas e amigos Joyce, Silvia, Juliana, Evandro, Mariliana, Aline, Bibiabe, Damiana, Elaine, Dieyckson, Raniely, Regiane, Marcel, João, Carlos, Baloi e Raitone, pelo carinho, estímulo, colaboração e amizade.

Á Empresa Christian Hansen Indústria, pela doação dos microrganismos e à Laticínio Verde Campo, pelo fornecimento do soro láteo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

## RESUMO GERAL

Substratos líquidos e poluentes como soro podem ser aproveitados para a produção de novos produtos com maior valor agregado, minimizando assim, o impacto ambiental e custos pelo tratamento de efluente por laticínios. A fermentação do soro por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 produz ácido propiônico, usado como agente antifúngico em alimentos e sementes e como um ingrediente em termoplásticos, drogas antiartrite, perfumes, aromas e solventes. Inicialmente, foi realizada a adaptação das linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 usando erlenmeyers com 100 mL de caldo lactato com concentrações crescentes de 0 %, 0,1 %, 0,15 % e 0,25 % do ácido propiônico incubados a 30°C, monitorando o crescimento a partir da densidade óptica ( $DO_{660nm}$ ). Os resultados indicaram que o aumento da concentração do ácido propiônico promoveu a diminuição na velocidade específica máxima de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, de 0,1137 a 0,0277  $h^{-1}$ . Portanto, o crescimento celular de bactérias propiônicas é negativamente influenciado pela concentração de ácido propiônico, aumentando o tempo de crescimento de 32h para 100h, com o aumento da concentração de ácido propiônico no meio de crescimento para 0,25% m/v. Posteriormente, foi feito um estudo cinético da fermentação propiônica com cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e mista com o mesmo microrganismo e *Lactobacillus helveticus* em meio com soro desnatado o extrato de levedura, a 30°C. Na fermentação com cultura mista, foi produzida maior quantidade de ácidos totais (2, 1978 g acidez total por 100 mL). Em seguida, utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avaliar o efeito da concentração de inóculo e do tempo de adição de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 sobre a produção de ácido propiônico usando cultura mista. Foram conduzidas fermentações em erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL do soro desnatado suplementado com 1% de extrato de levedura, inoculados com 10% v/v. As concentrações de células do inóculo foram determinadas a partir da densidade ótica a 660 e 540 nm para *Propionibacterium freudenreichii* PS1 e *Lactobacillus helveticus* respectivamente. Os meios foram incubados a 30 °C durante 168h, sem agitação. As amostras foram retiradas em tempos regulares durante a fermentação para estudo cinético e análise da produção dos ácidos orgânicos. Os resultados foram 1, 0989g/100 mL para acidez e pH final de 3,76 para cultura pura e para a cultura mista 2,1978g/100mL e 2,87 de acidez e pH, respectivamente. A produção máxima atingida dos ácidos orgânicos foi de 3,78 g/L para ácido propiônico e 3,10 g/L para ácido acético. Todos os parâmetros analisados não tiveram efeitos estatisticamente significativos, ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Palavras-chave: Soro desnatado. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. *Lactobacillus helveticus*. Ácidos orgânicos.



## GENERAL ABSTRACT

Liquid substrates and pollutants such as whey may be used in the production of new products with larger added value, thus minimizing the environmental impact and the costs of treating effluents with dairy products. Whey fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 produces propionic acid, used as an anti-fungi agent in foods and seeds and as an ingredient in thermoplastic, anti-arthritis drugs, perfumes, aromas and solvents. Initially, isolates of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 were adapted using erlenmeyers with 100 mL of lactate juice with increasing propionic acid concentration (0%, 0.1%, 0.15% and 0.25%), incubated at 30 °C, monitoring the growth through the absorbance in a spectrophotometer at 660 nm. The results showed that the increase in propionic acid concentration decreased the maximum specific growth rate of the *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 from 0.1137 to 0.0277 h<sup>-1</sup>. Therefore, the cellular growth of the propionic bacteria was negatively influenced by propionic acid concentration, increasing the growth time from 32 h to 100 h, with an increase of propionic acid concentration in the medium to 0.25% m/v. Posteriorly, a kinetic study of the propionic fermentation with a *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 pure culture and a mixed culture with the same microorganism and *Lactobacillus helveticus* was performed in a medium with skimmed whey and yeast extract, at 30 °C. In the fermentation with mixed culture, a larger quantity of total acids was produced (2.1978 g total acidity per 100 mL). Subsequently, a Central Composite Rotational Design was used in order to evaluate the effect of the inoculum concentration and of the *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 addition time over the production of propionic acid using mixed cultures. Fermentations were conducted in erlenmeyers of 500 mL containing 300 mL of skimmed whey supplemented with 1% yeast extract, inoculated with 10% v/v. The concentrations of cells in the inoculum were determined from the optical density of 660 and 540 nm for *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 and *Lactobacillus helveticus*, respectively. The mediums were incubated at 30 °C during 168 h, without agitation. The samples were removed in regular times during fermentation for kinetic study and analyses of organic acid production. The results were 1.10 g lactic acid/100 mL for acidity and final pH of 3.76 for pure culture and, for the mixed culture, 2.32 g lactic acid /100 mL and 2.87 of acidity and pH, respectively. The maximum production of organic acids reached was 3.78 g/L for propionic acid and 3.10 g/L for acetic acid. All the analyzed parameters did not present statistically significant effects at 5% (P,0.05) level of significance.

Keywords: Skimmed whey. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. *Lactobacillus helveticus*. Organic acids.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 Curva gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts-no lag A e modelo completo de Baranyi e Roberts na B ..... 24
- Figura 2 Ciclo metabólico da fermentação da glicose por *Propionibacterium freudenreichii* ..... 29

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato a 30 °C – dados experimentais e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994)..... 50
- Figura 2 Curva de crescimento de *L. helveticus* em MRS a 37 °C - dados experimentais e ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts (1994) ..... 50
- Figura 3 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato com 0,10% de ácido propiônico -dados experimentais e ajuste a modelo de Baranyi e Roberts ..... 53
- Figura 4 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato com 0,15% de ácido propiônico - dados experimentais e ajuste a modelo de Baranyi e Roberts ..... 54
- Figura 5 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato com 0,25% de ácido propiônico - dados experimentais e ajuste a modelo de Baranyi e Roberts(1994)..... 55
- Figura 6 Evolução de Acidez e do pH dos meios de fermentação com soro desnatado, com inóculo da cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e mista com *Lactobacillus helveticus*..... 59

Figura 7	Lactose (g/100g) dos meios de fermentação com inóculo da <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1 e mista com <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	60
----------	---	----

### **CAPÍTULO 3**

Figura 1	Variação de pH do meio ao longo da fermentação por cultura mista de <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1 e <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	82
Figura 2	Variação de acidez ao longo da fermentação por cultura mista de <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1 e <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	83
Figura 3	Variação de ácido láctico no meio fermentado em 168 h de incubação.....	90

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Caracterização físico-químico do soro desnatado .....	48
Tabela 2	Parâmetros de crescimento observados para <i>P. freudenreichii</i> em caldo lactato a 30 °C e <i>L. helveticus</i> em caldo MRS a 37°C obtidos pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) .....	51
Tabela 3	Crescimento de <i>P. freudenreichii</i> PS-1 em função do tempo.....	52
Tabela 4	Crescimento de <i>L. helveticus</i> em função do tempo .....	52
Tabela 5	Parâmetros de crescimento observados para <i>P. freudenreichii</i> em caldo lactato com 0,10; 0,15 e 0,25% de ácido propiônico (AP) a 30 °C, obtidos por modelos primários de Baranyi e Roberts (1994) .....	56
Tabela 6	Contagem de células (UFC/mL) para as culturas puras de <i>P. freudenreichii</i> e mista de <i>P. freudenreichii</i> e <i>L. helveticus</i> .....	61

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Matriz do Planejamento fatorial completo 2 <sup>2</sup> com os valores codificados e reais para concentração de inóculo de <i>P. freudenreichii</i> PS-1 em %v/v e o tempo de inoculação de <i>P. freudenreichii</i> PS-1 .....	75
Tabela 2	Caracterização físico-química do soro desnatado. ....	80
Tabela 3	Produção de ácidos após 168h de fermentação .....	84
Tabela 4	Consumo de lactose após 168h de fermentação .....	85
Tabela 5	Fator de variação de concentração celular considerando tempo inicial e final de fermentação (168h).....	86

Tabela 6	Estimativa dos efeitos da concentração de inóculo de PS-1 e do tempo de adição no crescimento de <i>L. helveticus</i> e <i>Propionibacterium freundenreichii</i> PS-1 .....	87
Tabela 7	Varição de ácido láctico considerando-se o tempo inicial e final de fermentação .....	91
Tabela 8	Resultados do Planejamento fatorial para as variáveis respostas de produção de ácido propiônico (PAP) e acético (PAAC) .....	92
Tabela 9	Efeitos das concentrações de inóculo e tempo de inoculação de <i>P. freundenreichii</i> PS-1 na produção de ácido propiônico e acético em fermentação mista com <i>L. helveticus</i> .....	93

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução Geral .....	15
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Estrutura e propriedades do ácido propiônico</b> .....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Importância do ácido propiônico</b> .....	18
<b>2.1.2</b>	<b>Produção do ácido propiônico por processos fermentativos</b> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Bactérias propiônicas e condições do processo</b> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Microbiologia preditiva</b> .....	22
<b>2.4</b>	<b>DMFit</b> .....	25
<b>2.5</b>	<b><i>Lactobacillus helveticus</i></b> .....	26
<b>2.6</b>	<b>Reações bioquímicas da fermentação propiônica</b> .....	28
<b>2.7</b>	<b>Soro lácteo</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
	<b>CAPÍTULO 2</b> Adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico e estudo cinético da fermentação propiônica com cultura pura e mista .....	38
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>2.1</b>	<b>Obtenção e armazenamento do soro</b> .....	42
<b>2.2</b>	<b>Preparação e caracterização do soro</b> .....	42
<b>2.3</b>	<b>Microrganismos</b> .....	43
<b>2.4</b>	<b>Manutenção das culturas, ativação e preparo de inóculo</b> .....	43
<b>2.5</b>	<b>Pureza da cultura de bactérias propiônicas</b> .....	44
<b>2.6</b>	<b>Multiplificação celular</b> .....	44
<b>2.7</b>	<b>Determinação dos parâmetros de crescimento microbiano</b> .....	45
<b>2.8</b>	<b>Adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico</b> .....	45
<b>2.9</b>	<b>Estudo cinético da fermentação e produção de ácido propiônico</b> .....	45
<b>2.10</b>	<b>Microrganismos viáveis</b> .....	46
<b>2.11</b>	<b>Determinações do pH, acidez titulável, sólidos totais, cinzas, gordura, proteínas e lactose</b> .....	47
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>3.1</b>	<b>Caracterização do soro desnatado</b> .....	48
<b>3.2</b>	<b>Crescimento celular e determinação dos parâmetros de crescimento</b> .....	49
<b>3.3</b>	<b>Adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico</b> .....	53
<b>3.4</b>	<b>Estudo cinético da fermentação</b> .....	58
<b>3.4.1</b>	<b>Evolução do pH e da acidez na fermentação</b> .....	58
<b>3.4.2</b>	<b>Teor de lactose na fermentação</b> .....	60

3.4.3	Microorganismos viáveis.....	61
4	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS .....	63
	<b>CAPÍTULO 3 Efeito da concentração do inóculo de <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1 e <i>Lactobacillus helveticus</i> e do tempo de inoculação de <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1, sobre produção de ácido propiônico .....</b>	<b>67</b>
1	INTRODUÇÃO .....	69
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	71
2.1	Obtenção e preparação do soro.....	71
2.2	Microorganismo.....	71
2.3	Ativação dos microrganismos e manutenção das culturas .....	72
2.4	Padronização e preparo do inóculo para fermentação .....	73
2.5	Fermentação do soro desnatado.....	74
2.6	Planejamento experimental .....	74
2.7	Estudo cinético .....	76
2.8	Microorganismos viáveis.....	76
2.9	Determinação de ácidos orgânicos .....	77
2.10	Determinações de pH, acidez titulável, sólidos totais, cinzas, gordura, proteínas e lactose.....	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1	Caracterização do soro desnatado .....	80
3.2	Estudo cinético .....	81
3.2.1	Evolução do pH e acidez durante a fermentação propiônica .....	81
3.2.2	Consumo de lactose após 168h de fermentação por <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1e <i>Lactobacillus helveticus</i> ....	85
3.2.3	Crescimento celular de bactérias lácticas e propiônicas durante a fermentação.....	86
3.3	Análise da produção de ácido láctico ao longo da fermentação .....	90
3.4	Influência da concentração e tempo de inoculação de <i>Propionibacterium freudenreichii</i> PS-1, na produção de ácidos propiônico e acético .....	92
4	CONCLUSÃO.....	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
	REFERÊNCIAS .....	98
	APÊNDICE .....	102

## **CAPÍTULO 1 Introdução Geral**

### **1 INTRODUÇÃO**

O ácido propiônico é usado como conservante em alimentos e sementes e como ingrediente em termoplásticos, drogas, perfumes, aromas e solventes. A produção comercial de ácido propiônico é conduzida especialmente por síntese química utilizando-se matérias-primas obtidas do petróleo. Porém, a produção por processo fermentativo a partir de insumos renováveis é alternativa interessante. Diferentes fontes de carbono têm sido utilizadas nessas pesquisas, como glicose, glicerol, lactose e soro de queijo. Entretanto, a produção por fermentação ainda apresenta baixo rendimento e produtividade devido à inibição do crescimento celular e da síntese de ácido propiônico por altas concentrações do mesmo. Para diminuir o problema, várias estratégias têm sido testadas como fermentação extrativa e uso de bactérias tolerantes ao ácido propiônico obtidas por evolução adaptativa.

O setor de laticínios é de grande importância no estado de Minas Gerais, que é o maior produtor de queijos do Brasil, representando aproximadamente 50% da produção nacional. A produção de queijo no Brasil girou em torno de 745 mil toneladas em 2010, segundo Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial, atrás da União Europeia e Estados Unidos (LIMA FILHO; POMBO, 2010). Esse setor é um segmento importante da indústria mineira e apresenta tendência de crescimento pelo aumento no consumo de produtos lácteos, principalmente de queijos.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo - ABIQ (2010 apud SOUZA, 2007), cada quilo de queijo gera-se, em média, 8 Kg de soro, podendo-se deduzir que são gerados, aproximadamente, 5,6 milhões de toneladas anuais de soro. Embora o soro contenha alto valor nutricional, ele é o



maior problema das indústrias de laticínios, em todo o mundo, pois somente parte do soro produzido é utilizado, sendo o restante descartado como efluente, por causa do alto custo e da dificuldade de processá-lo (RAMOS, 2010), apesar da legislação ambiental ser cada vez mais rígida quanto ao destino do soro e outros produtos agroindustriais.

O soro pode ser usado como fonte de carbono e energia para produção de ácidos, combustíveis, bebidas fermentadas, dentre outros, conforme o tipo de microrganismo utilizado. Por isso, diversos estudos têm sido feitos utilizando-se soro de queijo em fermentações para produção de, entre outras substâncias, bioaromas e ácidos orgânicos. As bactérias propiônicas produzem ácido propiônico e seus sais possuem baixa tendência à dissociação; por isso são ativos em alimentos com baixa acidez.

A pesquisa do aproveitamento deste subproduto da indústria de laticínios é muito importante, pois seu uso em processos fermentativos pode gerar produtos de maior valor agregado como ácido propiônico, aproveitando seus nutrientes e minimizando seu impacto ambiental.

Objetivou-se, nesta pesquisa, avaliar a produção de ácido propiônico a partir da fermentação do soro lácteo por cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Estrutura e propriedades do ácido propiônico

O ácido propiônico é ácido orgânico monocarboxílico, com três átomos de carbono. Esse ácido é conhecido na nomenclatura usual como ácido propílico ou ácido propiônico e na nomenclatura IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) como ácido propanóico. Apresenta fórmula molecular ( $C_3H_6O_2$ ), de cadeia aberta e com a massa molar de 74 g/mol (BARBOSA, 2011; MCMURRY, 2010).

O ácido propiônico é caracterizado pela presença do grupo – COOH, denominado carboxila ou grupo carboxílico, apresenta características de gordura (grego: *prōtos*, primeiro; *piōn*, gordura) (BARBOSA, 2011). É caracterizado ainda por ter odor pungente, aroma e sabor suave. É o responsável pelo cheiro característico do queijo suíço, podendo ser usado como aromatizante (DALMASSO et al., 2011).

O ácido propiônico é polar e pode formar pontes de hidrogênio. Este ácido é solúvel em água e ioniza-se parcialmente em solução aquosa ( $CH_3CH_2COOH + H_2O = CH_3CH_2COO^- + H_3O^+$ ), com constante de dissociação  $K_a = 1.34 \cdot 10^{-5}$  a 25 °C. O grupo etila ( $CH_3CH_2-$ ) tem efeito indutivo doador de elétrons, sendo, portanto, ácido fraco e os seus sais ativos em alimentos com baixa acidez. Esse ácido apresenta temperatura de fusão de -22 °C e de ebulição de 141 °C (BARBOSA, 2011).

### 2.1.1 Importância do ácido propiônico

Os ácidos propiônico, acético e seus sais de cálcio, sódio e potássio têm sido usados em concentrações máximas de 0,32% como conservantes em alguns alimentos tais como queijos e pães. Essas moléculas inibem o crescimento de fungos filamentosos. A adição de 0,2% de propionato de cálcio no pão retarda a germinação de microrganismos e evita o amarelecimento e a viscosidade em massa de pães (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2007; YANG; SILVA, 1995).

O ácido propiônico tem muitos e variados usos como agente antifúngico em alimentos e sementes e como ingrediente em termoplásticos, drogas antiartrite, perfumes, aromas e solventes (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2007). O soro fermentado por *Propionibacterium freundenreichii*, substituindo os conservantes químicos, tem se comportado como agente fungistático natural quando incorporado em pães e outros produtos de confeitaria (HUANG et al., 2002).

Usa-se o ácido propiônico ou propionato como aditivo e conservante na produção de rações de animais. É também importante intermediário químico na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes, aromas e produtos farmacêuticos (CORAL et al., 2008).

Segundo Jay, Loessner e Golden (2007), o ácido propiônico é utilizado para lavar e sanificar carcaças de animais após o abate, com objetivo de reduzir a quantidade de patogênicos e aumentar a vida útil do produto. O efeito antimicrobiano do ácido propiônico deve-se à diminuição do pH para valores abaixo do crescimento e à inibição metabólica pelas moléculas de ácido não dissociado.

### 2.1.2 Produção do ácido propiônico por processos fermentativos

Atualmente, quase todo o ácido propiônico é produzido por síntese química de matérias-primas do petróleo (CORAL et al., 2008; ZHU et al., 2012). No entanto, na agricultura biológica, há grande esforço para minimizar parcela de recursos não renováveis (combustíveis fósseis, por exemplo) e maximizar uso de apenas matérias-primas renováveis, com objetivo de alcançar sistemas de produção sustentáveis e tornar-se agricultura autossuficiente (KÁDÁR et al., 2011). Em virtude da grande oscilação de preços de matérias-primas do petróleo e da necessidade de preservar o ambiente, na indústria são explorados métodos alternativos como processos fermentativos para a produção de ácido propiônico (CORAL et al., 2008).

O ácido propiônico pode ser produzido por bactérias propiônicas, via rota dos ácidos dicarboxílicos com ácidos acético e succínico como subprodutos. Entretanto, o rendimento e produtividade baixos devido à inibição do ácido propiônico no crescimento celular e na síntese de ácido propiônico ainda são problemas para produção por fermentação (ZHU et al., 2010). Esse baixo rendimento ressalta a importância de desenvolver duas estratégias: fermentação extrativa propiônica (SRIVASTAVA, 2001) e produção de ácido propiônico com bactérias tolerantes ao ácido propiônico obtidas por meio de adaptação evolutiva (ZHU et al., 2012). Outros trabalhos revelam que a inibição da produção do ácido propiônico foi substancialmente superada aumentando-se a concentração de extratos de levedura ou usando-se outro substrato para melhorar a fermentação (FENG et al., 2010a; MARCOUX et al., 1992). Marcoux et al. (1992) concluíram que a suplementação do meio de cultura com extrato de levedura e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aumentou a taxa de crescimento, em uma população de células de  $1,3 \times 10^{10}$  UFC/mL em 48h.

## 2.2 Bactérias propiônicas e condições do processo

São chamadas de bactérias propiônicas porque produzem grande quantidade de ácido propiônico, através da conversão de ácido láctico em ácidos propiônico e acético e CO<sub>2</sub>. São gram-positivas, pertencem ao grupo de bactérias lácticas na classe de actinobactéria, principalmente isoladas a partir de produtos lácteos, em especialmente de queijo tipo suíço em que a densidade de sua população em geral, atinge 10<sup>9</sup> UFC/g (DALMASSO et al., 2011). São imóveis, não formam esporos, anaeróbicas e anaeróbicas facultativas, catalase positiva e apresentam-se em forma de bastonetes curtos ou de cocos, de acordo com o meio em que se encontram. As colônias menores podem apresentar cores amarelas, alaranjadas ou vermelho-escuro (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002).

As bactérias propiônicas têm papel importante em vários processos industriais. Entre os quais a obtenção de inóculos para produção de queijos tipo suíço e como probióticos para produção de vitamina B<sub>12</sub> (ZÁRATE, 2012) e ácido propiônico (FENG et al., 2010a; ZHU et al., 2010, 2012). Além disso, são utilizadas como cultura e aditivos em alimentos e ensilagem para inibir o crescimento de bolores e leveduras e em preparações farmacológicas (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002). As bactérias propiônicas lácticas são consideradas probióticas devido à produção de ácido propiônico, bacteriocinas, propioninas e vitamina B<sub>12</sub> (ZÁRATE; CHAIA, 2012).

Existem evidências claras atuais de que a cultura pura ou mista de propionibactéria estimula o crescimento de outras bactérias e exercem efeitos benéficos ao hospedeiro (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002; ZÁRATE; CHAIA, 2012). Outras pesquisas têm evidenciado que as bactérias propiônicas podem desenvolver aroma doce e o cheiro de nozes em queijos (DALMASSO et al., 2011; MAISTRO; DAMACENA; FREIRE, 2002). Peptídeos e aminoácidos, em particular prolina e leucina produzidos pela proteólise, e ácidos graxos

produzidos pela lipólise, ao longo do catabolismo de seus produtos, contribuem significativamente para o desenvolvimento dos “flavors” característicos desses queijos (ZÁRATE; CHAIA, 2012). Nesse sentido, o permeado de soro fresco, fermentado por bactérias propiônicas, pode ainda servir como ingrediente natural para produtos de panificação (YANG; SILVA, 1995).

As bactérias propiônicas isoladas no leite crescem na faixa de temperatura de 15 a 40°C. No entanto, a temperatura ótima de crescimento em condições anaeróbicas, situa-se em torno de 30°C. Contudo as bactérias propiônicas podem permanecer ativas em temperaturas baixas (MOURA, 2001). Essas bactérias apresentam ainda pH ótimo de crescimento na faixa de 6,5 a 7,0. O pH igual a 5,0 é o ponto crítico e em meios com valores de pH abaixo desse, há queda do crescimento das bactérias propiônicas (BERESFORD et al., 2001). Os valores baixos de pH inibem o crescimento das bactérias mas não as mata. Esse notável efeito é provavelmente explicado pela alta concentração de íons hidrogênio que podem inibir a atividade das proteínas expostas na parte externa da membrana celular, afetando as propriedades dos lipídeos na membrana citoplasmática (DOELLE, 1985).

Entretanto outro estudo avaliou o efeito do pH na velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) e na velocidade específica de formação de ácido propiônico ( $\mu_p$ ), demonstrando que o pH de 6,5 era benéfico para obter o máximo de crescimento de células ( $\mu_{max}$ ) no intervalo de fermentação de 0 a 48h e que, para manter o valor elevado de  $\mu_p$  após 48h para a fermentação do ácido propiônico, o pH 6,0 foi mais benéfico. Esse estudo concluiu que, aplicando-se a estratégia do controle do pH, o rendimento e a produtividade do ácido propiônico foram aumentados em 31,75% e 45,90%, respectivamente, em comparação com os melhores resultados do processo de pH constante (FENG et al., 2010b).

### 2.3 Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva é uma área da Microbiologia que usa modelos matemáticos para descrever e prever a evolução quantitativa da população microbiana ao longo do tempo. O tratamento dos dados obtidos pelo estudo permite obter uma equação que poderá prever o tempo de ajuste ao meio (fase lag) ou a taxa de crescimento após a adaptação das células do microrganismo ao meio. Ao variar as condições ambientais como o pH ou o tempo e temperatura ou outros fatores intrínsecos e extrínsecos, torna-se possível verificar se há crescimento nas condições testadas e gerar curvas de crescimento/inativação microbiana (DANNENHAUER, 2010).

Das várias classificações dos modelos preditivos destaca-se a classificação proposta por Buchanan, Whiting e Damert (1997), os quais consideram os modelos como primários, secundários ou terciários. Os modelos primários descrevem as alterações no número de microrganismos ou nas respostas microbianas com o tempo, num dado ambiente específico, enquanto que modelos secundários indicam a forma como os parâmetros dos modelos primários se alteram com mudanças nos fatores ambientais como a temperatura, pH e a atividade de água. Enquanto que os modelos terciários consistem em softwares que conjugam os modelos primários e secundários, constituindo ferramenta útil para a aplicação no nível da produção industrial da microbiologia preditiva.

Os modelos primários estão aptos a estimar o crescimento celular em UFC/ g ou mL, a formação de toxinas, os níveis de substratos ou de produtos do metabolismo microbiano, ao longo do tempo, através do fornecimento de valores de parâmetros de equações específicas (BUCHANAN; WHITING; DAMERT, 1997).

Diversos modelos preditivos primários foram desenvolvidos e descritos, como a Função de Gompertz, Função modificada de Gompertz, Modelo Logístico, Modelo Baranyi, Modelo Monod, Modelo Monod modificado, valores D de inativação térmica, Modelo de decréscimo de crescimento de Whiting e Cygnarowicz, Modelo linear de três fases (TELEKEN; ROBAZZA; GOMES, 2011).

O modelo de crescimento microbiano desenvolvido por Baranyi e Roberts (1994) tem sido utilizado amplamente desde que foi introduzido no início dos anos 90. A notabilidade desse modelo deve-se, de algum modo, à disponibilidade de dois programas: DMFit e o MicroFit, distribuídos pelo Institute of Food Research, UK.

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) tem 4 parâmetros principais: valor inicial, lag, velocidade máxima e valor máximo (final) e 2 parâmetros relativos à curvatura: mCurv e nCurv, que descrevem a curvatura do modelo sigmóide no início e no fim da fase de crescimento, respectivamente. Os valores relativos a esses parâmetros dependem do modelo escolhido no programa (DMFit), isso é, se escolher "model of Baranyi and Roberts- no lag", o valor de mCurv é ajustado a 0 e, assim o modelo descreve apenas o crescimento/morte microbiana e a fase estacionária, evidenciada pela Figura 1A. No estudo do modelo de "Baranyi and Roberts- complete model", os parâmetros definidos são mCurv=10 nCurv=1, tendo-se nesse caso, a representação das fases lag, de crescimento e estacionária da população microbiana, mostrada pela Figura 1B. Na Figura 1, apresentam-se as curvas geradas pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994).



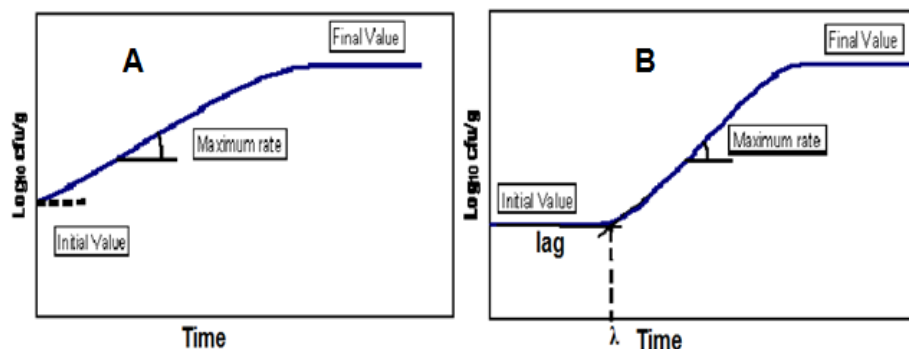


Figura 1 Curva gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts-no lag A e modelo completo de Baranyi e Roberts naB

Matematicamente, o modelo de Baranyi e Roberts é definido pela equação:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{q(t)}{1+q(t)} \mu_{\max} \left(1 - \left(\frac{N(t)}{N_{\max}}\right)^m\right) N(t) \quad (1)$$

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{\max} \cdot q(t) \quad (2)$$

Onde  $N$  representa o número de células existentes no tempo  $t$ ,  $\mu_{\max}$  é a densidade máxima de células e  $q(t)$  é a média fisiológica das células, a qual se altera com o tempo. A parte  $\frac{q(t)}{1+q(t)}$  representa o ajustada função  $\alpha(t)$  como fator extra para descrever a fase lag de crescimento. Essa função permite a transição da fase lag para a fase de crescimento exponencial, por descrever a diminuição gradual do efeito do ambiente embutido em  $q(0)$ , que representa o estado fisiológico inicial das células no momento da inoculação (SWINNEN et al., 2004).

$$\alpha(t) = \frac{q(t)}{1+q(t)} \quad (3)$$

A transformação mais estável de  $q(0)$  pode ser definida através da equação 4.

$$h(t) = \ln \left( 1 + \frac{1}{q_0} \right) = -\ln \alpha(t) \quad (4)$$

O valor  $h_0 = h(0) = -\ln \alpha(0)$  que é o produto da taxa específica de crescimento máximo e de lag, portanto, esse produto é constante para as curvas de crescimento diferentes, desde que o estado fisiológico das células na inoculação seja idêntico (BARANYI; ROBERTS, 1994).

#### 2.4 DMFit

DMFit é sistema usado internacionalmente para modelar avariação do logaritmo das concentrações de células de culturas bacterianas em relação ao tempo. Esse programa é baseado no trabalho de Baranyi e Roberts (1994) “A dynamics approach to predicting bacterial growth in food”, publicado em 1994 na revista *International Journal of Food Microbiology* e é uma extensão do programa Excel para ajustar curvas de crescimento, em que a fase linear é precedida pela fase lag.

Os modelos secundários indicam a forma como os parâmetros dos modelos primários alteram-se com mudanças nos fatores ambientais como a temperatura, pH atividade de água entre outros. A temperatura é o fator de maior relevância nas reações de deterioração de alimentos, principalmente na deterioração provocada por microrganismos, pois a velocidade de crescimento dos microrganismos e a fase lag são largamente dependentes da temperatura.

Estes são exemplos de modelos secundários: o modelo de Belehradek; de Ratkowsky; de Arrhenius; modelo modificado de Arrhenius; modelo

Probabilístico; Valor Z; Polinomiais ou resposta; modelo de Superfície e de Williams-Landel Ferry (ISABELLE; ANDRE, 2006).

Os modelos terciários consistem em softwares que conjugam os modelos primários e secundários, constituindo-os ferramenta útil para a aplicação no nível da produção industrial da microbiologia preditiva. Esses modelos compreendem USDA Pathogen Modeling Program; Food Micro Model; ExPert Systems e ComBase (ISABELLE; ANDRE, 2006).

## **2.5 *Lactobacillus helveticus***

*Lactobacillus* possuem a forma de bastonetes, variando de longos a curtos, são gram-positivas e não formam esporos. Os lactobacilos não possuem sistema de citocromo e são incapazes de utilizar o oxigênio como acceptor de elétrons. Ao invés disso, essas bactérias produzem ácido láctico a partir de simples fermentação de carboidratos. A acidez produzida inibe as bactérias competidoras, criando nicho ecológico no qual os latobacilos levam vantagem em relação aos competidores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Estas bactérias são utilizadas desde os primórdios, na fabricação de diversos produtos fermentados. Algumas cepas são consideradas probióticas e proteolíticas, uma característica fisiológica que tem sido muito estudada. Durante a fermentação do leite, os sistemas proteolíticos das bacterias lácticas desempenham papel fundamental, onde permitem que as bactérias cresçam bem, assegurando fermentação bem sucedida (LOZO et al., 2011). São ainda responsáveis por vários processos, tais como a elaboração de queijos e de iogurtes, o envelhecimento dos vinhos, a conservação de alimentos (chucrute, silagem para o gado) e a produção de ácido láctico, aditivo na indústria de alimentos como acidulante e estabilizante (MALAJOVICH, 2011).

*Lactobacillus helveticus* é muito usada em leites fermentados e queijos. Essa bactéria possui enzimas que favorecem o seu crescimento rápido no leite com perfis específicos de hidrólise do substrato, o que pode explicar a identificação de estirpes associadas com interessantes propriedades tecnológicas. Essas enzimas também desempenham papéis cruciais na textura e sabor de produtos lácteos, bem como a geração in situ de peptídeos bioativos (SADAT-MEKMENE et al., 2011). Em comparação com outros lactobacillus termofílicos *L. helveticus* é relativamente adaptável a diferentes condições de crescimento, e apresenta boa capacidade para fermentar grande variedade de carboidratos. *L. helveticus* produz grande quantidade do ácido láctico, em comparação com outros lactobacillus (MICHAYLOVA; MINCOVA, 2005). São autotróficas para a maioria dos aminoácidos e a sua atividade proteolítica é considerada a mais forte entre as bactérias lácticas (LOZO et al., 2011; SADAT-MEKMENE et al., 2011).

Para todos os microrganismos existem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação. Verifica-se que o pH da neutralidade (6,5 – 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos. Alguns são favorecidos pelo meio ácido, como ocorre com *Lactobacillus*, certamente porque há inibição da microbiota competidora. No geral, essas bactérias são tolerantes a baixos níveis de pH, com faixa ótima de 5,5 a 5,8, em pH neutro ou em reações alcalinas há diminuição na produção de ácido e o crescimento decresce. A temperatura ótima de crescimento varia entre 30 a 40°C, são acidófilas e encontradas naturalmente em: efluentes, esgotos, grama, em laticínios, leite, carne e derivados, cerveja, vinho, frutas, suco de frutas, água, vegetais, picles e trato intestinal de animais homeotérmicos (HOFVENDAHL; HAHN-HLIGERDAL, 1997). Sendo ainda *L. Helveticus* usada para fabricação de produtos lácteos, uma vez que são as espécies mais acidificantes e tolerantes ao ácido láctico que conduzem à diminuição do pH até 3,5 (NIELSEN et al., 2009).

## 2.6 Reações bioquímicas da fermentação propiônica

Algumas das substâncias produzidas pelo metabolismo microbiano, via fermentação propiônica podem ocorrer tanto a partir de ácido láctico ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) como de seu sal lactato de cálcio ( $(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Ca}$ ). Pelo balanço da fermentação, obtém-se que três unidades de ácido láctico, com 270g fornecem duas unidades de ácido propiônico com 148g, uma unidade de ácido acético com 60g, uma unidade de gás carbônico com 44g e uma de água com 18g, em que uma unidade equivale a um mol de  $\text{CO}_2$ , que equivale a 22,4 litros (MOURA, 2001). A fermentação realizada pelas bactérias propiônicas pode ocorrer ainda a partir de glicose, glicerol e alguns aminoácidos, mas o principal substrato é o lactato e os produtos dessa fermentação são os ácidos propiônico, acético e o  $\text{CO}_2$  (MOURA, 2001).

A lactose, glicose e lactato, substratos preferidos pelas bactérias propiônicas, são convertidos em ácido propiônico através do ciclo do ácido dicarboxílico. Essa conversão segue a reação de transcarboxilação, onde eles podem converter piruvato a oxaloacetato, que então é convertido a succinato. Succinato é convertido através de intermediários da metilmalonil coenzima A (CoA) a propionato. O grupo carboxílico removido da metilmalonil-CoA é transferido o piruvato para formar oxaloacetato, fazendo o caminho cíclico (HUANG et al., 2002). Ácido acético e  $\text{CO}_2$  são formados a partir do piruvato via piruvato desidrogenase (SOUZA, 2007). A Figura 2 apresenta o ciclo metabólico da fermentação da glicose realizado por *Propionibacterium freudenreichii*.

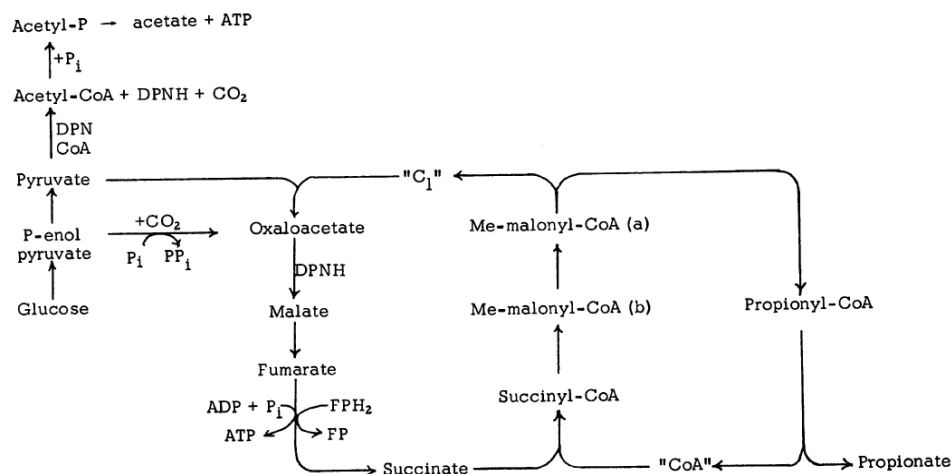


Figura 2 Ciclo metabólico da fermentação da glicose por *Propionibacterium freudenreichii*

Fonte: Allen (1964)

Nota: Me-malonyl-CoA é metilmalonyl-CoA, (a) e (b) são isômeros. FP é flavoproteína e FPH<sub>2</sub> é reduzido a flavoproteína.

As maiores desvantagens da fermentação são o lento crescimento da bactéria, alta produção de inibidores e a dificuldade de recuperação do produto (HUANG et al., 2002). Além disso, o pH do meio de fermentação pode afetar tanto o crescimento dos microrganismos como a produção e estabilidade dos metabólitos obtidos (LONSANE; GHILDYAL; BUDIATMAN, 1985).

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

Outros estudos indicam elevada capacidade de tamponamento de alguns substratos, assim como o uso de solução salina inicial elimina a necessidade de controle do pH durante o processo fermentativo, uma vez que

permitem que, durante o crescimento, o pH não sofra variações bruscas e não atinja valores críticos para o metabolismo (LONSANE; GHILDYAL; BUDIATMAN, 1985).

## **2.7 Soro lácteo**

Soro lácteo é o principal subproduto obtido na produção de queijo. Ele contém alta concentração de matéria orgânica, principalmente proteínas, lactose e sais minerais (CUARTAS-URIBE et al., 2009). É um líquido de cor amarela esverdeada, que possui proteínas de alto valor nutritivo, aproximadamente a metade dos sólidos do leite, com significativo valor nutricional, e boas propriedades funcionais (MAWSON, 1994).

O soro consiste em aproximadamente 85 a 90% do volume do leite usado para a transformação de queijo e retém 55% de nutrientes do leite (BARBOSA, 2010), consiste ainda em grande quantidade de água e solutos de baixa massa molar como a lactose, sais minerais, e outros componentes minoritários (TOLKACH; KULOZIK, 2005). A grande quantidade de soro produzida nas queijarias gera preocupação com relação ao meio ambiente, pois o soro lácteo lançado em um corpo receptor possui uma Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) em torno de 60.000 mg/L. A conversão do soro de queijo em novos produtos pode ser mais uma alternativa para a disposição do mesmo, pois por um lado obtêm-se redução na DBO e por outro ganha-se novo produto resultante da fermentação (BARBOSA, 2010).

Vários estudos indicam que a composição e o tipo de soro produzido na indústria leiteira variam em função dos processos tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (MARWAHA; KENNEDY, 1988).

Bertazzoni et al. (2004) afirmam a existência de várias opções para o aproveitamento do soro, podendo ser utilizado como matéria-prima na

elaboração de bebidas lácteas, ou até em tecnologias modernas para obtenção de produtos específicos e/ou novos a serem utilizados, principalmente pela indústria de alimentos.

Segundo Souza (2007), o soro pode ser usado na alimentação humana na forma líquida, condensada ou em pó, sendo que a forma em pó é geralmente preferida por apresentar maior tempo de armazenamento, podendo ser modificado e/ou misturado com outros produtos servindo a propósitos específicos.

O soro pode ser utilizado ainda sob diferentes formas: soro fresco, pasteurizado ou não, concentrado, contendo 35 a 60% de sólidos, soro adoçado, contendo 38% de sólidos e 38% de açúcares, soro fresco e, finalmente, podem-se utilizar, os componentes individuais do soro, como a lactose e proteínas (SOUZA, 2007).

Vários estudos despertam atenção sobre maior problema do soro, pois esse tem alto poder poluente, sendo muitas vezes descartado no meio ambiente, gerando poluição e degradação dos corpos receptores (BARBOSA, 2011).

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

Jan et al. (2002) sugerem a fermentação do soro como via para produção de vários compostos de grande valor, dependendo dos microrganismos utilizados, considerando que o processo que converta a lactose na substância desejada é seguro e viável economicamente.



## REFERÊNCIAS

ALLEN, S. H. G. et al. Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 87, n. 1, p. 171-187, Jan. 1964.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Review paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 3/4, p. 277-294, Nov. 1994.

BARBOSA, L. C. A. **Introdução à química orgânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 299 p.

BARBOSA, S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol aguardiente: estudio de la producción de etanol use of serum as a substrate for production of marc: kinetic study of the production of ethanol. **Revista Verde**, Limoeiro, v. 5, n. 1, p. 7-25, 2010.

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

BERTAZZONI, M. et al. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 8, p. 723-736, Aug. 2004.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, London, v. 14, n. 4, p. 313-326, Aug. 1997.

CORAL, J. et al. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 151, n. 2/3, p. 333-341, 2008.

CUARTAS-URIBE, B. et al. A study of the separation of lactose from whey ultrafiltration permeate using nanofiltration. **Desalination**, Amsterdam, v. 241, n. 1, p. 244-255, May 2009.

DALMASSO, M. et al. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 113-20, 2011.

DANNENHAUER, C. E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia predetiva**. 2010. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DOELLE, H. W. Biotechnology of solid substrate fermentation in the production of food. **ASEAN Food Journal**, Serdang, v. 1, p. 10-14, 1985.

FENG, X.H. et al. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for propionic acid production with *Propionibacterium Freudenreichii* CCTCC M207015. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 2, p. 343-349, 2010a.

\_\_\_\_\_. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 33, n. 9, p. 1077-1085, 2010b.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HLIGERDAL, B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 229, n. 96, p. 301-307, 1997.

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

ISABELLE, L.; ANDRE, L. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review / vision quantitative du comportement microbiologique lors du Pre traitement des produits alimentaires employant une approche / gre / e de la mode / lisation: bilan inte. **International Journal of Refrigeration**, Surrey, v.29, n. 6, p. 968-984, Sept. 2006.

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

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Chicago: Seventh, 2007. 790 p.

KÁDÁR, Z. et al. Bioethanol production by inherent enzymes from rye and wheat with addition of organic farming cheese whey. **Science Direct**, New York, v. 90, n. 11, p. 3323-3329, Nov. 2011.

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

LIMA FILHO, R. R.; POMBO, G. Aumenta o consumo de queijo no Brasil. **Carta Leite**, Bebedouro, ano 6, n. 105, set. 2010. Disponível em: <[http://www.bovinos.ufpr.br/100921\\_Aumenta\\_o\\_consumo\\_de\\_queijo\\_no\\_brasil\\_def.pdf](http://www.bovinos.ufpr.br/100921_Aumenta_o_consumo_de_queijo_no_brasil_def.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2013.

LONSANE, N. P.; GHILDYAL, S.; BUDIATMAN, S. V. R. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 7, n. 6, p. 258-265, June 1985.

LOZO, J. et al. Comparative analysis of  $\beta$ -casein proteolysis by PrtP proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, PrtR proteinase from *Lactobacillus rhamnosus*. **International Dairy Journal**, Barking, v. 21, n. 11, p. 863-868, Nov. 2011.

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

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro: M. Feffer, 2011. 320 p.

MARCOUX, V. et al. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 74, n. 2, p. 95-99, Apr. 1992.

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

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

MCMURRY, J. **Química orgânica: combo**. Rio de Janeiro: Learning, 2010. 753 p.

MICHAYLOVA, M.; MINCOVA, S. Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Bulgarian yoghurt, cheese, plants and human faecal samples by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of cell-wall proteins, ribotyping and pulsed field gel fingerprint. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 10, p. 998-1005, Oct. 2005.

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

NIELSEN, M. S. et al. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 3, p. 155-165, 2009.

RAMOS, T. M. **Produção de xarope de lactulose a partir de soro de ricotta e seu emprego em iogurte e queijo Quark**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SADAT-MEKMENE, L. et al. Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 1-13, Jan. 2011.

SOUZA, A. S. **Estudo do processo de microencapsulação por “spray-drier” de bioaroma produzido por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**. 2007. 139 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SRIVASTAVA, V. G. A. K. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 676-680, June 2001.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94, n. 2, p. 137-159, July 2004.

TEIXEIRA, M. I. **Microencapsulação de aroma de queijo proveniente da fermentação do permeado de soro por *Propionibacterium freudenreichii* aprisionada em alginato de cálcio**. 2004. 117 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

TELEKEN, J. T.; ROBAZZA, S.; GOMES, A. Mathematical modeling of microbial growth in milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 4, p. 891-896, out./dez. 2011.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 309 p.

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

ZHU, L. et al. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 112, p. 248-253, 2012.

ZHU, Y. et al. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 22, p. 8902-8906, 2010.

ZÁRATE, G. **Dairy Propionibacteria**: less conventional probiotics to improve the human and animal health. Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

ZÁRATE, G.; CHAIA, A. P. Influence of lactose and lactate on growth and  $\beta$ -galactosidase activity of potential probiotic *Propionibacterium acidipropionici*. **Anaerobe**, London, v. 18, n. 1, p. 25-30, Jan. 2012.

## **CAPÍTULO 2 Adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico e estudo cinético da fermentação propiônica com cultura pura e mista**

### **RESUMO**

A utilização comercial dos processos de fermentação para a produção de ácidos orgânicos é frequentemente limitada por baixos rendimentos de produção. Esse baixo rendimento ressalta a importância de desenvolver estratégias de fermentação para aumentar a produção. Avaliaram-se, neste trabalho, as adaptações das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico, foi avaliada também a cinética da fermentação propiônica com cultura pura e mista, onde amostras do meio fermentado foram coletadas em tempos regulares para determinações de pH, acidez total e açúcares redutores. A adaptação das linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 foi conduzida usando erlenmeyers com 100 mL do caldo lactato com concentrações crescentes de 0 %, 0,1 %, 0,15 % e 0,25 % do ácido propiônico incubados a 30°C, monitorado o crescimento a partir da densidade óptica ( $DO_{660nm}$ ). Os resultados mostraram que o aumento da concentração do ácido propiônico promoveu a diminuição na velocidade específica máxima de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, de 0,1137 a 0,0277 h<sup>-1</sup>. Portanto o crescimento celular de bactérias propiônicas é negativamente influenciado pela concentração de ácido propiônico, aumentando o tempo de crescimento de 32h para 100h, com o aumento da concentração de ácido propiônico no meio de crescimento para 0,25% m/v. No estudo cinético, o pH variou de 5,81 a 3,76 na cultura pura e de 5,48 a 2,87 na cultura mista em 168h de fermentação. A cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* apresentou maior teor de acidez que variou de 0,0999 a 2,1978 g de acidez total por 100mL da amostra, com consumo de lactose variando de 2,91 a 2,56g/100g em 168h de incubação a 30°C. Para a cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, o teor de acidez foi de 0,0999 a 1,0989g de acidez total por 100mL da amostra e a variação de lactose foi de 2,24 a 2,32g/100g. Este estudo mostrou que após 72h de fermentação não ocorria muita variação nos parâmetros analisados de pH, acidez e lactose.

Palavras-chave: Adaptação. *Propionibacterium freudenreichii* PS1. *Lactobacillus helveticus*. Fermentação.

## CHAPTER 2 Adaptation of the propionic bacteria to the increasing concentration of propionic acid and kinetic study of propionic fermentation with pure and mixed cultures

### ABSTRACT

The commercial use of fermentation processes in order to produce organic acids is frequently limited by low yield. This highlights the importance of developing fermentation strategies to increase production. In this work we evaluated the adaptation of propionic bacteria to increasing concentrations of propionic acid. We also evaluated the kinetic of propionic fermentation with pure and mixed cultures, in which samples of the fermented medium were collected in regular times to determine pH, total acidity and reducing sugar. The adaptations of the *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 lineages was conducted using erlenmeyers with 100 mL of lactate juice with increasing concentrations of propionic acid (0%, 0.1%, 0.15% and 0.25%), incubated at 30 °C, monitoring the growth from the optic density ( $DO_{660\text{ nm}}$ ). The results showed that the increase in propionic acid concentration promoted the decrease in *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 maximum specific growth speed from 0,1137 a 0,0277 h<sup>-1</sup>. Therefore, the cellular growth of propionic bacteria is negatively influenced by the concentrations of propionic acid, increasing the time of growth from 32 h to 100 h, with an increase of propionic acid concentration to 0.25% m/v. In the kinetic study, the pH varied from 5.81 to 3.76 in the pure culture and from 5.48 to 2.87 in the mixed culture in 168 h of fermentation. The *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 mixed culture presented higher acidity rate which varied from 0.0999 to 2.1978 g of total acidity per 100 mL of the sample, with lactose consumption varying from 2.91 to 2.56 g/100g in 168 h of incubation at 30 °C. For the *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 pure culture, the acidity rate was from 0.0999 to 1.0989 g of total acidity per 100 mL of the sample and the variation of lactose was from 2.24 to 2.32 g/100 g. This study showed that not much variation of the analyzed pH, acidity and lactose parameters occurred after 72 h of fermentation.

Keywords: Adaptaion. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. *Lactobacillus helveticus*. Fermentation.



## 1 INTRODUÇÃO

O ácido propiônico é utilizado como bioaroma, conservante, na produção de rações animais, síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfume, produtos farmacêuticos e fabricação de termoplásticos e solventes. Na indústria, a produção comercial de ácido propiônico é conduzida especialmente por síntese química a partir de matérias-primas do petróleo, o que ressalta a importância de desenvolvimento da produção a partir de insumos renováveis. Nesse caso, diversas fontes de carbono têm sido utilizadas nessas pesquisas, como glicose, glicerol e lactose (CORAL et al., 2008). Esses substratos podem ser convertidos pelas bactérias propiônicas a ácido propiônico através do ciclo do ácido dicarboxílico (CHEN et al., 2012). Entretanto, o rendimento e produtividade baixos devido à inibição do ácido propiônico no crescimento celular e na síntese de ácido propiônico ainda são problemas para sua produção por fermentação (ZHU et al., 2010). Para alguns autores a inibição do ácido propiônico no crescimento celular e na síntese de ácido propiônico, tem requerido desenvolvimento de várias estratégias: fermentação propiônica extrativa (SRIVASTAVA, 2001) e produção de ácido propiônico por bactérias tolerantes ao ácido propiônico obtidas por meio de adaptação evolutiva (ZHU et al., 2012). Outros autores salientam que a inibição da produção do ácido propiônico foi substancialmente superada aumentando-se a concentração de extrato de levedura ou usando outro substrato para melhorar a fermentação (LIU et al., 2011; MARCOUX et al., 1992). Marcoux et al. (1992) provaram que a suplementação do meio de cultura com extrato de levedura e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aumentava a taxa de crescimento, em uma população de células de  $1,3 \times 10^{10}$  UFC/mL em 48h.

A estimativa da concentração de células das culturas em qualquer estudo, a partir da análise das curvas de crescimento obtidas, pode favorecer o desenvolvimento de processos fermentativos que conduzam a condições ótimas

de crescimento e, conseqüentemente, à obtenção de bons resultados na indústria de fermentação. É sabido ainda que todos os microrganismos necessitam de conjunto de fatores que lhes permitam viver e crescer num determinado meio ambiente. Esses fatores são diferentes de microrganismo para microrganismo.

Assim, esta pesquisa foi conduzida objetivando-se avaliar a adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico e estudar a cinética de fermentação usando cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e cultura mista com o mesmo microrganismo e *Lactobacillus helveticus* para produção do ácido propiônico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Todas as análises foram realizadas nos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos, Laticínios, Bioquímica de Alimentos, Microbiologia de Alimentos e no Laboratório das Análises Avançadas e Bioquímicas do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA.

### **2.1 Obtenção e armazenamento do soro**

O soro desnatado foi doado pelo laticínio Verde Campo em Lavras-MG e transportado imediatamente em bombonas de 20L para o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, onde, foi mantido congelado a  $-18^{\circ}\text{C}$  em garrafas PET de 2L até o momento de análise, segundo as recomendações adaptadas da ISO 7218 (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION - ISO, 2007).

### **2.2 Preparação e caracterização do soro**

O soro foi filtrado a vácuo, com papel- filtro faixa azul de diâmetro 12,5cm e porosidade 8  $\mu\text{m}$  para a homogeneização da matéria-prima e retirada de sólidos em suspensão. O pH do filtrado foi ajustado a 7,0 com NaOH 0,2 N, antes da autoclavagem. Paralelamente, foram retiradas alíquotas para análises de acidez titulável e pH (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1998), além de lactose (método de Antrona) (DISCHE, 1962), para a caracterização do soro, realizada em triplicata.

### 2.3 Microrganismos

Os microrganismos, *Propionibacterium freudenreichii* PS1 e *Lactobacillus helveticus* foram doados por Empresa Christian Hansen Indústria.

### 2.4 Manutenção das culturas, ativação e preparo de inóculo

A cultura liofilizada de *Propionibacterium freudenreichii* PS1 (Chr-Hansen) foi ativada em caldo lactato por litro (m/v): 1% de extrato de levedura, 1% de peptona de carne, 0,025% de  $K_2HPO_4$  e 1% de lactato de sódio segundo metodologia de Marcoux et al.(1992), e incubado a 30°C por 48h. Após incubação alíquotas de 1mL da cultura foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio ,contendo 9 mL de água peptonada realizando-se diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em ágar lactato e incubadas a 30°C por 5 dias. Colônias isoladas foram transferidas para ágar lactato após a confirmação de pureza pelo teste de catalase, morfologia e coloração de Gram. A cultura estoque purificada foi preparada em caldo lactato, adicionando 15% de glicerol, previamente ajustado a pH 7 e autoclavados a 121°C durante 15 minutos, congelado a -18 °C conforme metodologia adaptada de WoskoveGlatz(1991).

A cultura liofilizada de *Lactobacillus helveticus* foi ativada em meio MRS, contendo por litro 10 g de peptona, 8 g de extrato de carne, 4g de extrato de levedura, 20 g de glucose, 2 g de  $K_2HPO_4$ , 5 g de acetato de sódio, 2g de citrato de amônio, 0,2 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,05g de sulfato de manganês tetraidratado esterilizado a 121°C por 15 minutos.As bactérias foram ativadas a 37 °C por 24h em tubo de ensaio, contendo 10 mL do caldo MRS. O estoque da cultura foi feito com 12% de leite desnatado e 15% de

glicerol previamente autoclavados, congelado a -18 °C, conforme metodologia adaptada de Woskow e Glatz (1991).

Para a padronização dos inóculos, alíquotas de 10%v/v da cultura ativada de *Propionibacterium freudenreichii* foram transferidas para frascos contendo 100 mL do caldo lactato estéril e incubada a 30<sup>o</sup>C por 24h. Alíquotas de 10%v/v da cultura ativada de *Lactobacillus helveticus* foram transferidas para frasco contendo 100 mL do meio MRS incubada a 37 °C por 24h.

## **2.5 Pureza da cultura de bactérias propiônicas**

Foram feitos testes para a confirmação da pureza da cultura verificando-se a morfologia das células usando microscópio óptico, a morfologia das colônias nas placas, teste da catalase e coloração de Gram (TEIXEIRA, 2004).

## **2.6 Multiplicação celular**

Multiplicação celular de *Propionibacterium freudenreichii* PS1 foi acompanhada pela medição da absorbância em espectrofotômetro (DO<sub>660</sub>) (FEMTO 700 S Soft., Brasil). O acompanhamento do crescimento celular de *Lactobacillus helveticus* foi realizado no mesmo espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm (DO<sub>540</sub>). As curvas de crescimento foram realizadas em triplicata segundo a metodologia adaptada de Feng et al. (2010a, 2010b).

## **2.7 Determinação dos parâmetros de crescimento microbiano**

Os parâmetros de crescimento microbiano como velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), duração da fase lag ( $\lambda$ ), número inicial e máximo de células ( $N_0$ ) e ( $N_{\text{máx}}$ ) respectivamente foram determinados utilizando-se a metodologia de modelo preditivo descrito por Baranyi e Roberts (1994). Os parâmetros de crescimento foram obtidos pelo ajuste dos dados à equação de Baranyi e Roberts (1994), usando software DMFit 3.0.

## **2.8 Adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico**

As linhagens de bactérias propiônicas foram adaptadas a concentrações crescentes de ácido propiônico por transferências sucessivas em meios contendo concentrações crescentes de ácido propiônico, no qual o inóculo de 10% da cultura primária foi transferido a erlenmeyers com 100 mL de caldo lactato, sendo que as concentrações de ácido propiônico foram: 0 %, 0,1 %, 0,15 % e 0,25 %. Em seguida, foram incubados a 30°C e foi monitorado o crescimento a partir da densidade óptica. As células que apresentaram bom crescimento foram repetidamente transferidas para caldo lactato com maiores concentrações de ácido propiônico, conforme metodologia descrita por Woskove Glatz (1991), modificado por Zhu et al.(2010). Os experimentos foram feitos em triplicata.

## **2.9 Estudo cinético da fermentação e produção de ácido propiônico**

Os meios de fermentação utilizados no estudo cinético foram preparados com soro desnatado e 1% (m/v) de extrato de levedura, composição essa

definida em testes preliminares e baseada em Hugenschmidt et al. (2010). O soro foi previamente filtrado, seu pH ajustado a 7 com 0,2N de NaOH, misturado com extrato de levedura e os meios foram autoclavados a 121°C por 15 min. As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyers e inoculado com 10% do inóculo, a uma concentração de  $10^7$  UFC/mL, perfazendo 330mL de meio e conduzidas a uma temperatura de 30°C por 168 h. Nos tempos regulares de 0, 24, 48, 96, 120, 144 e 168h, foram coletados 10 mL do meio fermentado em tubos de centrífuga e 1mL em tubo de ensaio, para cada uma das três repetições de cada tratamento. O volume de 10 mL foi centrifugado a 3000 rpm (1428 g) por 25 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de ensaio com rosca, e posteriormente congelado para análises de ácido propiônico, ácido acético, ácido lático, acidez total, açúcares redutores, e pH. Para as amostras em tubo de ensaio, foram realizadas diluições para contagem de microrganismos viáveis.

## 2.10 Microrganismos viáveis

No processo fermentativo, os microrganismos viáveis foram determinados utilizando o método de plaqueamento por profundidade. O plaqueamento foi efetuado em dois meios de cultura, Ágar lactato e Ágar MRS conforme o microrganismo *Propionibacterium freudenreichii* PS1 e *Lactobacillus helveticus*, respectivamente. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias e 37 °C, por 3 dias, para a contagem de *Propionibacterium freudenreichii* PS1 e *Lactobacillus helveticus*, respectivamente.

### **2.11 Determinações do pH, acidez titulável, sólidos totais, cinzas, gordura, proteínas e lactose**

Os valores de pH foram determinados pela leitura direta do sobrenadante em potenciômetro digital de bancada modelo Q400AS, calibrado previamente com solução-tampão de pH 4,0 e 7,0. Para a determinação de acidez titulável, do teor de sólidos totais e do teor de cinzas foram adotadas as metodologias de AOAC 920.24, AOAC 925.23, AOAC 935.42 respectivamente (AOAC, 1998). A determinação da porcentagem da gordura foi feito por método de Gerber descrito por Pereira et al. (2001). A determinação do teor de nitrogênio total foi feita pelo método micro-Kjeldahl AOAC 991.20, usando fator de conversão 6,35 para obtenção do teor de proteína total(AOAC, 1998). A quantificação de AR foi feita pelo método de Antrona (DISCHE, 1962).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do soro desnatado

Os resultados da análise físico-química do soro desnatado (SD) utilizado para formulação dos meios de fermentação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização físico-químico do soro desnatado

<i>Parâmetro</i>	<i>Valores de Soro Desnatado</i>
pH	6,35 ± 0,05
Acidez (g/L)	0,70 ± 0,57
Gordura (%m/v)	0,20 ± 0,0
Sólidos Totais (%m/v)	5,35±0,05
Cinzas (%m/m)	0,46±0,01
Lactose (%m/m)	2,74±0,12
Proteínas (%m/v)	1,11±0,11

Estes resultados mostram que o soro desnatado pode ser utilizado na formulação do meio de fermentação para o crescimento de bactérias propiônicas e produção de ácidos propiônico e acético. Possui valor de pH ótimo para crescimento das bactérias lácticas e açúcares suficientes para a fermentação. Outra vantagem apresentada nesse soro desnatado é o teor de gordura baixo. Entretanto, o valor relativamente elevado das proteínas pode não favorecer muito a fermentação e produção do ácido propiônico. Isto porque na fermentação, dependendo do microrganismo, o pH pode ser reduzido a valores próximos de 2 e o ponto isoelétrico das proteínas do soro é próximo de pH 5, então em meios com valores de pH abaixo de 5, provavelmente pode ocorrer a precipitação das proteínas do soro, não podendo favorecer assim a fermentação.

Os resultados da gordura, sólidos totais, cinzas, proteínas e lactose (Tabela 1) obtidos nesta pesquisa foram inferiores aos encontrados por Pelegrine e Carrasqueira(2008), que obteve basicamente em um soro resultante do processamento do queijo 92% de água, 8% de matéria seca, 4,8% de lactose, 0,7% de proteína bruta, 0,4% de gordura e 0,5% de cinzas e aos obtidos por Barbosa (2010), que reportou, aproximadamente,  $93\pm 0,05\%$  de água,  $4,25\pm 0,05\%$  de lactose,  $1,25\pm 0,06\%$  de proteínas solúveis,  $0,60\pm 0,01\%$  de sais minerais,  $0,33\pm 0,06\%$  de gorduras e  $6,43\pm 0,08\%$  de extrato seco total. Luz (2010), analisando o permeado de soro também obteve valores de 0,013% de proteínas, 0,9 g/L de acidez titulável, 4,09% de sólidos totais, 0,18% de cinzas, 3,43% de lactose e pH 6,17. O teor de lactose do soro desnatado utilizado neste trabalho foi um pouco inferior aos reportados nos trabalhos anteriores. Os níveis mínimos de lactose no leite de vaca (m/m) segundo o artigo 475 de 1962, regulamentado em 1963, do RIISPOA é de 4,3%, valor esse superior ao obtido nesse trabalho, mesmo considerando que, quase toda a lactose do leite passa para o soro.

### **3.2 Crescimento celular e determinação dos parâmetros de crescimento**

As Figuras 1 e 2 apresentamos dados experimentais das curvas de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato e de *Lactobacillus helveticus* em caldo MRS respectivamente, assim como as curvas geradas pelo modelo primário de Baranyi e Roberts (1994), aplicando o software DMFit.

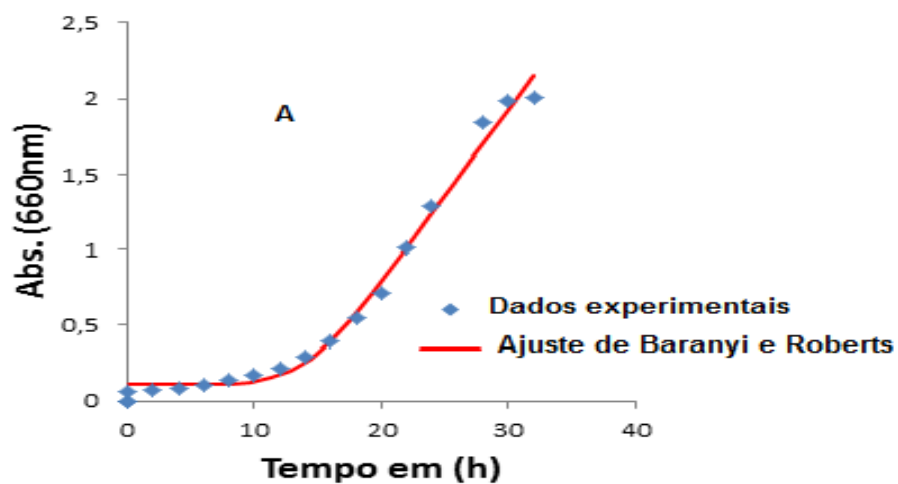


Figura 1 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato a 30 °C – dados experimentais e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994)

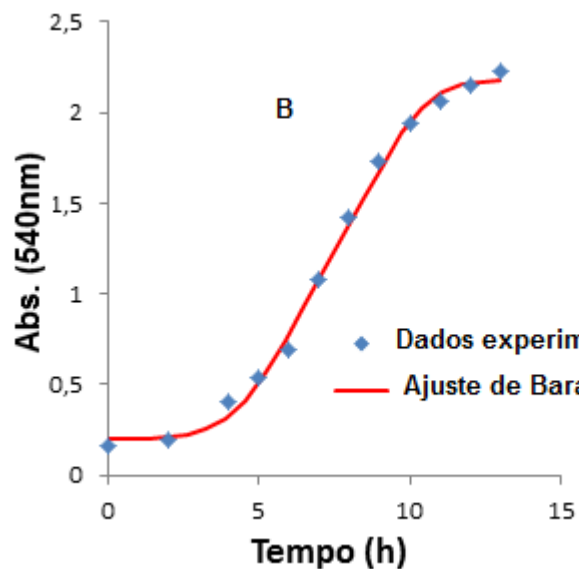


Figura 2 Curva de crescimento de *L. helveticusem* MRS a 37 °C - dados experimentais e ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts (1994)

Nestas figuras é possível visualizar os pontos experimentais e as curvas preditas pelos modelos primários de Baranyi e Roberts, onde nota-se que o tempo de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato a 30°C e *L. helveticus* em caldo MRS a 37°C foi muito diferente. A bactéria *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 cresce mais lentamente (tempo de crescimento de 32h) que *L. helveticus* (tempo de crescimento de 12h). Na Tabela 2 encontram-se os valores dos parâmetros primários de crescimento para as duas espécies de bactérias.

Tabela 2 Parâmetros de crescimento observados para *P. freudenreichii* em caldo lactato a 30 °C e *L. helveticus* em caldo MRS a 37°C obtidos pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994)

Cultura	Parametros						
	Tempo crescimento (h)	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	Lag(h)	$Y^0$	$Y^{\text{End}}$	$t_G(\text{h})$	$R^2$
<i>P. freudenreichii</i>	32,0	0,1137	14,0	0,1096	-	6,1	0,9901
<i>L. helveticus</i>	12,0	0,3153	4,2	0,1999	2,1819	2,2	0,9956

Nesta Tabela 2, pode-se notar diferença nos parâmetros de crescimento, sendo que as bactérias *P. freudenreichii* PS-1 apresentaram uma maior fase lag (14,0 h) e menor velocidade específica máxima de crescimento -  $\mu_{\max}(0,1137 \text{ h}^{-1})$  contra 4,2 h e  $0,3153 \text{ h}^{-1}$  de *L. helveticus*, respectivamente. Em relação ao tempo de geração, *P. freudenreichii* PS-1 teve maior tempo de geração (6,1 h) enquanto que *L. helveticus* tiveram menor tempo de geração (2,2 h), uma vez que as últimas apresentaram maior  $\mu_{\max}$ . A velocidade específica máxima de crescimento de *L. helveticus* foi 2,77 vezes maior que a da *P. freudenreichii* PS-1. Em relação ao tempo de incubação, foi de 32h para *P. freudenreichii* e de 12h para *L. helveticus*. Nota-se que os coeficientes de determinação  $R^2$  de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts foram elevados, iguais a 0,9901 e 0,9956 para *P.*

*freudenreichii* PS-1 e *L. helveticus* respectivamente, indicando bom ajuste dos dados experimentais ao modelo. Nas tabelas 3 e 4 são apresentadas as correlações entre absorvância e contagem de células de *P. freudenreichii* PS-1 e *L. helveticus*.

Tabela 3 Crescimento de *P. freudenreichii* PS-1 em função do tempo

<i>Tempo</i>	<i>Absorbância (660nm)</i>	<i>Contagem UFC/mL</i>
<b>6</b>	0,106	$3,50 \cdot 10^7$
<b>10</b>	0,179	$1,27 \cdot 10^8$
<b>18</b>	0,544	$1,10 \cdot 10^9$
<b>22</b>	1,018	$2,44 \cdot 10^9$

Tabela 4 Crescimento de *L. helveticus* em função do tempo

<i>Tempo</i>	<i>Absorbância (540nm)</i>	<i>Contagem UFC/mL</i>
<b>0</b>	0,161	$2,10 \cdot 10^5$
<b>2</b>	0,201	$7,40 \cdot 10^5$
<b>6</b>	0,698	$1,80 \cdot 10^7$
<b>8</b>	1,419	$6,80 \cdot 10^7$
<b>10</b>	1,938	$1,02 \cdot 10^8$
<b>12</b>	2,152	$1,49 \cdot 10^8$

Pela Tabela 3, foi observado que após 6h de cultivo a 30 °C a contagem de *P. freudenreichii* atingiu cerca de  $3,50 \cdot 10^7$  UFC/mL, valor esse que cresceu até  $2,44 \cdot 10^9$  UFC/mL após 22h de cultivo. Para *L. helveticus* foi constatado que após 6h de incubação a 37 °C a contagem atingiu  $1,80 \cdot 10^7$  UFC/mL, tendo aumentado para  $1,49 \cdot 10^8$  UFC/mL após 12h de incubação.

### 3.3 Adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes de ácido propiônico

Um dos principais problemas nas fermentações reside no baixo rendimento e produtividade devido a vários fatores entre ambientais e do próprio processo fermentativo. Assim, a adaptação das bactérias propiônicas a concentrações crescentes do ácido propiônico é mecanismo para minimizar alguns desses problemas. Nas figuras 3, 4 e 5, são apresentadas as curvas de crescimento para as linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, com concentrações crescentes de ácido propiônico.

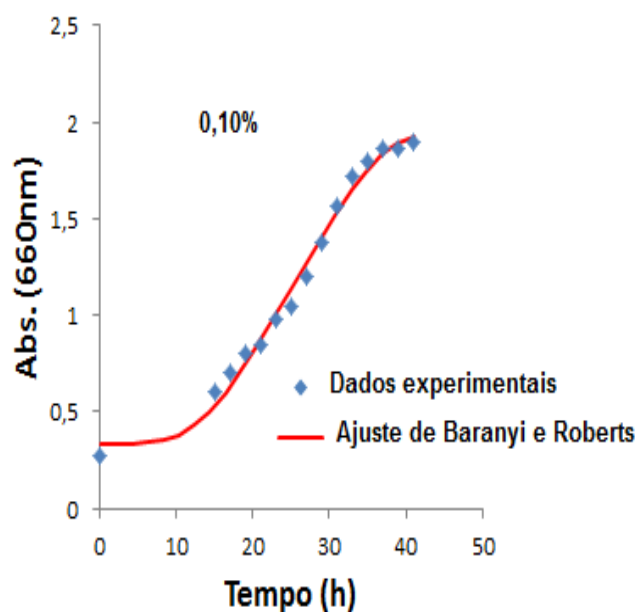


Figura 3 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato com 0,10% de ácido propiônico -dados experimentais e ajuste a modelo de Baranyi e Roberts

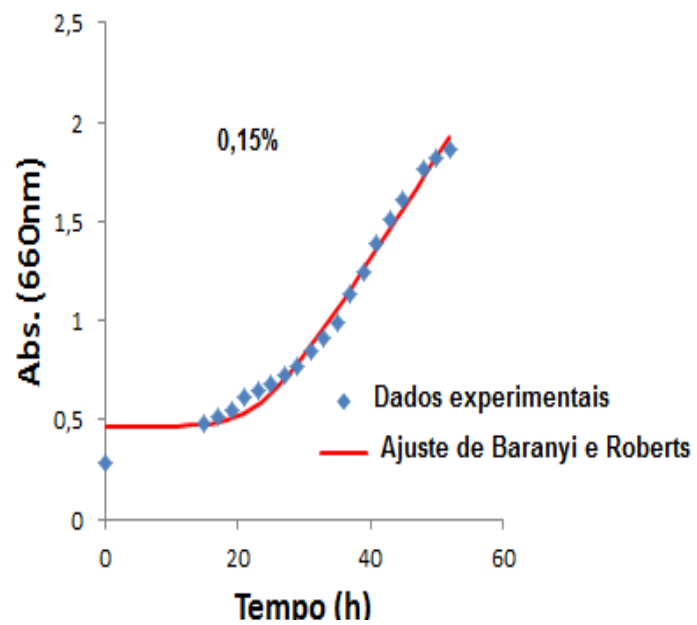


Figura 4 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato com 0,15% de ácido propiônico - dados experimentais e ajuste a modelo de Baranyi e Roberts

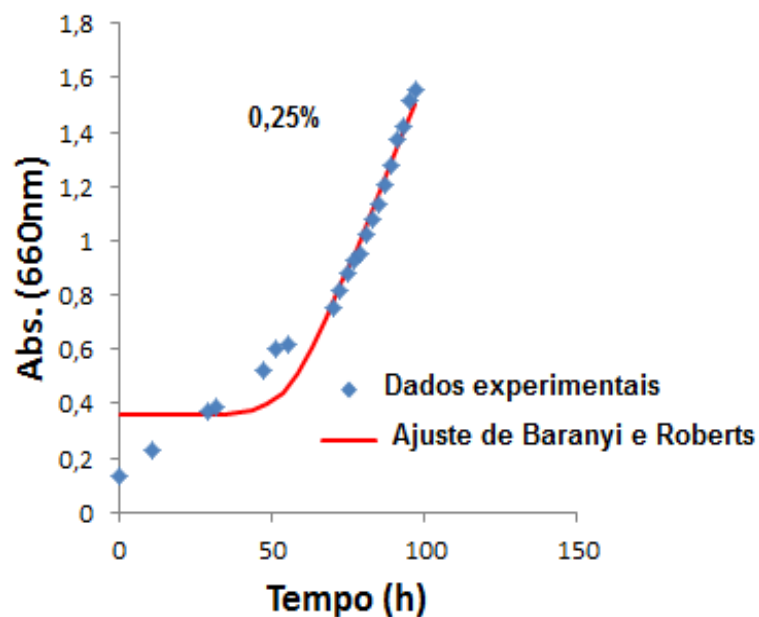


Figura 5 Curva de crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 em caldo lactato com 0,25% de ácido propiônico - dados experimentais e ajuste a modelo de Baranyi e Roberts(1994)

Nas figuras 3, 4 e 5 pode-se perceber comportamento bem diferente em relação à fase lag e tempo de crescimento de *P. freudenreichii* PS-1 em caldo lactato com diferentes concentrações de ácido propiônico a 30°C. Da Tabela 5 podem ser observados e comparados os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994), para todos os parâmetros representados.



Tabela 5 Parâmetros de crescimento observados para *P. freudenreichii* em caldo lactato com 0,10; 0,15 e 0,25% de ácido propiônico (AP) a 30°C, obtidos por modelos primários de Baranyi e Roberts (1994)

<i>Cultura</i>		<i>Parâmetros</i>					
<i>P. freudenreichii</i>	Tempo crescimento (h)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Lag (h)	Y <sup>0</sup>	Y <sup>End</sup>	t <sub>G</sub> (h)	R <sup>2</sup>
<b>0,10% AP</b>	40,0	0,0679	13,1	0,3294	1,9455	10,2	0,9867
<b>0,15% AP</b>	55,0	0,0507	23,3	0,4641	-	13,7	0,9830
<b>0,25% AP</b>	100,0	0,0277	55,5	0,3592	-	25,1	0,9489

A diferença observada graficamente é melhor comprovada pela análise dos parâmetros de crescimento, que se mostram bem diferentes para cada concentração de ácido propiônico. Pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994), notou-se que o crescimento celular das bactérias propiônicas, em meio com 0,25% de ácido propiônico apresentou uma fase lag muito maior (55,5h) e a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) muito menor (0,0277 h<sup>-1</sup>) que nos outros meios com menores concentrações do ácido propiônico. Uma maior fase lag e menor velocidade específica máxima de crescimento indicam maior inibição no crescimento, ou seja *P. freudenreichii* PS-1 levou mais tempo para se adaptar à concentração de 0,25% de ácido propiônico. Os parâmetros de crescimento estimados pelos modelos primários de Baranyi e Roberts (1994) na influência da concentração de ácido propiônico foram matematicamente avaliados através do cálculo de R<sup>2</sup>. Nota-se que os coeficientes de determinação foram elevados, 0,9867; 0,9830; 0,9486 nas concentrações de 0,10; 0,15 e 0,25% de ácido propiônico respectivamente, o que indica bom ajuste dos dados experimentais ao modelo de Baranyi e Roberts (1994).

Nas curvas de crescimento correspondentes às Figuras 3, 4 e 5, onde a linhagem de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 foi adaptada a concentrações crescentes do ácido propiônico de 0,10; 0,15 e 0,25%

respectivamente, verificou-se nitidamente aumento do tempo de geração (10,2; 13,7 e 25,1 h) derivado ao aumento da concentração do ácido propiônico. Com aumento da concentração do ácido propiônico de 0,10% (Figura 3), implicava também aumento do tempo de crescimento em 40h quando comparado ao meio sem ácido propiônico em que o tempo de crescimento foi avaliado em cerca de 32h (Figura 1). Para os meios contendo 0,15% e 0,25% m/v de ácido propiônico (Figuras 4 e 5), o tempo de crescimento aumentou para 55 e 100h respectivamente. Notou-se, ainda a partir das figuras 4 e 5 com concentração de ácido propiônico de 0,15 e 0,25% que essas não apresentaram assíntota superior ( $Y^{End}$ ). Entretanto, com a concentração de ácido propiônico de 0,10%, o valor de  $Y^{End}$  foi determinado em 1,9455. Segundo Marcoux et al. (1992), o crescimento mais lento verificado nos meios de fermentação pode ser parcialmente relacionado com a diminuição do pH. Esse resultado é concordante com este trabalho, pois observou-se ainda demora no crescimento que se pode notar também a partir da diminuição do valor das velocidades específicas máximas de crescimento celular de 0,1137 do meio controle (figura 1) para 0,0679; 0,0507; 0,0277 (Figura 3, 4 e 5 referentes à  $\mu_{max}$ ), respectivamente. O fato da diminuição da taxa de crescimento específica, com aumento das concentrações de propionato também foi reportado por Mart (2002). Entretanto Woskow e Glatz (1991) trabalhando com linhagem de *P. acidi propionicii* tolerante ao ácido propiônico P200910 observaram que havia taxa de crescimento mais rápida a 8% de teor de ácido propiônico do que seu gerador (0,047 e 0,033h<sup>-1</sup>), respectivamente. Champagne, Baillargeon-Côté e Goulet (1989) mencionaram que a concentração de lactato teve um efeito negativo considerável sobre o crescimento de *P. Shermanii*, com velocidades específicas máximas de crescimento celular de 0,08 h<sup>-1</sup> em caldo lactato. Portanto, a linhagem de bactéria propiônica sofre inibição por aumento da concentração do ácido propiônico. Já alguns trabalhos indicaram que o ácido propiônico tem efeito de inibição sobre

os microrganismos quando está na sua forma não dissociada (ANTWI et al., 2008; BERESFORD et al., 2001). *P. acidipropionicii* é capaz de crescer a velocidades específicas máximas de  $0,08 \text{ h}^{-1}$  quando a glicose e lactose são cometabolizados, diminuindo assim a inibição no crescimento celular (MART, 2002).

### **3.4 Estudo cinético da fermentação**

As amostras congeladas foram analisadas quanto à evolução do pH, acidez, consumo de lactose e produção de ácidos orgânicos.

#### **3.4.1 Evolução do pH e da acidez na fermentação**

Nesta investigação o meio de fermentação foi constituído basicamente por soro desnatado, suplementado com 1% de extrato de levedura. Os valores médios de pH e acidez são apresentados na Figura 6. Cada valor é a média de três medições efetuadas em amostras colhidas a partir de três fermentações.

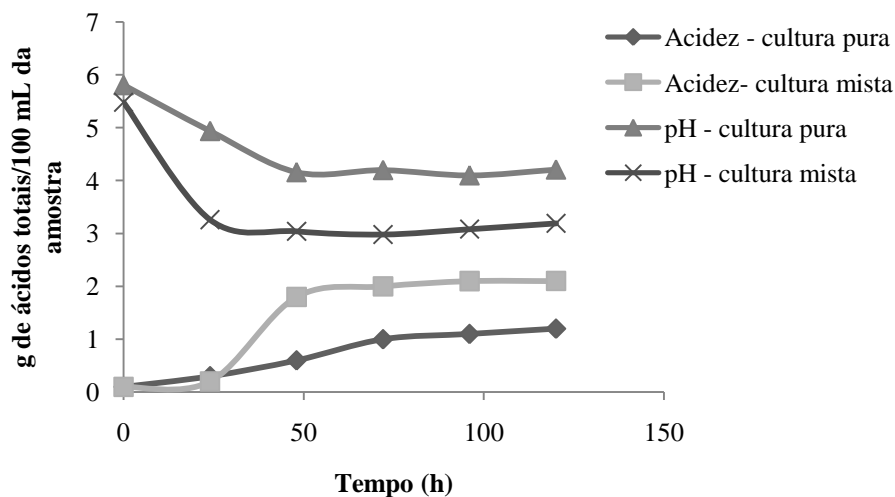


Figura 6 Evolução de Acidez e do pH dos meios de fermentação com soro desnatado, com inóculo da cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e mista com *Lactobacillus helveticus*

O valor inicial de pH do soro desnatado utilizado neste estudo foi de 6,35. A Figura 6 mostra que o valor de pH dos meios inoculados com cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e mista com *Lactobacillus helveticus* apresentou variação maior nas primeiras 48h, e após esse período, o valor de pH praticamente se estabilizou. Em termos gerais, o pH decresceu de 6,35 no soro para 3,76 e 2,80 nos soros inoculados com a cultura pura e mista, respectivamente, após 168h. Marcoux et al.(1992) verificaram que após 60h de fermentação do meio FACMP, que o crescimento ocorria pouco abaixo de pH 5,3.No presente trabalho, o abaixamento do pH foi mais acentuado nos meios de fermentação com cultura mista, indicando maior produção de ácidos do que nos meios de fermentação com cultura pura de bactérias propiônicas. Segundo Liu e Moon (1982), o maior crescimento de *Propionibacterium* observado com bactérias lácticas na fermentação mista em lactose ou glicose é conhecida há bastante tempo. Assim Marcoux et al.(1992) apontaram que essa estimulação do

crescimento não pode ser unicamente explicada pela disponibilidade da concentração do ácido láctico, mas sim que outros efeitos positivos podem estar presentes sobre o crescimento ou produção de ácidos.

Na avaliação de acidez em g/100mL, como pode ser visto na Figura 6, os meios contendo as culturas pura e mista tiveram o mesmo valor inicial de acidez de 0,0999, aumentando-se até 1,1998 e 2,0988, respectivamente, após 120h de incubação. Os valores de acidez estabilizaram-se após 72h de fermentação, tanto para inóculo puro como para o misto. Os valores mais altos obtidos com a cultura mista indicam que a produção de ácidos foi maior, concordando com os menores valores de pH verificados nessas condições.

### 3.4.2 Teor de lactose na fermentação

Na Figura7, apresentam-se os teores da lactose no meio fermentado.

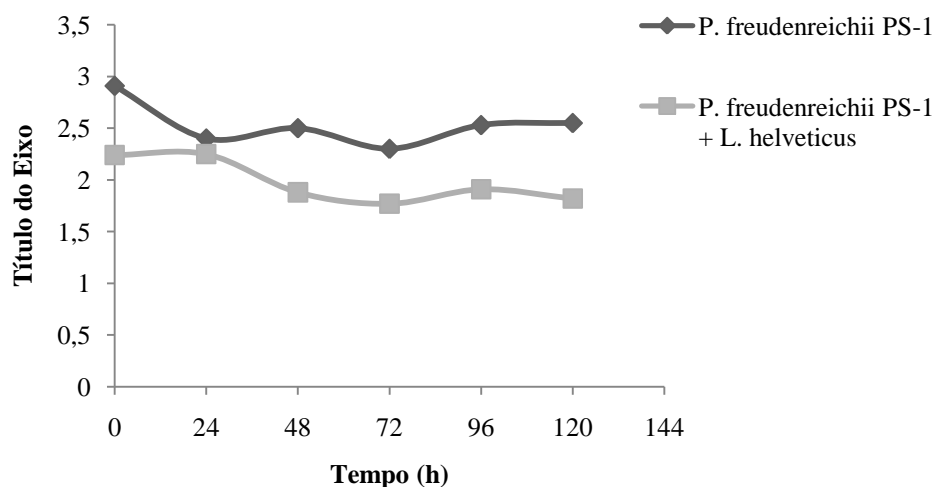


Figura 7 Lactose (g/100g) dos meios de fermentação com inóculo da *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e mista com *Lactobacillus helveticus*

A concentração de lactose em g/100g no meio foi inicialmente de 2,74. A Figura 7 mostra que, após a inoculação da cultura pura e mista, o teor de lactose era avaliado em 2,24 para cultura mista e 2,91 para cultura pura, esse valor abaixou para 1,77 e 2,30, respectivamente, após 72h. Após esse período, os teores de lactose praticamente se estabilizaram, tendo em vista os erros experimentais da metodologia.

### 3.4.3 Microrganismos viáveis

Os resultados das contagens das culturas estão apresentados na Tabela 6 e nota-se que houve pequeno acréscimo e pequena diminuição nas duas culturas respectivamente, comparando-se o tempo inicial com o final. Apesar de serem pequenas as alterações, podem indicar que o aumento de acidez e, conseqüentemente, a diminuição do pH na cultura mista mostrada pela Figura 6, contribuiu desfavoravelmente na viabilidade celular de *P. freudenreichii* e *L. helveticus*. Em alguns estudos desenvolvidos por Antwi et al. (2008) e Beresford et al. (2001) foi demonstrado que os ácidos apresentam maior efeito inibitório na viabilidade de células, em suas formas não dissociadas.

Tabela 6 Contagem de células (UFC/mL) para as culturas puras de *P. freudenreichii* e mista de *P. freudenreichii* e *L. helveticus*

<i>Cultura</i>	<i>Tempo inicial (0h)</i>	<i>Tempo final (168h)</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	1,0*10 <sup>7</sup> UFC/mL	2,4*10 <sup>7</sup> UFC/mL
<i>P. freudenreichii</i> + <i>L. helveticus</i>	8,1*10 <sup>7</sup> UFC/mL	2,8*10 <sup>7</sup> UFC/mL

## 4 CONCLUSÃO

A adaptação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 máxima conseguida neste trabalho foi de 0,25% do ácido propiônico. Mesmo a relativamente baixas concentrações de ácido propiônico, o crescimento das bactérias propiônicas foi fortemente inibido.

A fermentação com cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* apresentou maior acidez final, 2,0988g/100mL, o dobro da obtida usando-se cultura pura (1,1998g/100mL).

## REFERÊNCIAS

ANTWI, M. et al. Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel system: effect of monopotassium phosphate. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 320-329, July 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16<sup>th</sup> ed. Richmond, 1998. 1141 p.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Review paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 3/4, p. 277-294, Nov. 1994.

BARBOSA, S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol aguardiente: estudio de la producción de etanol use of serum as a substrate for production of marc: kinetic study of the production of ethanol. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 1, p. 7-25, jan./mar. 2010.

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

CHAMPAGNE, C. P.; BAILLARGEON-CÔTÉ, C.; GOULET, J. Whey fermentation by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 175-184, Mar. 1989.

CHEN, F. et al. Propionic acid production in a plant fibrous-bed bioreactor with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 202-210, Feb. 2012.

CORAL, J. et al. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 151, n. 2/3, p. 333-341, 2008.



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

FENG, X. H. et al. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for propionic acid production with *Propionibacterium Freudenreichii* CCTCC M207015. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 2, p. 343-349, 2010a.

\_\_\_\_\_. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 33, n. 9, p. 1077-1085, 2010b.

HUGENSCHMIDT, S. et al. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 12, p. 852-857, Dec. 2010.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **ISO 7218:** microbiology of food and animal feeding stuff e general requirements of guidance for microbiological examination. Geneva, 2007. 66 p.

LIU, J. P.; MOON, N. J. Commensalistic interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium shermanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, p. 715-722, 1982.

LIU, Y. et al. Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici*. **Current Microbiology**, New York, v. 62, n. 1, p. 152-158, Jan. 2011.

LUZ, M. P. **Produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por *Propionibacterium Freudenreichii* PS-1**. 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MARCOUX, V. et al. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 74, n. 2, p. 95-99, Apr. 1992.

MART, R. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, n. 6, p. 427-431, Mar. 2002.

PELEGRINE, D.H.G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21, p. 145-151, dez. 2008. Edição especial.

PEREIRA, D. B. C. et al. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. 234 p.

SRIVASTAVA, V. G. A. K. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 676-680, June 2001.

TEIXEIRA, M. I. **Microencapsulação de aroma de queijo proveniente da fermentação do permeado de soro por *Propionibacterium freudenreichii* aprisionada em alginato de cálcio**. 2004. 117 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

WOSKOW, S. A.; GLATZ, B. A. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 10, p. 2821-2828, Oct. 1991.

ZHU, L. et al. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 112, p. 248-253, 2012.

ZHU, Y. et al. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 22, p. 8902-8906, 2010.

**CAPÍTULO 3 Efeito da concentração do inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* e do tempo de inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, sobre produção de ácido propiônico**

**RESUMO**

A legislação ambiental é cada vez mais rígida quanto ao destino do soro e outros produtos agroindustriais, por isso as indústrias de laticínios procuram alternativas para aproveitamento do soro de queijo. A produção de ácido propiônico a partir do soro pode reduzir a poluição ambiental e o custo dos laticínios no tratamento de efluentes. Além disso, é uma estratégia para o desenvolvimento industrial de novos produtos através de processos fermentativos. Objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos da concentração do inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* e do tempo de inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 ao processo fermentativo sobre produtividade de ácido propiônico. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL do meio enriquecido com 1% de extrato de levedura. Foi realizado planejamento com 11 ensaios variando as concentrações do inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* em  $10^7$  a  $10^{10}$  UFC/mL e tempo de inoculação após 2,6 a 9,4h do início da fermentação por *Lactobacillus helveticus*. Os resultados da produção máxima atingida de ácido propiônico foram de 3,78 g/L do ensaio 2 com concentração do inóculo de PS-1 de  $5,0 \cdot 10^9$  UFC/mL e tempo de inoculação de 4h. Para o ácido acético a produção máxima foi de 3,10 g/L do ensaio 9 com concentração do inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 de  $10^9$  UFC/mL em tempo de inoculação de 6h. Então este estudo considera que o soro desnatado pode ser usado como matéria-prima renovável de baixo custo para a produção de ácido propiônico por uma cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* onde este último inóculo foi fixado em  $10^7$  UFC/mL para este experimento.

Palavras-chave: Concentração do inóculo. *Propionibacterium freudenreichii* PS1. *Lactobacillus helveticus*. Ácido Propiônico.

**CHAPTER 3 Effect of the *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 and *Lactobacillus helveticus* inoculum concentration and the time of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 inoculation over the production of propionic acid**

**ABSTRACT**

The environmental legislation is becoming more rigid in regard to the destination of the whey and other agro-industrial products, therefore, dairy product industries seek for an alternative use for cheese whey. The production of propionic acid from whey may reduce environmental pollution and dairy cost in treating the effluents. In addition, it is a strategy of the industrial development of new products through fermentative processes. The objective of this study was to evaluate the effects of the concentration of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 and *Lactobacillus helveticus* inoculum and the time of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 inoculation to the fermentation process over the productivity of propionic acid. The fermentations were conducted in 500 mL erlenmeyers containing 300 mL of medium enriched with 1% of yeast extract. The planning was done with 11 trials varying the *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 inoculum concentration from  $10^7$  to  $10^{10}$  CFU/mL and inoculation time after 2.6 to 9.4 h from the beginning of the fermentation by *Lactobacillus helveticus*. The results of the maximum propionic acid production reached was of 3.78 g/L in trial 2, with PS-1 inoculum concentration of  $5.0 \times 10^9$  CFU/mL and inoculation time of 4 h. For the acetic acid, the maximum production was of 3.10 g/L in trial 9, with *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 inoculum concentration of  $10^9$  CFU/mL in the inoculation time of 6h. Thus, this study considers that the skimmed whey may be used as low cost renewable raw material for the production of propionic acid by a *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 and *Lactobacillus helveticus* mixed culture, in which this last inoculum was fixated in  $10^7$  CFU/mL for this experiment.

**Keywords:** Inoculum concentration. *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. *Lactobacillus helveticus*. Propionic acid.

## 1 INTRODUÇÃO

O soro lácteo é o principal subproduto da indústria de laticínios que vem despertando o interesse de inúmeros pesquisadores em todo o mundo em virtude de sua potencialidade nutricional e funcional.

O soro é constituído, basicamente, de 92% de água, 8% de matéria seca, 4,8% de lactose, 0,7% de proteína bruta, 0,4% de gordura e 0,5% de cinzas (PELEGRINE; CARRASQUEIRA, 2008). Para o aproveitamento desses nutrientes, vários estudos têm sido realizados para desenvolvimento de novos produtos, visto que, o problema enfrentado pelo setor de laticínios em todo mundo é dar destino ao soro proveniente da fabricação dos queijos, pois somente parte do soro produzido é utilizada, sendo o restante descartado como efluente, por causa do alto custo e da dificuldade em processá-lo (BALDASSO, 2008; QUEIROZ; MATA; EMERENCIANO, 2012; RAMOS, 2010), embora esse contenha alto valor nutricional (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

A legislação ambiental é cada vez mais rígida quanto ao destino do soro e outros produtos agroindustriais, portanto as indústrias de laticínios procuram alternativas para aproveitamento do soro de queijo. A produção de ácido propiônico a partir do soro é alternativa para o aproveitamento do último, reduzindo a poluição ambiental e o custo no tratamento de efluentes para laticínios.

O soro pode ser usado como fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano na fermentação onde é convertido em produtos químicos, combustíveis entre outros, sendo sua fermentação interessante para obtenção de ácido propiônico por bactérias propiônicas.

O ácido propiônico é um ácido orgânico de cadeia curta (BARBOSA, 2011), amplamente utilizado como aditivo na alimentação animal, na fabricação de plásticos à base de celulose, herbicidas e perfumes (ZHU et al., 2012). Sais de

ácido propiônico são utilizados como conservantes (CORAL et al., 2008) em alimentos, onde inibem o crescimento de mofo, retardam a germinação de microrganismos e evitam o amarelecimento e a viscosidade de massas de pães (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2007; YANG; SILVA, 1995).

Atualmente, quase todo o ácido propiônico é produzido por síntese química de matérias-primas derivadas do petróleo (BORGES, 2010; CORAL et al., 2008; HUANG et al., 2011; ZHU et al., 2012). No entanto, há grande esforço para minimizar a parcela de recursos não renováveis (combustíveis fósseis, por exemplo) e maximizar o uso de matérias-primas renováveis (KÁDÁR et al., 2011). Assim sendo, a indústria estuda métodos alternativos para a produção de ácido propiônico usando processos fermentativos, devido à limitação de recursos não renováveis como matéria-prima e, por outro lado, pela necessidade de preservar o ambiente (BORGES, 2010; CORAL et al., 2008; YANG; SILVA, 1995). Entretanto, a produção do ácido propiônico por fermentação ainda apresenta baixo rendimento e produtividade por causa da inibição do crescimento celular e da síntese de ácido propiônico por altas concentrações do mesmo.

Pesquisas têm sido efetuadas para controlar a produção de inibidores e para maximizar a produtividade da fermentação. Em vista disso, cepas tolerantes ao ácido propiônico, reatores com células imobilizadas e reatores com reciclagem são desenvolvidos para aumentar o rendimento e a produtividade da fermentação (HUANG et al., 2002).

Objetivou-se, nesta pesquisa, verificar a influência da concentração do inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 no tempo de inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, para maximizar a produção do ácido propiônico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas nos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos, Laticínios, Bioquímica de Alimentos, Microbiologia de Alimentos e no Laboratório de Análises Avançadas e Bioquímicas do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA.

### 2.1 Obtenção e preparação do soro

O soro desnatado foi coletado no laticínio Verde Campo em Lavras-MG e transportado imediatamente em bombonas de 20L para o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, onde foi mantido congelado a -18 °C até o momento de análise em garrafas PET de 2L segundo as recomendações da ISO 7218 (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION - ISO, 2007).

O soro foi filtrado a vácuo, com papel- filtro faixa azul de diâmetro 12,5cm e porosidade 8µm para a homogeneização da matéria-prima e retirada de sólidos em suspensão. O pH do filtrado foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,2 N antes da autoclavagem. Para a caracterização físico-química do soro, alíquotas foram retiradas para análises de acidez titulável e pH (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1998), além de lactose (método de Antrona) (DISCHE, 1962), onde foram realizadas análises em triplicata.

### 2.2 Microrganismo

Os microrganismos *Propionibacterium freudenreichii* PS1 e *Lactobacillus helveticus* foram doados pela empresa Christian Hansen Indústria.



### 2.3 Ativação dos microrganismos e manutenção das culturas

A cultura liofilizada de *Propionibacterium freudenreichii* PS1 (Chr-Hansen) foi ativada em caldo lactato em (m/v): 1% de extrato de levedura, 1% de peptona de carne, 0,025% de  $K_2HPO_4$  e 1% de lactato de sódio, segundo metodologia de Marcoux et al. (1992), e incubado a 30°C por 48h. Após a incubação, alíquotas de 1mL da cultura foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada realizando-se diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em ágar lactato e incubadas a 30°C por 5 dias. Colônias isoladas foram transferidas para ágar lactato após a confirmação de pureza pelo teste de catalase, morfologia e coloração de Gram. A cultura estoque purificada foi preparada em caldo lactato, adicionando 15% de glicerol, previamente ajustado a pH 7 e autoclavados a 121°C, durante 15 minutos, congelado a -18 °C conforme metodologia adaptada de Woskow e Glatz (1991).

A cultura liofilizada de *Lactobacillus helveticus* foi ativada em meio MRS, contendo 10 g de peptona, 8 g de extrato de carne, 4g de extrato de levedura, 20 g de glucose, 2 g de  $K_2HPO_4$ , 5 g de acetato de sódio, 2g de citrato de amônio, 0,2 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,05g de sulfato de manganês tetraidratado esterilizado a 121°C por 15 minutos. As bactérias foram ativadas a 37 °C por 24h em tubo de ensaio, contendo 10 mL do caldo MRS. O estoque da cultura foi feito com 12% de leite desnatado e 15% de glicerol previamente autoclavados, congelado a -18 °C, conforme metodologia adaptada de Woskow e Glatz (1991).

## 2.4 Padronização e preparo do inóculo para fermentação

Para padronização dos inóculos, o crescimento de *Propionibacterium freudenreichii* e *Lactobacillus helveticus* foi acompanhado com medições da absorbância e de contagem de células por plaqueamento, a longo de intervalos de tempo. Para isso, 10 mL da cultura ativada de *Propionibacterium freudenreichii* foi transferido para 100mL do caldo lactato e em horas regulares foram tomadas as médias da absorbância a 660nm, em espectrofotômetro. A cada leitura foram feitas diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e 1mL foram transferidos para placas, adicionado em seguida Agar lactato através da técnica de plaqueamento em profundidade. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias e em sequência as colônias foram quantificadas. Para *Lactobacillus helveticus* foi usado caldo MRS e a leitura foi feita a 540nm, no mesmo espectrofotômetro e o plaqueamento foi feito em Agar MRS e as placas foram incubadas a 37°C por 3 dias e em sequência as colônias também foram quantificadas.

Na preparação do inóculo para fermentação, alíquotas de 10% v/v da cultura ativada de *Propionibacterium freudenreichii* foram transferidas para frascos contendo 100 mL do caldo lactato estéril e incubada a 30°C, por 24h. Alíquotas de 10% v/v da cultura ativada de *Lactobacillus helveticus* foram transferidas para frasco contendo 100 mL do meio MRS incubada a 37 °C por 24h. Após esse período, as culturas foram utilizadas. É preciso ressaltar que a concentração de células do inóculo das duas culturas era determinada a partir da densidade ótica dos mesmos, medindo-se o valor de absorbância num espectrofotômetro digital, nos comprimentos de onda de 660 e 540 nm para *Propionibacterium freudenreichii* PS1 e *Lactobacillus helveticus*, respectivamente. As contagens do inóculo eram de 10<sup>7</sup> UFC/mL para *L.*

*helveticus* e de acordo com planejamento experimental para *P. freudenreichii* PS-1.

## 2.5 Fermentação do soro desnatado

As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo inicialmente 300 mL do soro desnatado suplementado com 1% de extrato de levedura. O pH do meio foi previamente ajustado a pH 7 com NaOH 0,2N e autoclavado a 121°C a uma pressão de 1 Kgf/cm<sup>2</sup> por 15min. A seguir alíquota (10% v/v) das duas culturas preparadas como citado no item 2.5 foram transferidas para os frascos contendo o soro, segundo planejamento experimental e incubados a 30 °C durante 168 h, sem agitação.

## 2.6 Planejamento experimental

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis concentrações de inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1( $x_1$ ) e tempo de inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1( $x_2$ ), fixando a concentração do inóculo de *L. helveticus* em 10<sup>7</sup> UFC/mL. Os ensaios foram realizados conforme o fatorial completo 2<sup>2</sup>, com 4 pontos fatoriais (níveis ±1), com triplicata no ponto central (nível 0) e 4 pontos axiais (±1,41) totalizando 11 ensaios. As variáveis respostas foram os teores de ácidos orgânicos (acético, propiônico e láctico) e o fator de variação de concentração celular de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*. Por fim, foi feita análise estatística, onde foram avaliados os efeitos das variáveis independentes, utilizando-se pacote estatístico Statistica v.8.0. O planejamento

experimental com as variáveis codificadas e reais é mostrado na Tabela 1, conforme metodologia preconizada por Rodrigues e Lemma (2009).

Tabela 1 Matriz do Planejamento fatorial completo  $2^2$  com os valores codificados e reais para concentração de inóculo de *P. freudenreichii* PS-1 em %v/v e o tempo de inoculação de *P. freudenreichii* PS-1

<i>Ensaio</i>	<i>X1</i> (Log UFC/mL)	<i>X2</i> (Tempo inoculaçãoPB -h)
<b>1</b>	-1(7,3)	-1(4,0)
<b>2</b>	+1(8,7)	-1(4,0)
<b>3</b>	-1(7,3)	+1(8,0)
<b>4</b>	+1(8,7)	+1(8,0)
<b>5</b>	-1,41(7,0)	0(6,0)
<b>6</b>	+1,41(9,0)	0(6,0)
<b>7</b>	0(8,0)	-1,41(2,6)
<b>8</b>	0(8,0)	+1,41(9,4)
<b>9</b>	0(8,0)	0(6,0)
<b>10</b>	0(8,0)	0(6,0)
<b>11</b>	0(8,0)	0(6,0)

As variáveis dependentes usadas foram a produção do ácido propiônico e acético, representado por PAP, PAAC, além do consumo de lactose e produção de ácidos totais.

## 2.7 Estudo cinético

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL do soro e 1% de extrato de levedura, conduzidas a 30 °C, por 168h. Alíquotas de 10 mL e 1 mL de meio fermentado foram retiradas após 0, 24, 48, 96, 120, 144 e 168 horas. O volume de 10 mL foi centrifugado a 3000 rpm (1428 g), por 25 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de ensaio com rosca e posteriormente congelados para análises de ácido propiônico, ácido acético, ácido lático, acidez total, lactose e pH. Essas análises foram feitas em todos os tempos da coleta das amostras. As células viáveis foram quantificadas empregando-se as amostras de 1 mL.

## 2.8 Microrganismos viáveis

No processo fermentativo, as bactérias foram determinadas utilizando o método de plaqueamento por profundidade em meios Ágar lactato e Ágar MRS para *Propionibacterium freudenreichii* PS1 e *Lactobacillus helveticus*, respectivamente.

O fator de variação de concentração celular foi determinado usando-se a equação 1.

$$F_c = (\text{UFC/mL final})/(\text{UFC/mL inicial}) \quad (1)$$

$F_c$  - fator de variação de concentração celular de microrganismos;

UFC/mL – número de células viáveis por mL.

## 2.9 Determinação de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram identificados e quantificados por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), em cromatógrafo (Shimadzu), com detector condutividade (CDD-6A), polaridade +, utilizando uma pré-coluna SHIM-PACK SPR-H(G) (50 mm x 7.8 mm) e duas colunas em série SHIM-PACK SPR-H (250 mm x 7.8 mm). A fase móvel foi uma mistura de 16 mM MBis-Tris, 4 mM ácido p-tolueno sulfônico e 100 µM EDTA; com fluxo: de 0,8 mL/min. O volume injetado da amostra foi de 20 µL e a temperatura de injeção 45°C. As amostras foram centrifugadas e filtradas (filtros de seringa de 0,22 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro) e diluídas com água desionizada antes da injeção no cromatógrafo. Os picos correspondentes a cada ácido foram identificados pelo tempo de retenção, utilizando-se como comparação os tempos de retenção dos padrões, para cada ácido.

Para a quantificação dos ácidos foram traçadas curvas analíticas, a partir da área dos picos em função da concentração do padrão (mg/mL).

Os parâmetros da produção (P) em g/L e consumo de lactose (CL) em g/100g foram determinados pelas equações 2; 3 e 4.

$$PAP = [AP]_{\text{final}} - [AP]_{\text{inicial}} \quad (2)$$

$$PAAC = [AC]_{\text{final}} - [AC]_{\text{inicial}} \quad (3)$$

$$CL = \frac{Lactose_{\text{inicial}} - Lactose_{\text{fim}}}{Lactose_{\text{inicial}}} * 100\% \quad (4)$$

Em que:

[AP]- concentração do ácido propiônico em g/L; PAP – produção do ácido propiônico em g/L; [AC] – concentração do ácido acético g/L; PAC- produção do ácido acético g/L; [CL] – consumo de lactose em %.

## 2.10 Determinações de pH, acidez titulável, sólidos totais, cinzas, gordura, proteínas e lactose

Os valores de pH foram determinados pela leitura direta do sobrenadante em potenciômetro digital de banca modelo Q400AS calibrado previamente com solução-tampão de pH 4,0 e 7,0. Para a determinação de acidez titulável, do teor de sólidos totais e do teor de cinzas foram usadas às fórmulas 5, 6 e 7, de acordo com as metodologias de AOAC 920.24, AOAC 925.23, AOAC 935.42, respectivamente (AOAC, 1998).

$$A = \frac{C_i * v * 9}{g \text{ ou mL}} \quad (5)$$

$$\% \text{EST} = \frac{M_f - T}{M_i - T} * 100 \quad (6)$$

$$\% \text{RMF} = \frac{M_f}{M_i} * 100 \quad (7)$$

Sendo:

A - acidez expressa em percentual de ácido láctico (m/v ou m/m, conforme se utilize volume ou massa de amostra), ou por outras g ácido láctico/100 mL ou g da amostra;  $c_i$  - concentração da solução de hidróxido de sódio (mol/L); v- volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra; g ou mL- massa ou volume da amostra; %EST- teor de extrato seco total, em % (m/m);  $M_f$ - massa final;  $M_i$ - massa inicial; T- tara do recipiente e %RMF- resíduo mineral fixo (cinzas), em % (m/m).

O teor de gordura das amostras foi determinado de acordo com o método de Gerber, descrito por Pereira et al.(2001) que preconiza separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico e a leitura é feita na escala graduada do butirômetro, após

centrifugação e imersão em banho-maria. A determinação do teor de nitrogênio total foi feita pelo método micro-Kjeldahl, usando as equações 8 e 9, que segue a metodologia de AOAC 991.20 com fator de conversão de 6,35 para obtenção do teor de proteína total (AOAC, 1998). Na quantificação da lactose foi adotada a metodologia da Antrona (DISCHE, 1962) e usadas as equações 10 e 11.

$$\%NT = \frac{(A-B) * C_i * f_c * 1,4}{mL} \quad (8)$$

$$\%PB = \%NT * 6,35 \quad (9)$$

$$Km = \frac{C}{Abs.} \quad (10)$$

$$\%AT = Abs * f_d \quad (11)$$

Onde:

%NT – teor percentual de nitrogênio total (m/v); A – volume da solução de HCl gasto na titulação da amostra; B – volume de HCl gasto na titulação da prova em branco;  $C_i$  – concentração (mol/L) da solução de HCl;  $F_c$  – fator de correção da solução de HCl; mL – volume da amostra, considerando-se a diluição efetuada ( $5/100 * 5 = 0,25\text{mL}$ ); %PB – teor percentual de proteína bruta (m/v); Km – inclinação da curva padrão de glicose em relação absorvância; C – concentração de glicose; Abs. – absorvância; %AT – açúcares totais em %; e  $f_d$  – fator de diluição.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do soro desnatado

Os resultados da caracterização do soro desnatado são apresentados na Tabela 2. Esses resultados afirmam que o soro desnatado pode ser substrato propício para a fermentação propiônica, pois possui lactose, além de outros nutrientes.

Tabela 2 Caracterização físico-química do soro desnatado.

<b>Parâmetro</b>	<b>Soro Desnatado</b>	<b>Permeado de soro LUZ (2009)</b>
<b>pH</b>	6,35 ± 0,05	6,69 ± 0,09
<b>Acidez (g/L)</b>	0,70 ± 0,57	0,90 ± 0,05
<b>Gordura (%m/v)</b>	0,20 ± 0,0	0,00 ± 0,00
<b>Sólidos Totais (%m/v)</b>	5,35±0,05	4,09
<b>Cinzas (%m/m)</b>	0,46±0,01	0,182
<b>Lactose (%m/m)</b>	2,74±0,12	2,16 ± 0,00
<b>Proteínas (%m/v)</b>	1,11±0,11	0,013

Nota: Os dados apresentados representam as médias de triplicatas.

Comparando-se os resultados experimentais deste trabalho com os obtidos por Luz (2009), pode-se verificar que os valores encontrados nesse estudo estão próximos daqueles obtidos pelo autor. Considerando-se a variabilidade natural na composição de soros de diferentes procedências e que Luz (2009) analisou permeado de soro, que é obtido pela ultrafiltração do soro lácteo. Portanto, era de se esperar os baixos teores de gordura e de proteínas no permeado de soro.

Os resultados experimentais da gordura, sólidos totais, cinzas, proteínas e lactose (Tabela2) obtidos nesse trabalho foram inferiores aos encontrados por Pelegrine eCarrasqueira(2008), que obtiveram, basicamente em soro resultante do processamento do queijo 92% de água, 8% de matéria seca, 4,8% de lactose, 0,7% de proteína bruta, 0,4% de gordura e 0,5% de cinzas e aos obtidos por Barbosa (2010), que reportou aproximadamente  $93\pm 0,05\%$  de água,  $4,25\pm 0,05\%$  de lactose,  $1,25\pm 0,06\%$  de proteínas solúveis,  $0,60\pm 0,01\%$  de sais minerais,  $0,33\pm 0,06\%$  de gorduras e  $6,43\pm 0,08\%$  de extrato seco total.

### **3.2 Estudo cinético**

As amostras congeladas foram analisadas quanto à evolução do pH, acidez, consumo de lactose e produção de ácidos orgânicos.

#### **3.2.1 Evolução do pH e acidez durante a fermentação propiônica**

A variação do pH em 168 h de fermentação, em todos os ensaios do planejamento, é apresentada na Figura 1. O valor médio de pH no início da fermentação foi de  $6,00\pm 0,21$ , que caiu para valores entre 3 e 4 para todos os tratamentos.

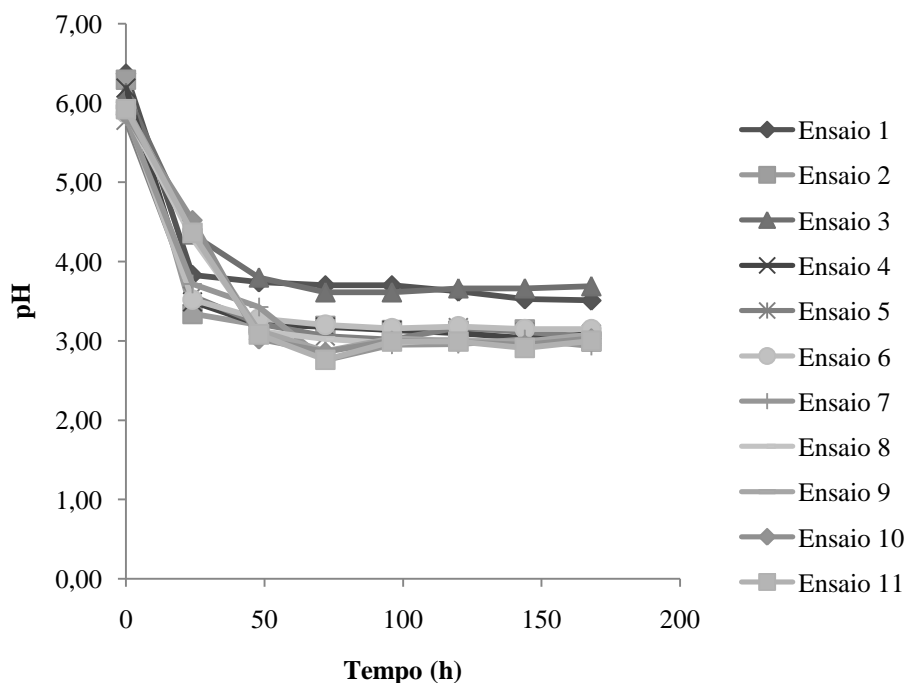


Figura 1 Variação de pH do meio ao longo da fermentação por cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*

Os ensaios 1 e 3, onde *Propionibacterium freudenreichii* PS1 foi inoculado após 4 e 8h do início da fermentação, apresentaram maiores valores de pH no fim da fermentação de 3,51 e 3,69, respectivamente. Nos outros ensaios do planejamento (tabela 1b), os valores finais de pH situaram-se entre 2,93 e 3,15. Durante 24h de fermentação, os valores de pH diminuíram significativamente para todos os ensaios. Na avaliação de acidez, conforme consta na Figura 2, nota-se após a inoculação das culturas aumento expressivo nas primeiras 72h da fermentação. Depois desse período, a acidez permanece aproximadamente constante.

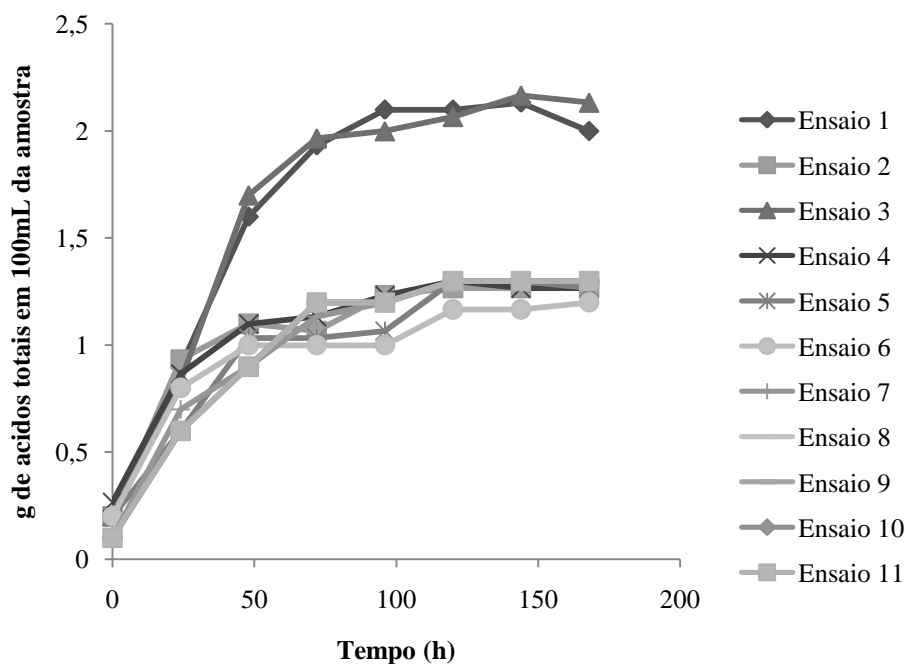


Figura 2 Variação de acidez ao longo da fermentação por cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*

Observa-se que a acidez total nos ensaios 1 e 3 foi bem superior aos dos demais ensaios. Luz (2009), avaliando o efeito da concentração do inóculo de cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 na fermentação de permeado de soro, obteve aumento de acidez total de 0,12 a 0,90 g de ácidos totais/100 mL da amostra, enquanto que o pH diminuiu de 6,13 para 4,4, usando 10% do inóculo, em 120h de fermentação. No presente trabalho foram notados resultados similares, com a acidez variando de 0,1 a 1,2 para todos os tratamentos, com exceção de 1 e 3, onde a acidez final atingiu 2,0 g/L. Neste trabalho, a diminuição do pH foi maior do que a reportada por Luz (2009), decaindo de um valor médio de 6,00 para valores entre 3 e 4. Essa diferença entre os resultados publicados por Luz (2009) e os do presente trabalho pode

estar relacionada com uso de substratos diferentes e uso de culturas também diferentes (cultura mista).

Na Tabela 3, estão mostradas as variações (amplitude) de acidez durante a fermentação.

Tabela 3 Produção de ácidos após 168h de fermentação

Ensaio	X1	X2	Produção de ác. Totais
	(Log UFC/mL)	(Tempo de adição PB -h)	(g/100 mL)
1	7,3	4,0	2,4642
2	8,7	4,0	1,0656
3	7,3	8,0	2,4309
4	8,7	8,0	0,999
5	7,0	6,0	1,0656
6	9,0	6,0	0,999
7	8,0	2,6	1,1988
8	8,0	9,4	1,1988
9	8,0	6,0	1,1988
10	8,0	6,0	1,1988
11	8,0	6,0	1,1988

X<sub>1</sub> –(Log UFC/mL) concentração de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 e X<sub>2</sub> – tempo de inoculação *Propionibacterium freundenreichii* PS-1

De acordo com a Tabela 3, a maior produção de ácidos ocorreu nos ensaios 1 e 3, com concentração do inóculo de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL adicionado a 4 e 8h, respectivamente. A menor produção nesse planejamento foi para os ensaios 4 e 6, com maiores concentrações do inóculo de  $5,0 \times 10^9$  e  $10^{10}$  UFC/mL, ocorrido a tempos de adição de 8 e 6h, respectivamente. Os ensaios restantes do planejamento tiveram suas produções médias em ácidos com muito pouca variação de 1,0656 a 1,1988 g de ácido láctico/100 mL do meio.

### 3.2.2 Consumo de lactose após 168h de fermentação por *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*

A Tabela 4 apresenta o consumo de lactose em porcentagem ao longo da fermentação, calculados pela equação 4.

Tabela 4 Consumo de lactose após 168h de fermentação

Ensaio	X1 (Log UFC/mL)	X2 (Tempo de adição PB -h)	%Consumo de lactose
1	7,3	4,0	48,37
2	8,7	4,0	49,44
3	7,3	8,0	56,38
4	8,7	8,0	63,19
5	7,0	6,0	67,01
6	9,0	6,0	65,81
7	8,0	2,6	47,07
8	8,0	9,4	45,15
9	8,0	6,0	44,91
10	8,0	6,0	50,01
11	8,0	6,0	46,45

X<sub>1</sub> –(Log UFC/mL) concentração de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 e X<sub>2</sub> – tempo de inoculação *Propionibacterium freundenreichii* PS-1

Pode ser notado o maior consumo de açúcares nos ensaios 4, 5 e 6 que apresentaram, no geral, menor valor de acidez com concentração de inóculo de  $5,0 \cdot 10^9$ ,  $10^8$  e  $10^{10}$  UFC/mL respectivamente. Os ensaios 1 e 3 que tiveram maiores valores em acidez e maiores valores de pH, tiveram consumo moderado em ordem de ensaio de 48,37 e 56,38% correspondente ao mesmo valor de UFC/mL de  $2,0 \cdot 10^8$  que são valores próximos à média de consumo observada

neste trabalho. O consumo de lactose em 168h de fermentação variou de 44,91 a 67,01% com consumo médio de  $53,07 \pm 8,50\%$ .

### 3.2.3 Crescimento celular de bactérias lácticas e propiônicas durante a fermentação

Na Tabela 5 é ilustrado o fator de variação de concentração celular, considerando o tempo inicial e final da incubação.

Tabela 5 Fator de variação de concentração celular considerando tempo inicial e final de fermentação (168h)

<i>Ensaio</i>	<i>X1</i> (Log UFC/mL)	<i>X2</i> (Tempo de adição PB -h)	<i>Fator de variação de</i> <i>concentração celular</i>
1	7,3	4,0	0,0186
2	8,7	4,0	0,3750
3	7,3	8,0	0,0283
4	8,7	8,0	0,0844
5	7,0	6,0	0,3864
6	9,0	6,0	0,6217
7	8,0	2,6	0,8456
8	8,0	9,4	0,2193
9	8,0	6,0	0,5397
10	8,0	6,0	0,1793
11	8,0	6,0	0,2847

X<sub>1</sub> –(Log UFC/mL) concentração de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 e X<sub>2</sub> – tempo de inoculação *Propionibacterium freundenreichii* PS-1

Pode-se observar, a partir dos dados da tabela que, para todos os tratamentos, a população de células diminuiu ao longo da fermentação, uma vez que o fator de variação da concentração celular foi menor que 1.

Na Tabela 6, são apresentados os efeitos das variáveis independentes estudadas sobre o fator de variação de concentração celular das bactérias. Nenhum dos termos apresentou efeito estatisticamente significativo, ao nível de 5% de significância sobre a variação da concentração celular, demonstrando que o crescimento das bactérias propiônica não foi afetado nem pela concentração de inóculo das bactérias propiônicas, nem pelo tempo de adição das mesmas. Assim, dentro do intervalo estudado, a maior variação na concentração celular verificado foi conseguido usando-se maior concentração de inóculo de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 ( $X_1$ ) e menor tempo de inoculação de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 ( $X_2$ ) ( $10^9$  em 2h36min).

Tabela 6 Estimativa dos efeitos da concentração de inóculo de PS-1 e do tempo de adição no crescimento de *L. helveticus* e *Propionibacterium freundenreichii* PS-1

Fatores	Efeitos	Erro padrão	$t_{\text{calc}}$ (5)	p-valor
Média	0,34	0,17	2,00	0,10
(1) Log UFC/mL(L)	0,19	0,21	0,91	0,41
Log UFC/mL(Q)	-0,03	0,25	-0,12	0,91
(2) tempo (h) (L)	-0,29	0,21	-1,42	0,22
tempo (h)(Q)	0,00	0,25	0,00	1,00
1Lby 2L	-0,15	0,29	-0,52	0,63

É verdade que já foi notado que, ao longo da fermentação para todos os ensaios, a acidez total aumentou rapidamente até 96h e depois estabilizou-se até ao final da fermentação e, conseqüentemente, houve também queda de pH em



todos ensaios do planejamento. Entretanto, o fenômeno fisiológico que atuou nesse caso, foi a alteração brusca do pH e do teor de acidez do meio, ao longo da fermentação. Sem dúvida alguma, há microrganismos que suportam melhor do que outras tais modificações em pH e acidez, mas certamente as linhagens de bactérias propiônicas não são muito resistentes a essa variação. Segundo Beresford et al. (2001), as bactérias propiônicas apresentam pH ótimo de crescimento na faixa de 6,5 a 7,0. O pH 5,0 é o ponto crucial e em valores de pH abaixo deste, há queda do crescimento das bactérias propiônicas, como foi observado neste trabalho. Numa publicação de análise da estratégia de controle de pH para produção de ácido propiônico, a partir de *Propionibacterium freudenreichii* M207015 foi notado que esse desempenhava papel vital na produção de ácido propiônico e crescimento celular, pois o pH mais baixo (5,5) ou pH elevado (7,0) não era benéfico para produção de ácido propiônico e crescimento celular. Nessa mesma publicação foi encontrado pH 6,0 como ótimo para produção de ácido propiônico, tendo atingido o máximo de produção de 14,58g/L, foi também encontrado pH 6,5 como ótimo para o crescimento celular (FENG et al., 2010). Esses resultados são coerentes com os obtidos nesse trabalho. No entanto, a maior produção em todos os ensaios de ácidos propiônico e acético foi verificada nas primeiras 24h de fermentação (intervalo de pH de 6,00 - 3,94) e nos tempos subsequentes não foi mais notada produção. Juntamente a isso, pode-se pensar que a baixa produção dos ácidos propiônico e acético e a variação na concentração celular está diretamente relacionada com os valores baixos verificados de pH, ao longo de toda a fermentação (Figura 1). O tampão adicionado de monohidrogenofosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ) no meio de crescimento antes da fermentação pode não ter conseguido manter a variação do pH por um período longo e a influência da suplementação do meio de crescimento por 1% de extrato de levedura não contribuiu muito para o crescimento (média de  $7,51 \cdot 10^7$  no tempo inicial para  $1,83 \cdot 10^7$  UFC/mL

notempo final). Os resultados da contagem de células viáveis foram inferiores aos obtidos por Marcoux et al. (1992), usando-se permeado de soro e controlando pH pela adição de amônia gasoso. O meio de crescimento de culturas neste artigo foi suplementado com extrato de levedura e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e notaram aumento na contagem de células de até  $1,3 \times 10^{10}$  UFC/mL após 48 h.

A variação dos parâmetros de acidez e pH pode ter favorecido *Lactobacillus helveticus* que consegue sobreviver a valores mais baixos de pH. Num estudo de produção de produtos lácteos desenvolvido por Nielsen et al. (2009), foi visto que *L. helveticus* são espécies mais acidificantes e tolerantes ao ácido lático que conduzem à diminuição do pH até 3,5, que está na faixa dos valores críticos de pH que essas bactérias podem suportar. Foi apresentado num artigo que as bactérias propiônicas exibem pH ótimo de crescimento na faixa de 6,5 a 7,0. O pH igual a 5,0 é o ponto crítico e em meios com valores de pH abaixo desse, há queda do crescimento das bactérias propiônicas (BERESFORD et al., 2001). Então o crescimento observado especialmente no tempo final, pode ter sido das linhagens de *Lactobacillus helveticus*, pois nesse trabalho a diminuição do pH foi próxima a 3,5, o que foi citado por muitos autores como sendo o pH que essas linhagens podem suportar. A redução do fator de crescimento pode ser explicada a partir da diferença da taxa de crescimento entre as duas culturas, dado visto no Capítulo 2 em que a taxa de crescimento da cultura *L. helveticus* foi superior à taxa de crescimento das linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Assim, acredita-se que, no início ocorreu uma simbiose entre as duas culturas. No entanto, devido à diferença no crescimento podem ter ocorrido muitas modificações no meio de fermentação e essas alterações, como de acidez, pH e metabólitos produzidos podem não ter favorecido as linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, reduzindo assim a sua viabilidade e o fator de variação de concentração celular.

### 3.3 Análise da produção de ácido lático ao longo da fermentação

Neste caso, foi construída a Figura 3 em que pode ser vista atentamente a variação da concentração do ácido lático, ao longo de 168h de fermentação. No início da fermentação, a concentração do ácido lático era próximo de zero com valores que oscilavam entre 0,27 a 0,51 g/L. Com o percurso da fermentação sua concentração foi se incrementando. Esse aumento de ácido lático pode ter dificultado o crescimento das linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e produção do ácido propiônico pela evolução da acidez e redução do pH, já discutido neste trabalho. Na Figura 3 está representada a variação do ácido lático ao longo da fermentação.

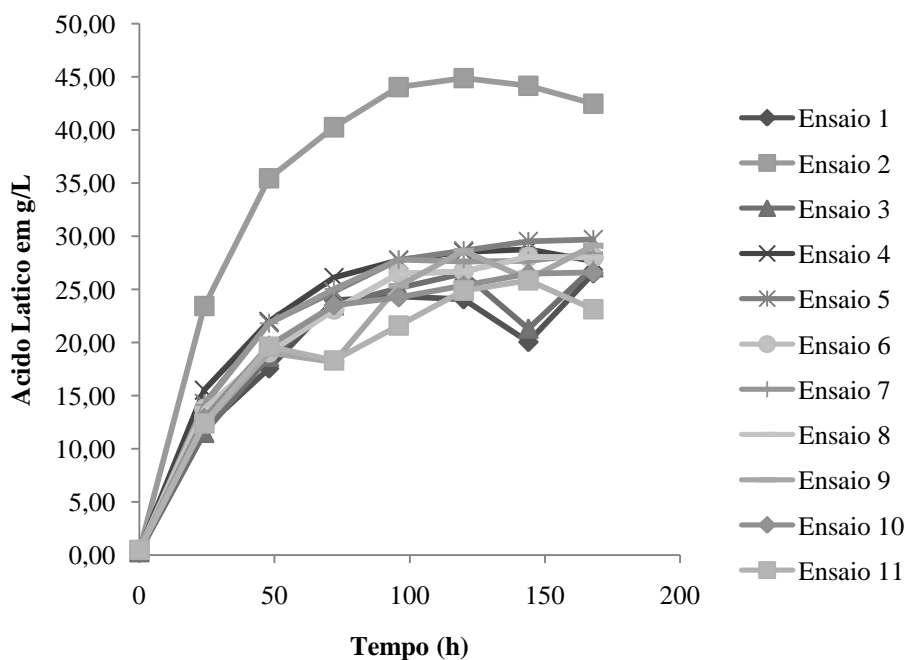


Figura 3 Variação de ácido lático no meio fermentado em 168h de incubação

Nesta Figura, a maior variação foi verificada no ensaio 2 com 42,03g/L, esperando-se maior produção dos ácidos propiônico e acético pela abundância do substrato neste ensaio. Em artigo publicado por Zárate e Chaia (2012), constatou-se que o consumo de lactose pelas linhagens de *P. acidipropionicii* Q4 era elevado nas primeiras 24h (17mmols/L) e insignificante nas 24h subsequentes (2,6mmols/L), isto porque essas linhagens metabolizavam preferencialmente o ácido láctico nas 24h seguintes. Importa ressaltar ainda que, nos ensaios 1 e 3, que apresentaram teores mais elevados de acidez total (Figura 3), as concentrações de ácido láctico não foram elevadas, comprovando seu rápido consumo pelas bactérias propiônicas. É apresentada na Tabela 7, a variação de ácido láctico ao longo da fermentação.

Tabela 7 Variação de ácido láctico considerando-se o tempo inicial e final de fermentação

Ensaio	X1 (Log UFC/mL)	X2 (Tempo de adição PB -h)	Varição de ácido láctico em g/L
1	7,3	4,0	26,11
2	8,7	4,0	42,03
3	7,3	8,0	26,79
4	8,7	8,0	27,24
5	7,0	6,0	29,25
6	9,0	6,0	27,50
7	8,0	2,6	27,91
8	8,0	9,4	27,50
9	8,0	6,0	28,68
10	8,0	6,0	26,12
11	8,0	6,0	22,64

X<sub>1</sub> –(Log UFC/mL) concentração de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 e X<sub>2</sub> – tempo de inoculação *Propionibacterium freundenreichii* PS-1

### 3.4 Influência da concentração e tempo de inoculação de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1, na produção de ácidos propiônico e acético

Na Tabela 8, está apresentado o planejamento com os 11 ensaios efetuados, os valores codificados, os originais e os resultados da produção de ácidos (propiônico e acético).

Tabela 8 Resultados do Planejamento fatorial para as variáveis respostas de produção de ácido propiônico (PAP) e acético (PAAC)

Ensaio	X1	X2	PAP (g/L)	PAAC (g/L)
	(Log UFC/mL)	(Tempo de adição PB -h)		
1	-1(7,3)	-1(4,0)	1,35	2,60
2	1(8,7)	-1(4,0)	3,78	2,16
3	-1(7,3)	1(8,0)	1,75	2,82
4	1(8,7)	1(8,0)	2,87	1,97
5	-1,41(7,0)	0(6,0)	2,07	1,90
6	1,41(9,0)	0(6,0)	1,96	2,27
7	0(8,0)	-1,41(2,6)	1,64	2,08
8	0(8,0)	1,41(9,4)	1,69	2,12
9	0(8,0)	0(6,0)	1,56	3,10
10	0(8,0)	0(6,0)	1,65	2,13
11	0(8,0)	0(6,0)	1,05	2,00

X<sub>1</sub> –(Log UFC/mL) concentração de *Propionibacterium freundenreichii* PS-1 e X<sub>2</sub> – tempo de inoculação *Propionibacterium freundenreichii* PS-1

Pode-se observar que a produção de ácido propiônico e acético variou de 1,05 (ensaio 11) a 3,78g/L (ensaio 2) e 1,90 (ensaio 5) a 3,10g/L (ensaio 9) respectivamente. Esses resultados foram analisados usando-se o software Statistica 8.0, e os efeitos dos fatores estão apresentados na Tabela9.

Verifica-se que todos os termos das variáveis independentes da Tabela 9 não apresentaram efeito estatisticamente significativos, em nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) sobre a produção do ácido propiônico e acético. Isto revela que a produção de ácidos propiônico e acético não foi afetada pelas concentrações de inóculo de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 ( $p = 0,24$  e  $0,50$ ), e tempo de inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 ( $p = 0,23$  e  $0,62$ ) respectivamente.

Tabela 9 Efeitos das concentrações de inóculo e tempo de inoculação de *P. freudenreichii* PS-1 na produção de ácido propiônico e acético em fermentação mista com *L. helveticus*

Fatores	Efeitos AP	Efeitos AAC	p-valor AP	p-valor AAC
Média.	1,43	2,35	0,01	0,00
(1) Log UFC/mL(L)	0,63	-0,25	0,24	0,50
Log UFC/mL(Q)	0,56	0,03	0,36	0,94
(2) tempo (h) (L)	-0,63	-0,18	0,23	0,62
tempo (h)(Q)	0,31	-0,01	0,60	0,98
1Lby 2L	-1,40	-0,11	0,09	0,83
R <sup>2</sup>	0,64	0,14	-	-

O sistema da produção do ácido propiônico e acético assim como o crescimento celular foram afetados por variáveis não controladas ao longo da fermentação, não havendo diferenças significativas entre o intervalo das concentrações do inóculo e tempos avaliados no planejamento. Entretanto, a concentração do inóculo de *L. helveticus* fixado em  $10^7$  UFC/mL, a partir do correspondente em  $A_{540} = 0,92$  no espectrofotômetro em que foi inoculado antes (variando o tempo de inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1) crescia rápida e aumentando drasticamente a concentração do ácido láctico.

Conseqüentemente, ocorreu aumento de acidez (no início da inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1), que variou de 0,0999 (ensaios 7, 8, 9, 10 e 11) a 0,2664g/100mL de acidez total do meio (ensaios 3 e 4). decréscimo do pH que variou de 5,78 (ensaio 5) a 6,37 (ensaio). Esse pode ter sido o fator limitante no crescimento e produção de ácidos propiônico e acético. Segundo Zhu et al. (2012), o aumento da concentração do ácido propiônico pode ter um efeito inibidor sobre a bioprodução de ácido propiônico. Para essa análise parece não colaborar a ideia, uma vez que o ácido propiônico produzido de 3,78g/L não pode ter sido suficientemente maior para inibir a bioprodução, mas pensa-se que essa inibição pode ter sido causada por concentração elevada do ácido láctico, antes mesmo da inoculação de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Tortora, Funke e Case (2000) observaram que *L. helveticus* produzia ácido láctico a partir de simples fermentação de carboidratos. E que a acidez produzida impedia o crescimento das bactérias competidoras, criando nicho ecológico no qual os lactobacilos levam vantagem em relação aos competidores. No entanto, para Zárate e Chaia (2012), o ácido láctico aumenta a atividade e maior extensão da enzima (beta-galactosidase). Assim sendo as bactérias propiônicas devem ser desenvolvidas na presença desta fonte de carbono a fim de obter atividade da enzima elevada para a hidrólise rápida da lactose. Neste trabalho era esperada convivência mútua, dado que as *L. helveticus* fermentam a lactose e produzem ácido láctico que serviria como substrato para a *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, para produzir ácidos propiônico e acético. Contudo pensa-se que essa simbiose foi limitada graças ao aumento de acidez e decréscimo de pH (Figura 1), promovida por altos teores de ácido láctico (Figura 4) que era abundante na fermentação. Esses resultados divergem ainda com trabalho publicado por Chen et al. (2012), que evidenciaram que, na primeira fase de fermentação foi produzido mais ácido láctico e que esse serviu de substrato para produção de ácido propiônico. Outro fato que pode ter colaborado ao fraco crescimento e

produção dos ácidos propiônico e acético é o desnível no crescimento e percebeu-se que as bactérias propiônicas exibiam crescimento lento. Realidade colaborada por muitos autores em que também mostram que as maiores desvantagens de algumas fermentações são o lento crescimento da bactéria, alta produção de inibidores e a dificuldade de recuperação do produto (HUANG et al., 2002). Um dos exemplos é o pH da fermentação que pode afetar tanto o crescimento dos microrganismos como a produção e estabilidade dos metabólitos obtidos (CARTA et al., 1999; CASADEI, 2012; LONSANE; GHILDYAL; BUDIATMAN, 1985). Embora o teor final de ácido propiônico de 3,78 g/L tenha sido significativamente menor do que os resultados publicados na literatura, este resultado pode motivar abertamente o uso de soro desnatado como substrato de baixo custo para fins de produção de ácidos propiônico.



#### **4 CONCLUSÃO**

A máxima concentração do ácido propiônico atingido foi de 3,78 g/L e 3,10 g/L de ácido acético após 168h de fermentação. A concentração do ácido propiônico foi significativamente menor que a máxima reportada na literatura, o que pode ser causado pela inibição não só pela concentração do ácido propiônico, mas principalmente pela acentuada diminuição de pH ao longo do processo fermentativo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa da produção de ácido propiônico por cultura mista de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* indicou-nos as seguintes observações:

- a) diferença no tempo de crescimento de 12h entre a *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*;
- b) aumento brusco de acidez diminuição do pH dos meios de fermentação.

Estes fatores podem ter contribuído na menor produção de ácido propiônico e que podia ser melhorada usando-se controle de pH ou fermentação extrativa do ácido propiônico.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16<sup>th</sup> ed. Richmond, 1998. 1141 p.

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 163 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BARBOSA, L. C. A. **Introdução à química orgânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 299 p.

BARBOSA, S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol aguardiente: estudio de la producción de etanol use of serum as a substrate for production of marc: kinetic study of the production of ethanol. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 1, p. 7-25, jan./mar. 2010.

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

BORGES, F. C. **Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada**. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CARTA, F. S. et al. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 68, n. 1, p. 23-28, Apr. 1999.

CASADEI, M. E. **Processos fermentativos a partir da cana-de-açúcar**. 2012. 39 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012.

CHEN, F. et al. Propionic acid production in a plant fibrous-bed bioreactor with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 202-210, Feb. 2012.

CORAL, J. et al. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 151, n. 2/3, p. 333-341, 2008.

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

FENG, X. H. et al. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for propionic acid production with *Propionibacterium Freudenreichii* CCTCC M207015. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 2, p. 343-349, 2010.

HUANG, J. et al. Bioresource technology efficient production of butyric acid from Jerusalem artichoke by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 4, p. 3923-3926, Apr. 2011.

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

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **ISO 7218**: microbiology of food and animal feeding stuff e general requirements of guidance for microbiological examination. Geneva, 2007. 66 p.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Chicago: Seventh, 2007. 790 p.

KÁDÁR, Z. et al. Bioethanol production by inherent enzymes from rye and wheat with addition of organic farming cheese whey. **Science Direct**, New York, v. 90, n. 11, p. 3323-3329, Nov. 2011.

LONSANE, N. P.; GHILDYAL, S.; BUDIATMAN, S. V. R. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 7, n. 6, p. 258-265, June 1985.

LUZ, M. P. **Produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**. 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MARCOUX, V. et al. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 74, n. 2, p. 95-99, Apr. 1992.

NIELSEN, M. S. et al. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 3, p. 155-165, 2009.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21, p. 145-151, dez. 2008. Edição especial.

PEREIRA, D. B. C. et al. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. 234 p.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, New York, v. 110, n. 1, p. 48-68, Feb. 2012.

QUEIROZ, S. F.; MATA, J. F.; EMERENCIANO, O. F. Produção de leite e queijo bovino da indústria laticinista Miraleite no triângulo mineiro. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**, Uberaba, v. 2, 2012. Disponível em: <<http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/viewFile/417/309>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

RAMOS, T. M. **Produção de xarope de lactulose a partir de soro de ricotta e seu emprego em iogurte e queijo Quark**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RODRIGUES, M. A.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 309 p.

WOSKOW, S. A.; GLATZ, B. A. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of propionibacterium acidipropionici in batch and semicontinuous fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 10, p. 2821-2828, Oct. 1991.

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

ZHU, L. et al. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant Propionibacterium acidipropionici. **Bioresource Technology**, Essex, v. 112, p. 248-253, 2012.

ZÁRATE, G.; CHAIA, A. P. Influence of lactose and lactate on growth and  $\beta$ -galactosidase activity of potential probiotic Propionibacterium acidipropionici. **Anaerobe**, London, v. 18, n. 1, p. 25-30, Jan. 2012.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A - Tempos de evolução dos padrões analíticos na cromatografia líquida de alta eficiência

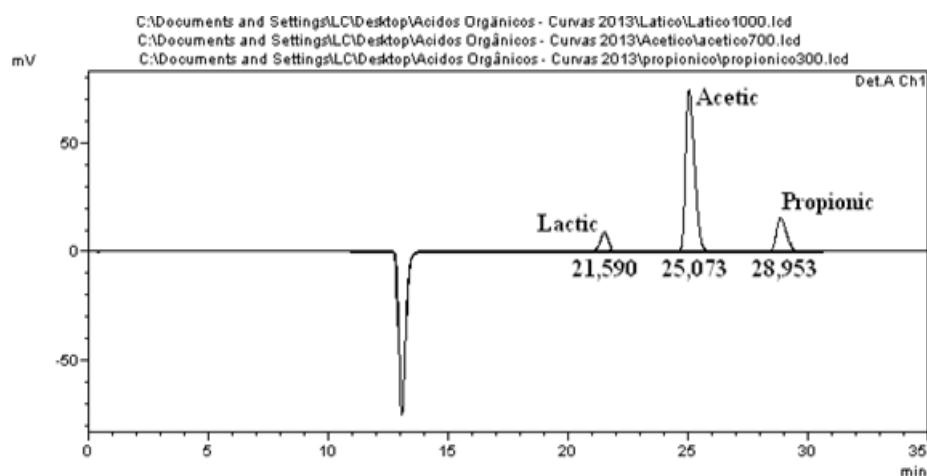


Figura 1 Cromatograma dos padrões dos ácidos lático acético e propiônico

A partir da área dos picos em função da concentração do padrão (mg/mL) foram traçadas curvas-analíticas para a quantificação dos ácidos, evidenciadas pela Tabela 1.

### Parâmetros de calibração de diferentes ácidos orgânicos (lático acético e propiônico).

Tabela 1 Parâmetros de calibração de diferentes ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico)

Ácido orgânico	Equação	R <sup>2</sup>
Lático	$y = 107417x - 91,747$	0,9969
Acético	$y = 26057x - 11879$	0,9988
Propiônico	$y = 14759x - 391,29$	0,9983

y = área integrado do pico; x = concentração g/L; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

### Determinação dos ácidos orgânicos

Foram identificados inicialmente os componentes dos ácidos presentes no soro desnatado (Figura 1) e posteriormente identificados os constituintes das amostras fermentadas (Figura 2), determinando suas concentrações pelas curvas padrão.

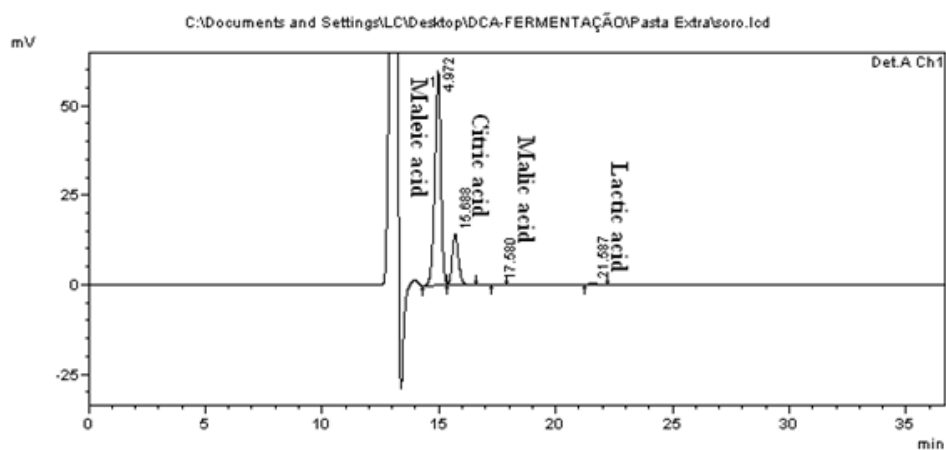


Figura 1 Componentes presentes no soro desnatado analisado



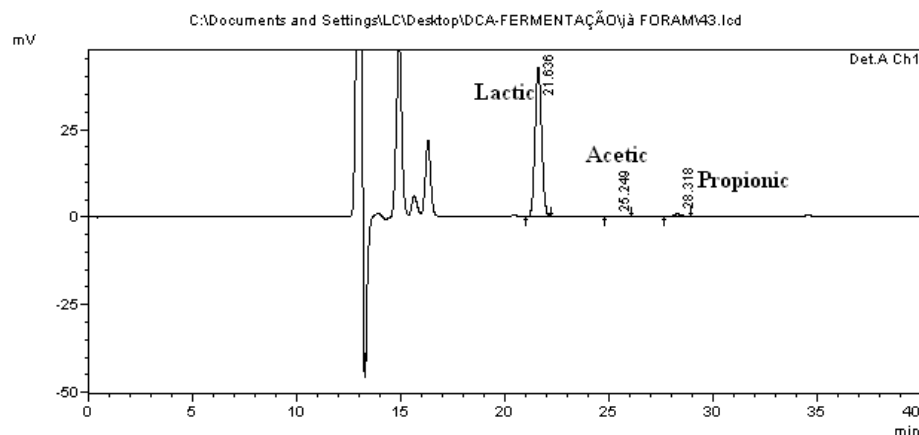


Figura 2 Ácidos orgânicos resultante do metabolismo do soro pelas bactérias *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus*

A partir deste gráfico pode ser notado que a fermentação envolvendo *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 e *Lactobacillus helveticus* foram produzidos ácidos láctico, acético e propiônico. Entretanto, no artigo publicado por Marcoux et al. (1992), foram produzidos três principais ácidos como acético, propiônico e pirúvico. No mesmo artigo foi usada cultura de *Propionibacterium freudenreichii* subsp, *shermanii*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*, com controle de pH por meio de amônia gasoso....